

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Avaliação da Atividade Inseticida dos Óleos
Essenciais das Plantas Amazônicas Annonaceae,
Boraginaceae e de Mata Atlântica Myrtaceae como
Alternativa de Controle às Larvas de *Aedes
aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).**

Sullamy Dayse Gomes Aciole

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Avaliação da Atividade Inseticida dos Óleos
Essenciais das Plantas Amazônicas Annonaceae,
Boraginaceae e de Mata Atlântica Myrtaceae como
Alternativa de Controle às Larvas de *Aedes
aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).**

Dissertação Orientada por Profa. Doutora Maria Teresa Rebelo (FCUL)
e Prof. Doutor Mário Antônio Navarro da Silva (UFPR)

Sullamy Dayse Gomes Aciole

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2009

À minha mãe Jandyra.

Por tudo o que ela representa em minha vida: meu maior tesouro; meu presente Divino. Por seu incalculável amor e apoio. Por sua orientação e dedicação. Por seu exemplo de vida e amor ao próximo, que sempre terei comigo. Sem ela nada disso seria concreto, pois esta “mãe-amiga” sempre me deu forças para continuar lutando. A você dedico todo o meu amor e eterna gratidão.

Aos meus queridos pai Aloísio (in memoriam) e irmão Sandro (in memoriam).

Tenho a certeza que se orgulham muito de mim por eu nunca ter desistido da minha caminhada, mesmo sabendo que ainda tenho muito a percorrer e aprender.

A Deus. Por ter-me concedido a oportunidade de estudar em outro país e aprender com as novas experiências. Por ter-me abençoado e me dado discernimento e sabedoria para tomar as decisões certas durante essa caminhada.

Aos meus pais Aloísio (in memoriam) e Jandyra por todo o amor, carinho e por terem sido os primeiros e mais importantes professores da minha vida. Em especial a minha mãe por ter financiado todo o meu curso de mestrado, já que não obtive bolsa de estudo.

À minha família brasileira, em especial minha irmã Cibele Léa e minha sobrinha Maria Eduarda. Aos tios e primos, que mesmo distantes torceram e oraram por mim. À minha família portuguesa: Adelino Duarte, Maria José, Luís Miguel, João Pedro, Ricardo Jorge, Ana Matilde, Adelaide e Maria José Vasconcelos, pelo carinho, pelo apoio nos momentos em que a saudade de casa e do Brasil insistiam em aparecer. Agradeço pelo amor incondicional.

Ao meu esposo José Carlos Salgueiro por ajudar-me a executar algumas ferramentas computacionais. Por estar sempre ao meu lado. Agradeço por completar-me, encher minha vida de alegria, paz e sonhos. Obrigada pelo amor, carinho e por suportar a distância de 12 meses quando estive no Brasil desenvolvendo a parte experimental deste trabalho. Amo-te.

À Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, instituição que possibilitou a obtenção do grau de Mestre.

Às Coordenadoras do Mestrado, Professora Doutora Deodália Dias e Professora Doutora Ana Crespo, pelo apoio durante todo o curso e sábios conselhos.

Meus sinceros e especiais agradecimentos à Professora Doutora Teresa Rebelo, minha orientadora interna, por sua orientação, amizade e apoio em todos os aspectos e momentos: quando eu ainda estava no Brasil e me inscrevi no mestrado até os dias atuais. Agradeço por todos os emails carinhosamente respondidos e pela colaboração na execução desse trabalho.

Ao Departamento de Biologia Animal da Faculdade de Ciências, por oferecer excelentes professores que transmitiram importantes informações enriquecendo nossos conhecimentos.

À Universidade Federal do Paraná, instituição brasileira, pelo acolhimento durante todo o tempo de trabalho experimental. Em especial ao Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária do Setor de Pós-graduação em Entomologia, por oferecer toda a infra-estrutura de laboratórios e de campo, pelo apoio técnico no fornecimento dos materiais e equipamentos necessários para a confecção deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos ao Professor Doutor Mário Antônio Navarro, meu orientador externo. Obrigada por sua orientação, amizade, confiança, bem como pelo exemplo de profissionalismo, competência e dedicação à Ciência. Pessoa que admiro e tenho imenso respeito.

Meus sinceros agradecimentos ao Doutor Jonny Edward Duque Luna por sua importantíssima colaboração neste trabalho. Pelo auxílio nos bioensaios, pelas dicas na redação, pelos preciosos conselhos que levarei por toda a vida profissional e pessoal.

Ao Laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, em nome do Doutor Emmanoel Costa, pela importante contribuição, e Professor Doutor Francisco Marques, por todo o suporte e disponibilidade de tempo e do material vegetal e químico para desenvolvimento desse trabalho.

A toda a equipe do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV) da Universidade Federal do Paraná: a doutoranda Ana Carolina Dalla, aos mestrandos Carla Piccoli, Mário Guedes e Milehna Guaridu, aos mestres Lisiane Poncio, Elaine Fantinatti e Thiago Woiski. Aos estagiários Betina Westphal, Daniel Bellan, Gisele Moraes e Rodrigo Chitolina por auxiliar na execução e leitura dos bioensaios, criação e manutenção das colônias de Aedes aegypti, interpretação de alguns resultados. Agradeço por me fazerem chorar de tanto sorrir com os momentos descontraídos, demonstrando assim um carinho incondicional. Agradeço pelo apoio quando a saudade de casa e de Portugal insistiam em me invadir. Agradeço também pela linda amizade que construímos nesses meses de convívio.

À Professora Doutora e amiga Iracilda Lima (Universidade Federal de Alagoas) pela indicação do orientador externo. Agradeço pelos bons “puxões de orelhas” me incentivando quando eu não achava que era capaz de fazer prosseguir. Agradeço pelas sugestões e dicas.

À Professora Doutora Natércia Aurora Teixeira (Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto) pela atenção aos emails, conselhos e sugestões.

A todos os colegas do Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, em especial a Cristiana Teixeira, Eunice Conceição, Cristiana Franco e Andreia Matos. Agradeço pelo apoio, pelos momentos de estudo e esclarecimentos das dúvidas, pelas apresentações dos seminários.

Aos amigos Marcela Pinheiro, Ronner Gondim, Patrícia Buss e Paulo Marquês pela amizade e convivência em Lisboa.

À Professora Doutora e amiga Tereza Calado e esposo, e à Professora MSc. Gilda Acioli pelo apoio na minha ida a Portugal.

A todas as pessoas e a todos os amigos que participaram direta e indiretamente deste trabalho e do meu crescimento profissional de forma ímpar. Deus os abençoe hoje e sempre.

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

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

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

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

(Pe. Zezinho)

A Dengue é uma doença causada por quatro sorotipos antigenicamente diferentes do arbovírus *Flavivirus*, transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*: *A. aegypti* nas Américas e *A. albopictus* na Ásia. Não existindo vacina que confira imunidade permanente aos sorotipos nem às suas variações genéticas, a principal medida de combate à doença é o controle vetorial através de inseticidas químicos. Diante desta estratégia, observou-se o surgimento de alterações da susceptibilidade de *A. aegypti* a organofosforados e piretróides em vários países e o surgimento da seleção de populações resistentes. Inseticidas biológicos e reguladores de crescimento foram outras alternativas de controle. Porém, outro método através do uso de compostos semioquímicos provenientes de extratos naturais e de óleos essenciais de plantas vem sendo estudado na busca de substâncias bioativas que diminuam a dependência aos químicos. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial larvicida de óleos essenciais de cinco plantas da Amazônia (*Guatteria blepharophylla*, *G. friesiana*, *G. hispida* e *Cordia curassavica*) e Mata Atlântica Brasileira (*Pimenta pseudocaryophyllus*) contra *A. aegypti*. De suas folhas extraíram-se os óleos essenciais por hidrodestilação. Realizou análise por RMN em *Guatteria* spp. e análise de CG-MS em *C. curassavica*. Nos bioensaios larvas foram expostas a diferentes concentrações dos óleos e verificou-se a atividade larvicida, período de atividade larvicida, efeito subletal e alterações comportamentais e morfológicas ocorridas após exposição aos óleos. Análise *Probit* estimou as CL₅₀, CL₉₅ e CL₉₉, respectivamente, de 85,74, 199,35 e 282,76 ppm para *G. hispida*; 58,72, 107,6 e 138,37 ppm para *G. blepharophylla*; 52,6, 94,37 e 120,22 ppm para *G. friesiana*; 87,70, 182,84, 247,88 para *C. curassavica* e 44,09, 128,14, 199,37 para *P. pseudocaryophyllus*. Análise de RMN indicou o óxido de cariofileno em *G. blepharophylla* como principal constituinte, α -, β - e γ -eudesmols em *G. friesiana* e α - e β -pinenos e (*E*)-cariofileno em *G. hispida*. Análise de CG-MS identificou 26 compostos no óleo de *C. curassavica*, sendo cis-Isolongifolano o principal. Os resultados indicaram a potencialidade inseticida desses óleos contra larvas de *A. aegypti* em condições laboratoriais.

Palavras-chave: Inseticidas químicos, susceptibilidade, semioquímicos e óleos essenciais.

Abstract

Dengue is a disease caused by four arboviruses serotypes antigenically different of *Flavivirus*, which are transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes*: *A. aegypti* in the Americas and *A. albopictus* in Asia. There isn't a vaccine that confers permanent immunity to neither all four serotypes nor their genetic variations the principal measure to control the disease is the vector control method using chemical insecticides. Given the use of this strategy the appearance of changes in the susceptibility of *A. aegypti* to organophosphates and pyrethroids in several countries and the emergence of selection of resistant populations have been observed. Biological insecticides and growth regulators were other alternative methods have been used to control. However, another method through the use of volatile semiochemicals from natural extracts and essential oils of plants has been studied in the search for bioactive substances that diminish the dependence on chemicals. The objective of this study was to assess the larvicidal potential of essential oils from five plants in the Amazon (*Guatteria blepharophylla*, *G. friesiana*, *G. hispida* and *Cordia curassavica*) and Brazilian Atlantic Forest (*Pimenta pseudocaryophyllus*) against *A. aegypti*. By hidrodistillation oil were extracted from the leaves. RMN analysis was performed for *Guatteria* spp. and GC-MS analysis for *C. curassavica*. For the bioassays larvae were exposed to different concentrations of oils and larvicidal activity, period of larvicidal activity, effect of sublethal and behavioral and morphological changes occurring in the larvae after exposure were measured. Analysis of bioassays estimated lethal concentrations CL₅₀, CL₉₅ and CL₉₉, respectively, 85.74, 199.35 and 282.76 ppm for *G. hispida*, 58.72, 107.6 and 138.37 ppm for *G. blepharophylla*, 52.6, 94.37 and 120.22 ppm for *G. friesiana*, 87.70, 182.84, 247.88 to *C. curassavica* and 44.09, 128.14, 199.37 for *P. pseudocaryophyllus*. Analysis RMN indicated the caryophyllene oxide in *G. blepharophylla* like main constituent; α -, β - e γ -eudesmols in *G. friesiana* and α - e β -pinenos e (*E*)-cariofileno in *G. hispida*. Analysis of GC-MS identified 26 compounds in the oil of *C. curassavica*, and cis-Isolongifolano was the main constituent. The results indicated the potential of these oils as insecticides against larvae of *A. aegypti* in laboratory conditions and its impact in insect behavioral and morphological changes.

Keywords: Chemical insecticides, susceptibility, semiochemicals and essential oils.

Índice

Dedico.....	i
Agradeço.....	ii
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
 INTRODUÇÃO GERAL	 01
1. DENGUE: A Doença.....	01
2. DENGUE: Os Vetores.....	03
2.1. <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	03
2.2. <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> (Skuse, 1894)	04
2.3. Biologia e Morfologia dos estágios de vida de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762).	04
i) OVO.....	04
ii) LARVAS.....	06
iii) PUPA.....	06
iv) ADULTOS.....	07
3. DENGUE – Controle dos Vetores: Um Breve Histórico	07
4. DENGUE – Resistência dos Vetores A Inseticidas	09
5. Produtos de Origem Botânica - Atividade Inseticida.....	11
6. Composição Química das Plantas	12
a) Família Annonaceae.....	14
b) Família Boraginaceae	15
c) Família Myrtaceae	16
 ENQUADRAMENTO NO ÂMBITO DO MESTRADO	 19
 OBJETIVOS	 20
1. Objetivo Geral.....	20
2. Objetivos Específicos.....	20
 MATERIAIS E MÉTODOS	 21
1. Coleta das Amostras Vegetais	21
2. Extração dos Óleos Essenciais.....	21
3. Análise dos Óleos Essenciais de <i>Guatteria blepharophylla</i> , <i>G. friesiana</i> e <i>G. hispida</i> por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para confirmação dos compostos majoritários.....	22

Índice

4. Análise do Óleo Essencial de <i>Cordia curassavica</i> por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS).....	22
5. Obtenção das Larvas e Realização dos Bioensaios.....	23
5.1. Manejo das Larvas.....	23
5.2. Preparo das Soluções dos Óleos Essenciais.....	24
5.3. Bioensaios.....	25
a) Atividade Larvícida.....	25
b) Período de Atividade Larvícida.....	26
c) Efeito Sub letal.....	27
d) Calibração do DMSO	28
e) Alterações Morfológicas das Larvas expostas ao Bioensaio de Efeito Subletal...	28
6. Mortalidade das Larvas e Tempo de Exposição aos Óleos.....	28
7. Análise dos Dados.....	28
RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	30
1. Extração dos Óleos Essenciais.....	30
2. Análise dos Óleos Essenciais de <i>Guatteria</i> spp. por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para confirmação dos Compostos Majoritários.....	31
3. Análise do Óleo Essencial de <i>Cordia curassavica</i> por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS).....	39
4. Bioensaios.....	42
4.1. Atividade Larvícida dos cinco Óleos Essenciais.....	42
4.2. Período de Atividade Larvícida dos Óleos Essenciais de <i>Cordia curassavica</i> e <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	48
4.3. Efeito Sub letal.....	52
4.4. Calibração do DMSO - dimetilsulfóxido (CH ₃) ₂ SO.....	54
4.5. Alterações Comportamentais e Morfológicas das Larvas.....	55
CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXOS.....	71

Lista de Figuras

Figura 01	Ciclo biológico do <i>Aedes aegypti</i>	05
Figura 02	Ramos de <i>Guatteria blepharophylla</i> , <i>G. friesiana</i> e <i>G. hispida</i> , respectivamente.....	15
Figura 03	Aspecto geral da folha de <i>Cordia curassavica</i> , seus frutos e sua flor pentâmera.....	16
Figura 04	Aspecto geral de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> em seu hábitat natural e detalhe das folhas	17
Figura 05	Técnica de hidrodestilação utilizando aparelho de Clevenger.....	22
Figura 06	Esquema da realização do bioensaio.....	24
Figura 07	Ilustração esquemática do desenho experimental do bioensaio de atividade larvicida utilizado para os óleos essenciais das cinco espécies de plantas.....	26
Figura 08	Ilustração esquemática do desenho experimental do bioensaio de período de atividade larvicida de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> e <i>Cordia curassavica</i>	27
Figura 09	Constituintes majoritários identificados nos óleos essenciais das folhas de <i>Guatteria</i> spp...	31
Figura 10	Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial das folhas de <i>Guatteria friesiana</i>	32
Figura 11	Espectro de RMN de ^{13}C do óleo essencial das folhas de <i>Guatteria friesiana</i>	33
Figura 12	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do óleo essencial das folhas de <i>Guatteria friesiana</i>	33
Figura 13	Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial das folhas de <i>Guatteria blepharophylla</i>	35
Figura 14	Espectro de RMN de ^{13}C do óleo essencial das folhas de <i>Guatteria blepharophylla</i>	35
Figura 15	Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial das folhas de <i>Guatteria hispida</i>	37
Figura 16	Espectro de RMN de ^{13}C do óleo essencial das folhas de <i>Guatteria hispida</i>	38
Figura 17	Amplificação do espectro de RMN de ^{13}C do óleo essencial das folhas de <i>Guatteria hispida</i>	38
Figura 18	Ilustração gráfica da análise <i>Probit</i> da atividade larvicida do óleo essencial de <i>Guatteria blepharophylla</i> sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> , após 24 horas de exposição ao tratamento	44
Figura 19	Ilustração gráfica da análise <i>Probit</i> da atividade larvicida do óleo essencial de <i>Guatteria friesiana</i> sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> , após 24 horas de exposição ao tratamento.....	44
Figura 20	Ilustração gráfica da análise <i>Probit</i> da atividade larvicida do óleo essencial de <i>Guatteria hispida</i> sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> , após 24 horas de exposição ao tratamento	45
Figura 21	Ilustração gráfica da análise <i>Probit</i> da atividade larvicida do óleo essencial de <i>Cordia curassavica</i> sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> , após 24 e 48 horas de exposição ao tratamento.....	46
Figura 22	Ilustração gráfica da análise <i>Probit</i> da atividade larvicida do óleo essencial de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> , após 24 e 48 horas de exposição ao tratamento.....	47
Figura 23	Mortalidade Não Acumulada no Período de Atividade Larvicida analisado em 1, 2, 4, 6, 8 10 e 24 horas após a exposição das larvas de <i>Aedes aegypti</i> ao óleo essencial de <i>Cordia curassavica</i> nas concentrações CL_{10} e CL_{50}	49
Figura 24	Mortalidade Não Acumulada no Período de Atividade Larvicida analisado em 1, 2, 4, 6, 8 10 e 24 horas após a exposição das larvas de <i>Aedes aegypti</i> ao óleo essencial de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> nas concentrações CL_{10} e CL_{50}	50

Lista de Figuras

Figura 25	Aspectos morfológicos das larvas (a) e das pupas (b) de <i>Aedes aegypti</i> pertencentes ao tratamento controle.....	56
Figura 26	Aspectos morfológicos das larvas de <i>Aedes aegypti</i> expostas à concentração CL ₁₀ do óleo de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (a) e das larvas expostas à concentração CL ₅₀ do mesmo óleo essencial em (b).....	57
Figura 27	Aspectos morfológicos das larvas de <i>A. aegypti</i> expostas à concentração CL ₁₀ do óleo de <i>Cordia curassavica</i> (a) e das larvas expostas à concentração CL ₅₀ do mesmo óleo essencial (b).....	57
Figura 28	Aspectos morfológicos das pupas despigmentadas (a) e das pupas com formação de adulto ficando preso à exúvia (b) submetidas as concentrações CL ₁₀ do tratamento com o óleo essencial de <i>Cordia curassavica</i>	58

Lista de Tabelas

Tabela 1	Fatores que influenciam o surgimento da resistência a inseticidas nos insetos.....	11
Tabela 2	Características físico-químicas e rendimento dos óleos essenciais de <i>Guatteria</i> spp., <i>Cordia curassavica</i> e <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	30
Tabela 3	Dados de RMN de ^{13}C dos compostos γ -, α - e β -eudesmols presentes no óleo essencial das folhas de <i>Guatteria friesiana</i>	34
Tabela 4	Dados de RMN de ^{13}C do composto óxido de cariofileno presente no óleo essencial das folhas de <i>Guatteria blepharophylla</i>	36
Tabela 5	Dados de RMN de ^{13}C dos compostos α - e β -pinenos, e (<i>E</i>)-cariofileno presentes no óleo essencial das folhas de <i>Guatteria hispida</i>	39
Tabela 6	Identificação dos vinte e seis compostos voláteis do óleo essencial de <i>Cordia curassavica</i> através de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectometria de Massa (GC-MS).....	41
Tabela 7	Análise da atividade larvicida dos óleos essenciais de <i>Guatteria</i> spp., <i>Cordia curassavica</i> e <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> com suas respectivas concentrações letais, intervalos de confiança, qui-quadrado e coeficiente angular após leitura de 24 e 48 horas de exposição das larvas de <i>Aedes aegypti</i> aos óleos.....	42
Tabela 8	Tempo de duração dos experimentos do Efeito Sub Letal dos óleos essenciais de <i>Cordia curassavica</i> e <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> nas concentrações letais CL_{10} e CL_{50} , apresentando o percentual das mortalidades larval e pupal e emergência de adultos.....	53
Tabela 9	Análise <i>Probit</i> da calibração do DMSO exibindo CL_{50} e CL_{99} , intervalos de confiança, qui-quadrado e <i>slope</i>	54

Lista de Abreviaturas

Ache	Acetilcolinesterase
(CH ₃) ₂ SO	Dimetilsulfóxido
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CDC	Center of Disease Control
CL ₁₀	Concentração letal que ocasiona mortalidade de 10%
CL ₅₀	Concentração letal que ocasiona mortalidade de 50%
CL ₉₅	Concentração letal que ocasiona mortalidade de 95%
CL ₉₉	Concentração letal que ocasiona mortalidade de 99%
DC	Dengue Clássica
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DENV-1	Sorotipo 1 do Vírus da Dengue
DENV-2	Sorotipo 2 do Vírus da Dengue
DENV-3	Sorotipo 3 do Vírus da Dengue
DENV-4	Sorotipo 4 do Vírus da Dengue
DMSO	Dimetilsulfóxido
FD	Febre da Dengue
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
IRAC	Comitê de Ação a Resistência a Inseticidas
L1	Larva de primeiro instar
L4	Larva de quarto instar
LEMV	Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária
MoReNAa	Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de <i>Aedes aegypti</i>
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio anidro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
PEAa	Plano de Erradicação do <i>Aedes aegypti</i>
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SCD	Síndrome do Choque da Dengue
SUCAM	Superintendência de Campanhas de Saúde Pública
TAX on line	Rede Paranaense de Coleções Biológicas
UBV	Ultra-baixo volume
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UNESP	Universidade Estadual Paulista

1. DENGUE – A Doença

De acordo com relatos históricos, a Dengue derivou, provavelmente, do termo Swahili “*ka dinga pepo*” o qual era utilizado para descrever ataques provocados por maus espíritos e, inicialmente, foi um termo empregado para descrever enfermidades provocadas aos ingleses nos anos 1927-28, durante uma epidemia, nas Índias Ocidentais Espanholas (Holmes *et al.* 1998).¹

É causada por quatro sorotipos antigenicamente diferentes (DENV 1 a 4) do arbovírus *Flavivirus* (Família Flaviviridae), porém sorologicamente relacionados, os quais são transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*. O principal vetor nas Américas é *A. aegypti*, embora *A. albopictus* também desempenhe um importante papel, nomeadamente na Ásia. Possui o homem e outros primatas como hospedeiros vertebrados e, possivelmente, foi uma virose de mosquitos em ciclos silvestres antes de harmonizar-se com primatas e com o ser humano (Gubler, 1998). É a doença viral mais importante em termos de mortalidade e morbidade transmitida por vetores artrópodes (Rosen, 1999).

Há 12 anos atrás a Organização Mundial de Saúde já estimava que cerca de 1,3 milhões de pessoas estariam em risco de serem infectadas pelo vírus da Dengue (WHO, 1997). Hoje, estima-se que dois quintos da população mundial, ou seja, mais de 2,5 bilhões de pessoas estão em risco de dengue e a Organização Mundial de Saúde (OMS) calcula que pode haver 50 milhões de infecções de dengue cada ano no mundo (WHO, 2009).

Considerada uma das maiores preocupações em Saúde Pública no mundo, é endêmica em cerca de 112 países (Pinheiro & Corber, 1997). É incidente em países tropicais e subtropicais, onde latitudes e longitudes, assim como as condições do meio, tais como temperatura e umidade, favorecem o desenvolvimento e proliferação do vetor (Gubler, 2001).

Normalmente, a infecção do vetor com o vírus ocorre através da ingestão de sangue contendo partículas virais. E para este se infectar precisa ingerir um número elevado destas partículas e iniciar o período de incubação extrínseco (Oliveira, 2005). Estando o vírus no interior do vetor, este encontrará algumas barreiras à infecção. A primeira a ser enfrentada é o intestino médio. O vírus atravessa o lúmen do intestino médio e tem de alcançar algumas partes do corpo do inseto, antes que o ambiente hostil do lúmen o inative. Assim, superada esta barreira, o vírus se multiplica e se replica também em diversos órgãos. Este período extrínseco de incubação dura em torno de 8 a 10 dias. O vírus, portanto, infecta, finalmente, as glândulas salivares e é eliminado através da saliva, sendo transmitido ao hospedeiro vertebrado susceptível durante novo repasto sanguíneo. E é esta competência vetorial que o torna apto a ser um vetor efetivo do patógeno durante toda a sua vida (Bosio *et al.* 2000; Mellor, 2004; Acosta-Bas & Gómez-Cordero, 2005).

¹ As citações das referências bibliográficas seguem as normas da Revista Brasileira de Entomologia.

Já no homem, o período de incubação – período de incubação intrínseco – ocorre em torno de 2 a 7 dias, aproximadamente o mesmo tempo que surge a febre. O ser humano infectado torna-se o principal portador e multiplicador do vírus (WHO, 2009).

Por outro lado, os sorotipos virais também podem ser transmitidos entre os mosquitos, ocorrendo por via vertical, ou seja, quando o vírus infecta o óvulo ou o ovo; ou por via venérea, quando os machos, herdeiros do vírus por sua progenitora, o transmitem no líquido seminal (Joshi, *et al.* 2002).

Existem duas formas da doença: Dengue Clássica (DC ou FD – Febre da Dengue) e a Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) – a segunda pode se agravar para Síndrome do Choque da Dengue (SCD) - sendo ambas sintomáticas. Contudo, existe a forma assintomática a qual é considerada de grande importância epidemiológica, devido representar fonte silenciosa de transmissão do vírus, carreando-o às áreas incógnitas, porém infestadas com o vetor (Vasconcelos *et al.* 1998).

Casos de dengue e de suas complicações clínicas têm se manifestado anualmente nos países de regiões tropicais e subtropicais, sem no entanto, haver perspectivas promissoras que apresentem uma futura diminuição deste problema (Guzmán *et al.*, 2006). Os fatores que aumentam a dispersão do vírus da dengue e o seu vetor a novos lugares são a urbanização não planejada, as mudanças demográficas e climáticas, aliados à possibilidade do homem migrar rapidamente para qualquer lugar do mundo através das facilidades de transportes aéreo e terrestre (Kroeger & Nathan 2006).

Segundo Gubler & Clark, 1995; Gubler, 1998 e Acosta-Bas & Gómez-Cordero, 2005, o primeiro registro de epidemias de Dengue ocorreu na Ásia (Jacarta), África (Cairo) e América do Norte (Filadélfia) nos anos 1779 e 1780, levando a crer que a doença já tinha sido reconhecida há 230 anos e que o vírus assim como o mosquito têm distribuição variada nos trópicos. A sua ocorrência também foi mencionada por Teixeira *et al.* 1999 na Europa e Austrália, sendo endêmica em todos os continentes, exceto no Europeu (Pinheiro & Corber, 1997). Na Europa, a primeira epidemia documentada data de 1927 e 1928 (Grécia), e cessou após II Guerra Mundial (López-Vélez & Moreno, 2005). Na última década a incidência de Dengue tem aumentado assustadoramente, tornando-se endêmica em mais de cem países, principalmente na África, nas Américas, no Mediterrâneo Ocidental, sul e leste Asiático e oeste do Pacífico.

Relativamente ao Brasil, atualmente, os registros de casos da doença já são identificados em todos os 27 Estados da Federação, em 3.794 municípios (Câmara *et al.* 2007), num percentual de 68% do total dos municípios brasileiros. A doença é responsável por 60% dos casos ocorridos nas Américas (Nogueira *et al.* 2007). Em 1981 ocorreu a primeira epidemia restrita à cidade de Boa Vista – Roraima. Cerca de dois ou três anos se passaram e foi registrada uma epidemia no Rio de Janeiro e outros Estados brasileiros (Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e casos autóctones em Alagoas e Ceará) (Câmara *et al.* 2007).

Entre 1981-2006 foram notificados em todo o território brasileiro, um total de 4.234.049 casos de Dengue Clássica (DC), sendo 5.817 de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e Síndrome do Choque da Dengue (SCD), com 338 óbitos (Nogueira *et al.* 2007).

Contudo, em 2007 registraram-se 559.954 casos suspeitos da doença, sendo 1.541 confirmações como FHD, destes 158 foram óbitos. Os casos foram concentrados no Ceará, Rio de Janeiro, Maranhão, Pernambuco, Amazonas, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Piauí, Goiás, Alagoas, Paraíba e Rio Grande do Norte, ou seja, regiões sudeste e nordeste do país – as mais afetadas por infecções da Dengue. Em 2008, o Ministério da Saúde do Brasil registrou 120.570 casos, sendo 647 de FHD, com 48 óbitos, representando uma redução em relação ao ano anterior.

Em resumo, as regiões Sudeste (Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santos) e Nordeste (Alagoas, Sergipe, Pernambuco, Bahia e Ceará) são as mais acometidas pela doença, seguidas da região Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul e o Distrito Federal) e Norte (Tocantins, Pará, Roraima, Rondônia, Acre, Amapá e Amazonas). O Amazonas foi o último Estado brasileiro a ser re-invadido pelo vetor *A. aegypti*, em 1996 após a erradicação de 1955 (Figueiredo *et al.* 2004).

Na região Sul, de entre os três Estados que compõem a região, surge o Paraná com registros da doença em suas duas formas clínicas (Ministério da Saúde do Brasil, 2007). Só em 2007 notificou mais de 48.000 casos. Santa Catarina continua sem transmissão autóctone de Dengue, e registrou 420 casos importados, enquanto o Rio Grande do Sul notificou o seu primeiro caso confirmado de Dengue autóctone.

2. DENGUE – Os Vetores

Pertencentes à Família Culicidae, Subfamília Culicinae, Tribo Aedini e Gênero *Aedes* Meigen, 1818, os vetores que transmitem o vírus da Dengue são a espécie *A. aegypti*, nas Américas, embora seja oriundo do Velho Mundo, e *A. albopictus* na Ásia.

2.1. *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)

A. aegypti é uma espécie extremamente antropofílica que se adaptou perfeitamente ao ambiente urbano e aos recipientes artificiais dos domicílios e peridomicílios. Hábitos diurnos, alimenta-se e deposita seus ovos ao amanhecer, à tarde e à meia-noite (Forattini, 2002).

Este foi reconhecido em 1881 por Carlos Finlay como o transmissor da febre-amarela e em 1906, Brancoft o evidenciou como sendo também o vetor do vírus da Dengue (Sanchez, 1981).

Hoje é considerado o principal transmissor do vírus da Dengue nas Américas, embora seja oriundo do Velho Mundo (provavelmente da região etiópica, tendo sido originalmente descrito no Egito, o que lhe conferiu seu nome específico) (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

É responsável por frequentes epidemias e pela circulação dos quatro sorotipos do vírus no continente, estendendo-se do Uruguai ao sul dos Estados Unidos da América (WHO, 1997). Acredita-se que essa espécie invadiu as Américas durante a colonização e a escravidão, vinda da Europa a bordo de barcos que cruzaram o Atlântico em direção ao Novo Mundo.

2.2. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894)

Originalmente silvestre, das selvas asiáticas, habita ambientes naturais como bambus e bromélias, as quais podem ser consideradas recipientes naturais ou artificiais, dependendo da ação antrópica que elas exercem (bromélias domesticadas e bromélias domiciliadas) (Marques *et al.* 2001; Forattini & Brito, 2003). Contudo, já foi registrada a sua capacidade de habitar concomitantemente com *A. aegypti* na região domiciliar e peridomiciliar (latas, pneus, jarros com água, etc.) o que leva a acreditar na possibilidade deste interagir na transmissão da Dengue (Fantinatti *et al.* 2007).

A. albopictus é uma espécie de origem asiática, no entanto, surgiu no continente americano em 1985, colonizando-o rapidamente e ocupando locais urbanos, periurbanos, rurais e de mata atlântica (Pontes & Ruffino-Neto, 1994; Albuquerque *et al.* 2000; Urbinatti, 2004; Soares *et al.* 2008), convivendo e adaptando-se perfeitamente ao homem (Gomes *et al.* 2005). É responsável por transmissão de Febre-amarela urbana e silvestre, Dengue e encefalite nos países asiáticos e onde *A. aegypti* esteja ausente ou em baixa densidade (Monath, 1994). No entanto, no México foi registrada pela primeira vez sua infecção natural por DENV-2 e DENV-3 (Ibanez-Bernal *et al.* 1997) e no Brasil por DENV-1 (Serufo *et al.* 1993). No Brasil não é considerado vetor das doenças supracitadas, apesar de laboratorialmente ter sido comprovado sua capacidade de transmitir o DENV-2 (Castro *et al.* 2004).

2.3. Biologia e Morfologia dos estágios de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)

O mosquito *A. aegypti* apresenta desenvolvimento por metamorfose completa (holometabolía) e o seu ciclo de vida é composto por quatro fases: ovo, larva (1º a 4º instar), pupa e indivíduo adulto (dimorfismo sexual). O ovo, a larva e a pupa pertencem ao mesmo ecótopo, pois são as fases aquáticas do ciclo de vida do mosquito (FIGURA 01).

i) OVO

Morfológicamente, os ovos de *A. aegypti* medem cerca de 1 mm de comprimento, são elípticos, alongados e fusiformes. No momento da postura são brancos, no entanto, adquirem coloração enegrecida e tonalidade brilhante após algumas horas (Funasa, 2001).

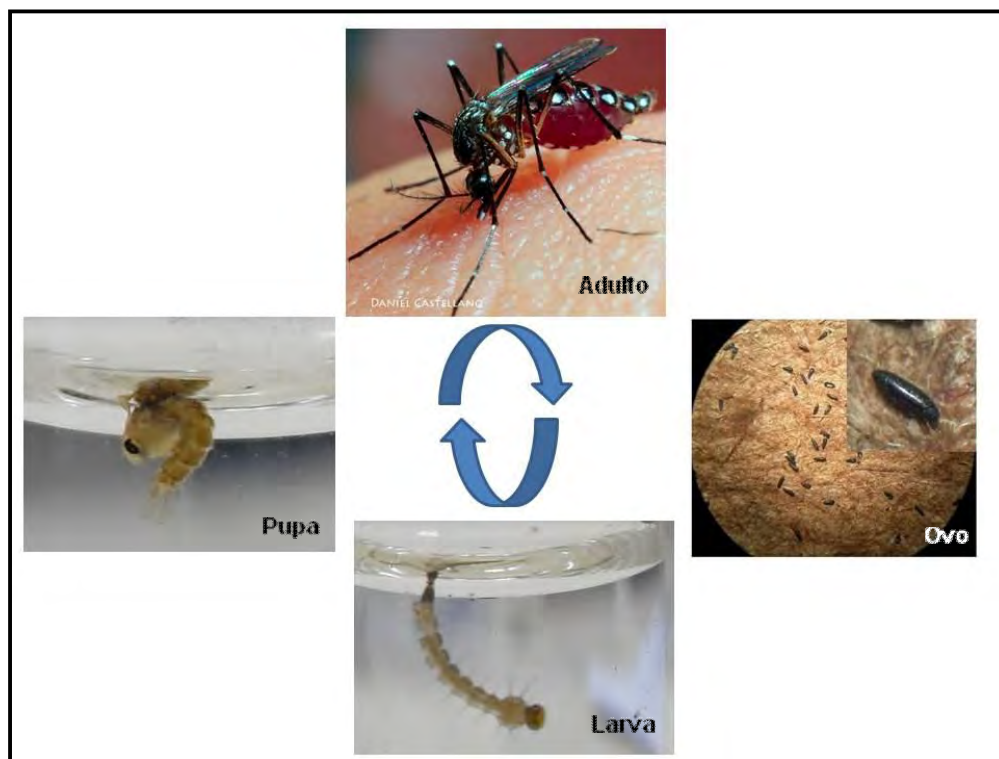


FIGURA 01 – Ciclo biológico do *Aedes aegypti*. Após a postura dos ovos isolados e fora d'água nas paredes dos recipientes, as larvas eclodem e passam por quatro estágios, transformam-se em pupas e destas ocorre a emergência do adulto. Fonte: A autora.

A oviposição é realizada nos mais diferentes substratos, desde as paredes ásperas, umedecidas e escurecidas dos recipientes – em condição natural -, como também pode ser diretamente na água dependendo do tipo de recipiente, como o vidro, por exemplo, apesar de ser mais raro (Forattini, 2002) ou também podem as fêmeas ovipositarem em papel sulfite, filtro, manteiga e toalha – sob condições laboratoriais – (Gomes *et al.* 2006).

O número de postura está diretamente relacionado com a quantidade de sangue ingerido, onde cerca de 3,5mg é quantia suficiente para considerar o repasto como completo e ideal para o desenvolvimento ovariano. Sob esse aspecto, uma fêmea produz cerca de 120 ovos por postura. Sob condições favoráveis como temperatura e umidade, o embrião está apto a eclodir por volta de 4 a 7 dias. Estando completamente amadurecido, o ovo resiste às situações adversas como dessecação, baixa de temperatura, insolação, proporcionando a diapausa dentro do ovo. Assim, este resiste meses ou anos no ambiente, só eclodindo ao contanto com a água (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Existem fatores genéticos e bioquímicos que favorecem esse mecanismo de resistência, como a formação de uma cutícula serosa constituída por quitina e a existência de expressão gênica relacionada tanto com a produção de quitina quanto de lipídeos importantes para o processo de impermeabilização (Rezende *et al.* 2008). Por outro lado, a temperatura é um outro fator que influencia nomeadamente na viabilidade do ovo e no processo de embriogênese de *A. aegypti* (Farnesi *et al.* 2009).

Essa característica de resistir à dessecação, sobreviver por meses ou até mesmo anos, torna o mosquito *A. aegypti* importante epidemiologicamente falando, pois possivelmente estes foram determinantes que fizeram com que se disseminasse às amplas áreas geográficas e se tornasse um obstáculo no que diz respeito a seu controle.

ii) LARVAS

As larvas, morfologicamente, são alongadas, vermiformes, esbranquiçadas. O corpo é formado por cabeça, tórax e abdome. A cabeça possui um par de antenas, olhos compostos e alguns ocelos e aparelho bucal mastigador-raspador. O tórax é globoso, mais largo que a cabeça com segmentos fundidos e revestidos por cerdas. No oitavo e último segmento localiza-se o sifão respiratório (curto, grosso e escuro) (Lozovei, 2001). São exclusivamente aquáticas, vivendo nos mais variados ecossistemas aquáticos, desde pântanos a recipientes antrópicos. Portanto, habitam quaisquer locais que possam acumular água e podendo desta forma, enfrentarem as mudanças rápidas na salinidade (Donini *et al.* 2007). De vida livre, representam os períodos de alimentação e crescimento do mosquito. Alimentam-se de partículas orgânicas presentes na água, alguns tipos de algas (Ahmad *et al.* 2001) e a filtração é a forma mais comum de alimentação, podendo filtrar 2 litros de água por dia (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Seu ciclo de vida compreende 4 estágios ou instares (L1-4). O primeiro instar (L1) rompe o ovo através de um dente quitinoso, existente apenas nessa fase larval. A durabilidade dessa fase depende de fatores, tais como temperatura da água, densidade populacional no criadouro e disponibilidade de alimento. O quarto instar (L4), estando na sua fase final de desenvolvimento, cessa a alimentação, em virtude da sua metamorfose ao próximo estágio de vida – a pupa – o qual não se alimenta mais. O seu completo desenvolvimento leva em 8 a 10 dias e é influenciado pela temperatura, luminosidade, salinidade, poluentes orgânicos e inorgânicos, entre outros (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Forattini, 2002).

iii) PUPA

Este é o estágio de vida que representa a transição do indivíduo do meio aquático para o terrestre (Forattini, 2002). A pupa não se alimenta, tornando-se quiescente (Ruppert & Barnes, 1996), pois esta sofre mudanças tissulares, devido ocorrer metamorfose para o indivíduo adulto. Desenvolve-se totalmente em dois dias. Tem aspecto de “vírgula” em virtude de a cabeça unir-se ao tórax, formando o cefalotórax. Normalmente fica parada na superfície da água. No entanto, quando perturbada move-se com bastante agilidade.

Seu corpo tem coloração esbranquiçada semelhantemente à larva, porém, à medida que se aproxima da transformação em adulto, adquire coloração escura. Respiram por trombetas localizadas no cefalotórax que atravessam a superfície da água.

iv) ADULTOS

Os espécimes adultos medem de 3 a 6 mm de comprimento. Apresentam coloração escura com faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais e um “desenho em forma de lira” no mesonoto (*A. aegypti*). Apresentam antenas plumosas nos machos e com palpos mais longos; e pilosa nas fêmeas, característica que os diferem morfológicamente. As fêmeas adultas são hematófagas obrigatórias. Necessitam de sangue para maturação dos ovos. Apresentam aparelho bucal picador, embora também se alimentem de seivas de plantas, enquanto os machos possuam aparelho bucal tipo sifonador-sugador (Forattini, 2002).

3. DENGUE – Controle dos Vetores: Um Breve Histórico

Criada em 1913 por iniciativa do milionário John D. Rockefeller, A Fundação Rockefeller teve como objetivo implantar em vários países medidas sanitárias baseadas no modelo americano, com a prioridade de empreender o controle internacional da febre amarela e da malária. Em 1916, diagnosticou no Brasil uma carência de sólida base científica para suporte de políticas públicas consistentes; ausência de treinamento médico quanto a questões de saúde pública e de carreiras especializadas e de organizações sanitárias estáveis e abrangentes.

Dos anos 20 aos 40, tornou-se a primeira instituição a iniciar campanhas na América Latina, nomeadamente no Brasil, objetivando eliminar hospedeiros hematofágos transmissores de doenças, já que não era possível “erradicar as doenças” (Löwy, 1999). Assim, no Brasil desenvolveram-se programas de controle ao vetor *A. aegypti*, quando epidemias de febre-amarela conduziram à morte de milhares de pessoas, pois a Dengue ainda não era um problema relevante de Saúde Pública.

Também como consequência de a dengue ter se tornado uma das doenças de grande relevância em termos de Saúde Pública e ter re-aparecimento nas Américas no século passado (Pinheiro & Corber, 1997), a Organização Panamericana de Saúde (OPAS) junto com a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1947, decidem coordenar os programas de “erradicação” ao mosquito, em todos os países latino-americanos, através do Programa de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa), resultando na eliminação do inseto em quase toda a América (Soper, 1965).

O Brasil foi bem sucedido na primeira eliminação do vetor em 1955, porém 14 anos depois, confirmou-se a sua reintrodução no país. Novos esforços foram iniciados pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM) e em 1973 este culicídeo é considerado erradicado. Passados 3 anos, porém, tem-se registro do mosquito no Brasil devido a falhas na vigilância epidemiológica e a mudanças sócio-ambientais em virtude da urbanização acelerada da época (Braga & Valle, 2007 [a]).

No início da década de 90, o Ministério da Saúde Brasileira cria a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), responsável pela coordenação de ações de controle da doença. Após seis anos, é elaborado um plano de erradicação do mosquito – o PEAa – cuja preocupação estava voltada para os casos graves da doença.

Aliado a outros ministérios, o PEAa atuava nas áreas de entomologia, operações de campo de combate ao vetor, vigilância de portos, aeroportos e fronteiras, saneamento, informação e campanhas educativas à sociedade, vigilância epidemiológica e entomológica (coleta de larvas ou pesquisa larvária), suporte laboratorial etc., porém, apesar de tantos esforços os casos da doença continuavam aumentando (Funasa 2001).

Ao final dos anos 90 e início dos anos 2000, abandonaram-se oficialmente as metas de erradicação do vetor, pois percebeu-se que não era possível erradicá-lo a curto prazo, e passou-se a atuar em seu controle. Após introdução do DENV-3 e sua rápida disseminação pelo país em curto espaço de tempo, foi então, em 2002, criado o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), órgão que veio substituir o antigo PEAa. Este responsabilizou-se a dar continuidade às propostas antigas da FUNASA/PEAa, porém com uma visão voltada às experiências passadas nacionais e internacionais de controle da dengue. Aperfeiçoando e direcionando o foco de interesse para ações que combatessem o vetor, minimizassem a utilização de inseticidas, destruíssem os potenciais criadouros em imóveis comerciais, casas abandonadas, etc. (Funasa, 2002).

Não existindo uma vacina que confira imunidade permanente aos quatro sorotipos da dengue (DENV 1-4) nem as suas variações genéticas, a principal medida de combate à doença é mesmo o controle vetorial (Hombach, 2007; Periago & Guzmán, 2007). Assim, para tanto, no controle vetorial usam-se inseticidas químicos, tanto organofosforados, como o temefós, que atua no estágio larval, e os piretróides, como as cipermetrinas, delatcipermetrinas, que atuam na fase adulta do inseto. Existem, assim, três tipos de tratamentos químicos: a) tratamento focal, b) tratamento perifocal e c) aplicação espacial de inseticida a ultra-baixo volume (UBV). O primeiro consiste na aplicação de um larvicida (temefós, BTi, metoprene – aprovados pela OMS) nos depósitos positivos que contém água de consumo humano, mas que não podem ser eliminados mecanicamente. O segundo modo de tratamento consiste na aplicação de inseticida nas paredes externas de depósitos, manualmente por aspersão, atingindo o mosquito adulto. É complementar ao tratamento focal (Lima & Aragão, 1987; Funasa, 2001). O terceiro e último tipo de tratamento é um método que faz uso de um veículo motorizado – “fumacê”, o qual por meio de uma bomba compressora com vazão de 127mL / min. a uma velocidade de cerca de 10 Km / h, propicia a formação de uma “nuvem” de suspensão com inseticida malatião e óleo vegetal (1:1) que atinge até 5 metros de altura, perdurando cerca de 3 horas, cujo alvo é o mosquito adulto durante o voo (Machado, 2000).

Essa dependência aos químicos para o combate ao mosquito vetor tem sido a tática mais abordada por anos com pouco ou nenhum impacto na redução dos casos da doença.

Diante da utilização desta estratégia, observou-se o surgimento de alterações da susceptibilidade do *A. aegypti* a estes produtos em vários países como: Venezuela (Rodríguez e tal. 2001), nas Ilhas do Caribe (Rawlins, 1998), Singapura (Ping *et al.*, 2001), Vietnam (Kawada *et al.* 2001), Cuba (Rodríguez *et al* 2002, 2005), Peru (Chávez *et al.*, 2005), Tailândia (Ponlawat *et al.*, 2005), Argentina, Bolívia (Biber *et al.*, 2006), México (Flores *et al.*, 2005, 2006) e em partes do território brasileiro (Lima *et al.* 2003; Macoris *et al.* 2003; Braga *et al.* 2004; Luna *et al.* 2004; Lima *et al.* 2006 [a]; Beserra *et al.* 2007).

Assim, o Ministério da Saúde do Brasil ao implantar o PNCD (Programa Nacional de Controle da Dengue), começou então, a coordenar um programa integrado que monitorasse a resistência a inseticidas em *A. aegypti* – o MoReNAa – Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas. Esta rede se propõe a agregar um determinado número de laboratórios – os chamados laboratórios de referência – que realizem provas biológicas, usando bioensaios e ensaios bioquímicos, os quais monitorem a susceptibilidade do mosquito aos organofosforados e piretróides. A partir das observações dos resultados destes ensaios, pode-se definir novas estratégias de controle ao *A. aegypti*. Uma delas foi a substituição do temefós pelo biolarvicida *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) em 2001, nos Estados brasileiros que apresentaram resistência do mosquito ao inseticida (Braga & Valle, 2007 [b]).

Uma outra alternativa de controle que está sendo muito investigada nos últimos anos, além de inseticidas biológicos e reguladores de crescimento, é o uso de compostos semioquímicos provenientes de extratos naturais e de óleos essenciais de plantas (Trumble, 2002). Estes compostos, uma vez extraídos e identificados por tecnologias apropriadas (Logan & Birkett, 2007), são testados em condições laboratoriais em formas adultas e larvais dos mosquitos transmissores de doenças, nomeadamente *A. aegypti*, e os resultados encontrados são verdadeiras “armas” com propriedades antimicrobianas (fungicidas, bactericidas e antileishmanial), larvicidas, atuando também como atrativos ou repelentes destes insetos (Ansari *et al.* 2005; Kamaraj *et al.* 2008; Costa *et al.* 2009).

4. DENGUE – Resistência dos Vetores a Inseticidas

O uso de inseticidas foi uma das medidas mais utilizadas contra os vetores por décadas. O que levou as populações de mosquito a uma intensa pressão de seleção, podendo gerar indivíduos capazes de tolerar doses que normalmente causariam mortalidade a indivíduos susceptíveis (Lima *et al.* 2003).

Dentre estes químicos destacam-se os organoclorados que atuam no canal de sódio-potássio nas membranas dos axônios (D'Amato *et al.* 2002); os organofosforados e os carbamatos que inibem a Acetilcolinesterase (Ache), e os piretróides que semelhantemente aos organoclorados atuam nos canais de sódio, porém retardando o fechamento destes após passagem do impluso, mantendo-os abertos (Bisset 2002).

Como consequência dessa intensa utilização de inseticidas, observou-se que em 1946, o número de insetos importantes à Saúde Pública resistentes a estes produtos era de apenas 2, em 1962 eram 81 e seis anos depois esse número aumentou para 102 (WHO, 1970; 1992). Nos anos 80 aumentou para 150 e na década de 90 já eram mais de 500 (Georghiou & Lagunes-Tejeda, 1991). Até Agosto de 2007 este número havia aumentado para 553 insetos resistentes a um ou mais inseticidas (Whalon *et al.* 2008).

Destes, mais de 100 eram mosquitos, dos quais 56 eram anofelíneos e 39 culicídeos. Dos culicídeos, 21 são espécies do gênero *Aedes* resistentes a 16 tipos de inseticidas (Fonseca & Quiñones, 2005). Em mosquitos *Aedes* a resistência foi observada, pela primeira vez em 1947 ao DDT em espécimes de *Aedes taeniorhynchus* Wiedemann, 1821 e *A. sollicitans* Walkers, 1856, na Flórida (Brown, 1986). O que mostra que o amplo uso de inseticidas químicos tem levado ao desenvolvimento da resistência, como um resultado de seleção de certos genes.

Confirmando este dado, Pridgeon *et al.* 2008 selecionaram, aleatoriamente, 19 inseticidas dos muitos listados no Comitê de Ação a Resistência a Inseticidas (IRAC) e avaliaram suas atividades contra três espécies de mosquitos, entre eles *A. aegypti*. Demonstraram que esta espécie apresentava diferentes susceptibilidades aos vários pesticidas, e que para ter sucesso nos programas de controle vetorial, urgentemente, se faz necessário encontrar compostos mais eficientes às espécies susceptíveis.

Entretanto, existem alguns fatores que influenciam, nos insetos, a evolução da resistência aos inseticidas. Estes referem-se à genética da resistência, à biologia, à ecologia do inseto e ainda à execução de medidas operacionais utilizadas (Georghiou & Taylor, 1986).

Os fatores genéticos da resistência dizem respeito, especialmente, à presença e à frequência na população de alelos que conferem resistência (Georghiou & Taylor, 1986). Sendo, portanto, a resistência uma característica herdada e estabelecida por alelos os quais podem ser recessivos, dominantes ou co-dominantes (Brown, 1986). Já os fatores bio-ecológicos referem-se, sobretudo, ao ciclo de vida e a ecologia do inseto, pois estes aspectos podem alterar a resposta da seleção que conduz a resistência. Ou seja, quanto maior o número de gerações por ano, mais rápida será a evolução da resistência. Finalmente, os fatores operacionais são aqueles relacionados com a aplicação dos pesticidas e estão sob o controle do homem. Relacionam-se com o tempo, a dose e a formulação do inseticidas a serem usados (Georghiou & Taylor, 1986) (TABELA 1).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a resistência a inseticidas é a capacidade de uma população de insetos tolerar doses de um determinado inseticida, as quais exerceriam uma ação letal sobre a maioria dos indivíduos de uma população normal da mesma espécie. E de acordo com Miller 1988, classifica-se em (1) resistência por comportamento (quando o inseto não entra em contato com o inseticida); (2) resistência por penetração (quando a composição do exoesqueleto do inseto modifica-se inibindo a penetração do inseticida); (3) resistência do sítio-alvo (quando o sítio químico de ação do inseticida modifica-se reduzindo a sensibilidade da forma ativa do inseticida e este não se liga ao sítio-alvo); e (4) resistência metabólica (a via metabólica do inseto é modificada detoxificando, por meio de enzimas, a ação do inseticida ou impedindo a metabolização do composto em sua forma tóxica).

De entre estes, os mecanismos mais importantes nos insetos são o sítio-alvo e a resistência metabólica (Bisset, 2002).

TABELA 1: Fatores que influenciam o surgimento da resistência a inseticidas nos insetos segundo Georgiou & Taylor, 1986.

1. Genéticos	frequência de alelos R (Resistentes)
	número de alelos R
	dominância dos alelos R
	penetração, expressividade e interações dos alelos R
	resistência conferida por outros inseticidas
	boa introdução ao genoma da resistência
2. Bio-ecológicos	I. Bióticos
	múltiplas gerações em períodos curtos
	indivíduos por geração
	monogamia, poligamia e partenogênese
	II. Comportamento/Ecologia
	isolamento, mobilidade e migração
	monofagia, polifagia
	sobrevivência acidental e refúgio
3. Operacional	I. Produto químico
	característica do pesticida
	relação com o produto utilizado anteriormente
	efeito residual do pesticida e formulação
	II. Aplicação
	limiar da aplicação
	seleção do limiar do pesticida
	foco da aplicação (larva ou adulto)
	modo de aplicação
	tempo selecionado para a aplicação
	produto alternativo

5. Produtos de Origem Botânica - Atividade Inseticida

A utilização de plantas e dos seus derivados, pelo homem, como inseticida data há muitos anos. Como por exemplo, Roark, 1947 in Shaalan *et al.* 2005 [a], já descrevia cerca de 1.200 espécies de plantas apresentando esse potencial.

Desta forma, enfatiza-se que produtos de origem botânica surgem como alternativa promissora de controle de vetores, após serem preteridos em meados das décadas de 1930 a 1950 com a descoberta dos inseticidas químicos e sintéticos (organocloranos, organofosfatos, carbamatos e piretróides). Os produtos à base de plantas, além de terem efeito inseticida comprovado, apresentam uma diversidade de compostos ativos, os quais agem sinergicamente, apresentando características atraentes, desalojantes ou repelentes que poderiam ser empregados em sistemas de manejo integrado de pragas, como alternativas dirigidas para controle e monitoramento das populações de mosquitos (Isman, 2006; Navarro-Silva *et al.*, 2009).

6. Composição Química das Plantas

Normalmente as plantas apresentam em sua composição química metabólitos primários e secundários. Os primeiros são encontrados em todas as células vegetais e são importantes para o desenvolvimento da planta. Já os segundos são produzidos pelas plantas como forma de proteção aos microrganismos e insetos predadores (Raven, 2001) caracterizados por suas propriedades aromáticas (Girard, 2005) e são candidatos naturais para o descobrimento de novos produtos que possam ser utilizados no controle de *A. aegypti* (Cavalcanti *et al.* 2004).

De entre os metabólitos secundários destacam-se os óleos essenciais. Estes são substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas extraídas das folhas, flores, frutos, caules e raízes, com aparência oleosa à temperatura ambiente (Simões & Spitzer 2000). Geralmente, apresentam-se como misturas de substâncias químicas de natureza terpênica, incluindo seus derivados alcoólicos e aldeídicos. Comercialmente, são usados na indústria farmacêutica, na indústria cosmética e como inseticidas (Girard, 2005; Shaalan *et al.* 2005 [a]).

A utilização de plantas e de produtos preparados a partir de seus constituintes, tais como extratos e óleos essenciais, contra culicídeos tem aumentado nos países industrializados, inclusive no Brasil. E por ser um país com uma flora rica e diversa, este tipo de estudo vem se desenvolvendo largamente.

Se formos observar os achados na literatura envolvendo publicações que utilizaram óleos essenciais percebe-se o quanto é vasta esta abordagem e observamos a eficácia destes como alternativa de controle contra mosquitos. Pois estes apresentam compostos biodegradáveis, produtos não tóxicos e potencialmente adequados para utilização no controle de larvas de mosquito (Amer & Mehlhor, 2006 [a]).

Diante do imenso número de trabalhos envolvendo os extratos e os óleos essenciais extraídos de diferentes partes das plantas, serão exemplificados resumidamente, aqueles que nos últimos sete anos fizeram uso, nomeadamente, dos óleos essenciais sobre os diferentes tipos de organismos e seus estágios de vida para enfatizar a importância desta nova abordagem científica no estudo do controle de vetores transmissores de doenças.

Exemplificando a ação inseticida de óleos essenciais não apenas a dípteros, mas a outras classes de insetos, Tellez *et al* 2002 investigaram a ação do óleo de *Lepidium meyenii* (Walp.) (Brassicaceae) contra térmitas (Insecta: Isoptera) e este demonstrou ser um inibidor de alimentação para estes insetos.

No ano seguinte, Carvalho *et al.* 2003 analisaram o óleo essencial de brotos de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) a fim de investigar a sua atividade larvívica contra *A. aegypti*. Os autores encontraram forte atividade larvívica, pois o mesmo causou mortalidade em 100% das larvas quase que instantaneamente na concentração de 0,017% de timol, princípio ativo encontrado em sua composição química.

Cheng *et al.* 2004, em estudo pioneiro com a espécie *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh (Lauraceae), analisaram a atividade larvívica e composição química do seu óleo essencial contra larvas de *A. aegypti*. Os autores evidenciaram que esta espécie apresentou monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos em sua constituição química e CL₅₀ variando entre 36 a 177 µg/mg dependendo do tipo químico analisado.

Prajapati *et al.* 2005 avaliaram as atividades inseticida e repelente e o efeito inibidor na oviposição dos óleos essenciais extraídos de diferentes partes de 10 plantas medicinais, entre cascas, sementes, brotos, rizomas, frutos e folhas, contra *A. aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus*. No que diz respeito a atividade larvívica e ovívica, os óleos de *Juniperus macropoda* Boiss (Cupressaceae) e *Pimpinella anisum* L. (Apiaceae) tiveram uma elevada potencialidade contra as três espécies de mosquitos. Na ação inibitória de oviposição destacou-se *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). Quando analisadas conjuntamente as ações de repelência e adulticida os óleos de *Cyperus scariosus* (Cyperaceae), *J. macropoda* Boiss, *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae) e *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae) obtiveram melhores resultados. No entanto, quando analisadas separadamente, na ação repelente destacaram-se os óleos de *C. zeylanicum* Blume, *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) e *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae).

Já abordando apenas análise adulticida, *C. zeylanicum* foi o que apresentou maior potencial. Assim, demonstra-se que tanto isoladamente quanto de forma sinérgica, compostos bioativos podem agir sob diversas maneiras e em diferentes espécies de mosquitos.

Chaiyasit *et al.* 2006 estudaram a eficácia dos óleos essenciais extraídos dos frutos, sementes e rizomas de *Apium graveolens* L. e *Carum carvi* L. (Umbelliferae), *Curcuma zedoaria* Roscoe (Zingiberaceae), *Piper longum* L. (Piperaceae) e *Illicium verum* Hook (Illiciaceae) contra populações de mosquitos adultos de *A. aegypti* na Tailândia, e encontraram CL₅₀ de 5,96; 5,44; 5,94; 6,21 e 8,52 µg/mg, respectivamente, concluindo que os óleos essenciais destas cinco espécies mostraram potencial adulticida contra os mosquitos, sugerindo o desenvolvimento de estratégias para o controle principalmente onde existem mosquitos resistentes a piretróides.

Tiwary *et al.* 2007 registraram a atividade larvívica do óleo essencial extraído das sementes de *Zanthoxylum armatum* DC (Rutaceae) contra *A. aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus*, mostrando que de entre as três espécies a que exibiu maior sensibilidade ao óleo foi *C. quinquefasciatus*, seguido de *A. aegypti* e *A. stephensi* com CL₅₀ de 49, 54 e 58 ppm, respectivamente. Sugerindo assim, o uso deste para controle de larvas de mosquitos.

Costa *et al.* 2008 [a] analisaram a composição química e a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais extraídos de folhas de *Guatteriopsis* spp. (atualmente incluído no grupo *Guatteria* [Erkens & Maas 2008]) e encontraram mono e sesquiterpenos na composição química e atividade antimicrobiana contra fungos (*Candida albicans*) e bactérias (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermides*, etc.). O que indica que os produtos derivados de plantas podem ser usados e se obtêm diferentes respostas a diferentes organismos. Finalmente, Autran *et al.* 2009 analisaram a composição química do óleo essencial das folhas, sementes e inflorescências de *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae), assim como a sua atividade larvívora e sua influência no processo de oviposição de *A. aegypti*. Os autores encontraram mono e sesquiterpenos nos óleos, o que indica atividade larvívora cujas CL₅₀ das folhas, sementes e inflorescências foram de 23,8 ppm, 19,9 ppm e 19,9 ppm, respectivamente. A oviposição foi alterada nas concentrações de 50 e 100 ppm, o que é vantajoso, pois poderia ser usado na construção de armadilhas para capturar ovos, mesmo que estes não fossem afetados, porém o desenvolvimento do adulto seria evitado.

Foram apresentados os efeitos dos óleos essenciais de diferentes plantas, suas partes e diferentes famílias, para demonstrar que esses derivados de plantas podem exibir vários graus de toxicidade para mosquitos e outros organismos.

A seguir serão apresentadas algumas particularidades das famílias botânicas Annonaceae, Boraginaceae e Myrtaceae, as quais exibem interesse inseticida e foram investigadas neste estudo.

a) Família Annonaceae

A Família Annonaceae compreende aproximadamente 200 gêneros com 2500 espécies de distribuição tropical e subtropical (Doyle & Thomas, 1997). Este grupo de plantas tem reconhecida importância econômica, devido a comercialização de seus frutos e de seus produtos derivados, e sua atividade farmacológica como matéria-prima de cosméticos e perfumaria, uso na medicina natural, além de apresentar atividade antimicrobiana e inseticida devido a presença de acetogeninas (Isman, 2006).

Dentro desta família encontra-se o gênero *Guatteria* Ruiz & Pav., com aproximadamente 290 espécies distribuídas na Mesoamérica, Caribe e América do Sul (Erkens & Mass, 2008) sem nenhum estudo em relação a atividade inseticida. De entre o gênero *Guatteria* encontram-se *G. blepharophylla* Rodriguez, *G. friesiana* R.E. Fries. e *G. hispida* Martius (FIGURA 02), distribuídas nas Américas Central e do Sul. São popularmente conhecidas com “envireira” e são utilizadas como fonte de matéria-prima nas indústrias farmacêutica e cosmética.

Quimicamente são constituídas por alcalóides, carboidratos, lipídeos, aminoácidos, proteínas, polifenóis, terpenos, compostos aromáticos e acetogeninas (Alali *et al.* 1999), destacando-se o óxido cariofileno, o α -eudesmol, γ -eudesmol e o α -eudesmol, os quais apresentam atividade antimicrobiana, possivelmente por ação sinérgica, segundo Costa, *et al.* 2008 [a].

Devido ao histórico do potencial biológico da Família Annonaceae e dos antecedentes de atividade antimicrobiana apresentados no trabalho de Costa *et al.*, 2008 [a], assim como a composição química dos óleos essenciais destas três espécies, levantou-se a hipótese de um possível efeito inseticida levando-se a esta investigação.

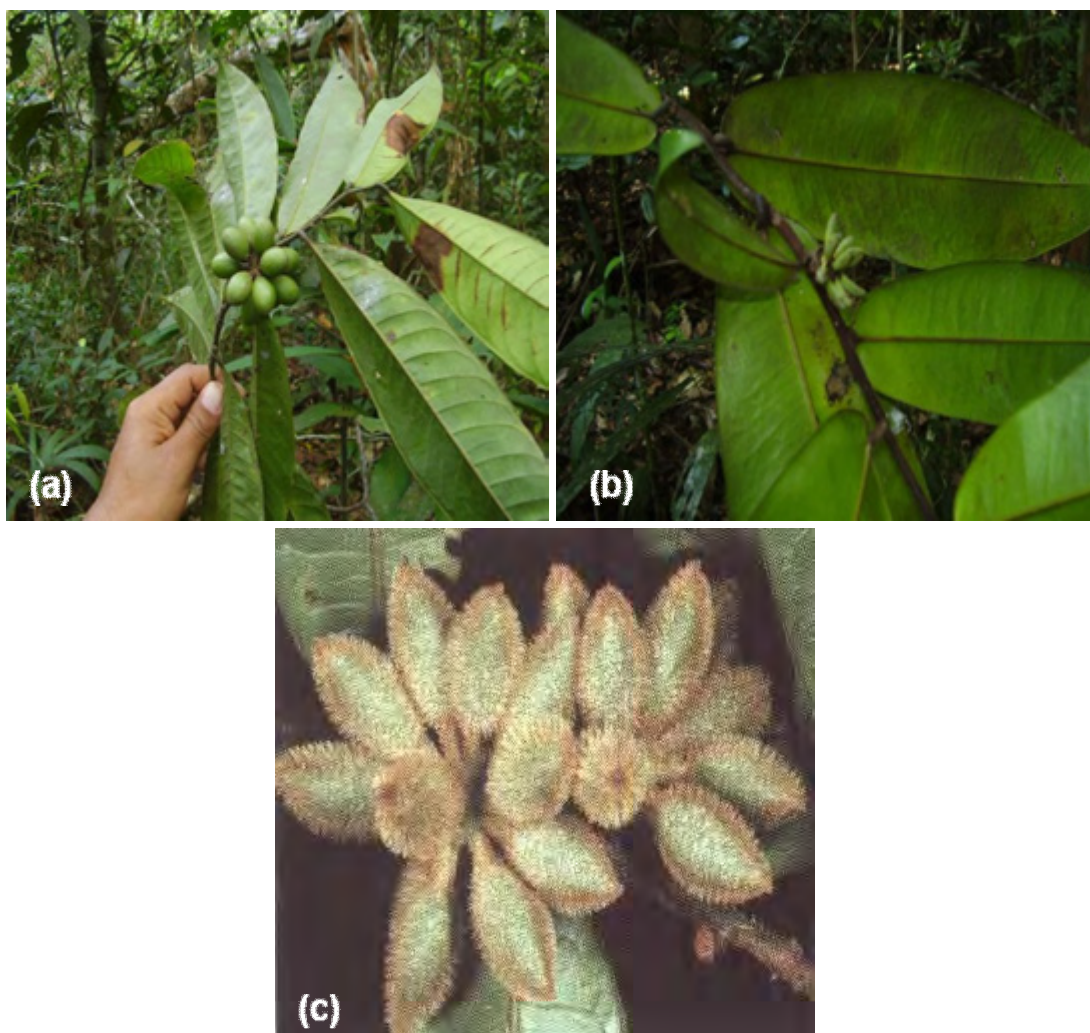


FIGURA 02 - Ramos de (a) *Guatteria blepharophylla*, (b) *G. friesiana* e (c) *G. hispida*. FONTE: Dr. Emmanoel Villaça Costa.

b) Família Boraginaceae

É uma família de grande riqueza de espécies, reunindo cerca de 130 gêneros e 2.500 espécies que distribuem-se nos trópicos e regiões temperadas. No Brasil, engloba 9 gêneros e 150 espécies sendo o gênero *Cordia* L. o melhor representado no país. Apresenta-se como arbustos ou árvores (Akisue *et al.* 1983; Melo & Lyra-Lemos, 2008).

Cordia é um dos mais importantes gêneros desta família e suas plantas são reconhecidas na medicina popular, por atuarem como agentes cicatrizantes, diuréticos, antialérgicos, antiinflamatórios, além de apresentar atividade larvívora, pois, quimicamente, apresentam em sua composição diterpenos, sesquiterpenos, flavonoides (Oliveira 2002; Costa *et al* 2008 [b]).

Cordia curassavica (Jacq.) Roem. & Schult. (FIGURA 03), cujo sinônimo nomenclatural é *C. verbenacea*², encontra-se desde a América Central até ao Sul do Brasil (amplamente distribuída na Amazônia até o Rio Grande do Sul - de 500 a 1000 metros do litoral), podendo atingir até 3 metros de altura. Seu óleo essencial apresenta um forte odor característico (mas não desagradável) em virtude da presença de pineno e mirceno. Vulgarmente é reconhecida por diversos nomes, no entanto, “erva-baleeira” é o mais comum. É utilizada na medicina popular por seu potencial poder anti-inflamatório devido à elevada concentração de bioflavonóides (Arrebola *et al.* 2004; Lapa, 2006).

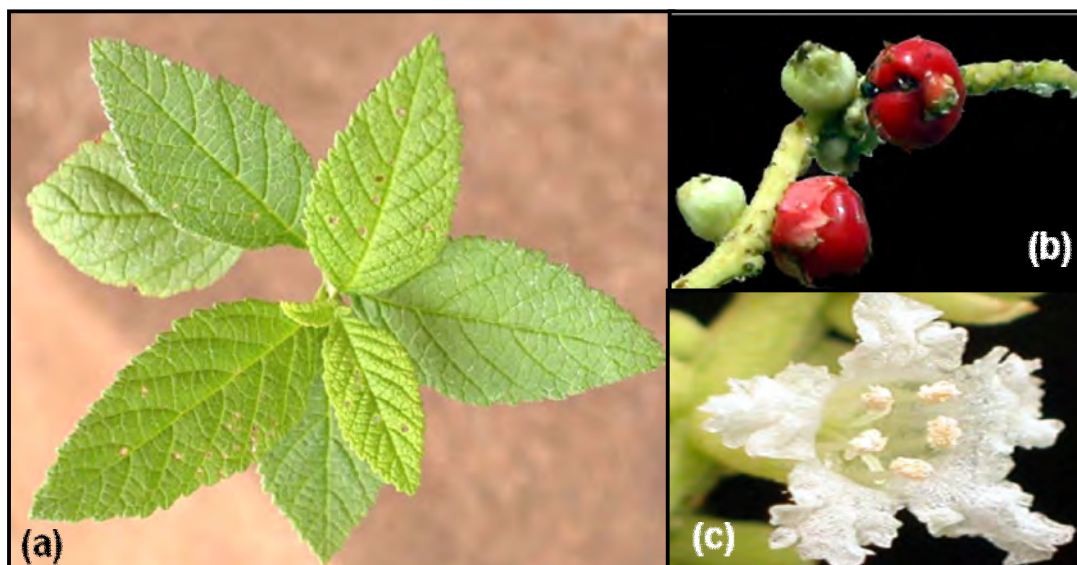


FIGURA 03 – (a) Aspecto geral da folha de *Cordia curassavica*, (b) seus frutos e (c) sua flor pentâmera. FONTE: Araujo, 2007, modificado.

c) Família Myrtaceae

É uma das mais importantes famílias de angiospermas no Brasil dominante na Mata Atlântica. É constituída por cerca de 3.500 espécies de plantas, distribuídas em 100 gêneros, dispersas nas regiões tropicais e subtropicais, sendo uma das mais importantes do neotrópico. No Brasil acredita-se que possam ocorrer aproximadamente 1.000 espécies (Landrum & Kawasaki, 1997).

² *Cordia curassavica* e *C. verbenacea* são nomes sinónimos para a mesma espécie.

Em virtude da sua ampla diversidade é utilizada, dependendo do gênero e da espécie, na medicina devido as suas diversas propriedades terapêuticas, como antiinflamatória, antidiarréica, antisséptica das vias urinárias, antioxidante, etc.

Embora, poucos são os estudos etnomedicinais, fitoquímicos e farmacológicos existentes sobre essa importante família (Cruz & Kaplan, 2004; Ramos *et al.* 2007). É reconhecida pelo seu grande potencial de produzir óleos essenciais de interesse econômico.

Na literatura registra-se a relevância desta família frente as diversas ações de suas inúmeras espécies. Como por exemplo, cita-se o gênero *Eugenia* com *E. stipitata* McVaugh ssp. *sororia* devido ao seu poder antimicrobiano (Medeiros *et al.* 2002) e os gêneros *Eucalyptus* e *Pimenta* com atividade larvícida (Lee, 2006; Cheng *et al.* 2008).

O gênero *Pimenta* Lindl. é economicamente importante na Bolívia, onde os frutos de algumas espécies são utilizados como condimento. Este gênero possui 14 espécies, sendo distribuídas desde as Antilhas e o sudeste do México até o Brasil e a Bolívia (Killen *et al.* 1993 in Girard, 2005).

Pimenta pseudocaryophyllus, popularmente conhecida como “craveiro-do-mato”, “louro-cravo” (FIGURA 04), é a única espécie pertencente ao gênero *Pimenta* que ocorre no Brasil (Cardoso & Sajo, 2006) e já teve seu potencial microbiano testado (Lima *et al.* 2006 [b]). Por isso, levantou-se a hipótese desta espécie vegetal, talvez, apresentar atividade inseticida.



FIGURA 04 – (a) Aspecto geral de *Pimenta pseudocaryophyllus* em seu habitat natural e (b) detalhes das folhas. FONTE: Eduardo Aguiar Girard e Dr. Palímécio Guerrero-Júnior, respectivamente.

Portanto, com base nos aspectos relatados anteriormente, as Famílias Annonaceae, Boraginaceae e Myrtaceae apresentam indícios que incitam à investigação de possíveis atividades inseticidas de *Guatteria* spp, *Cordia curassavica* e *Pimenta pseudocaryophyllus* sobre larvas de *A. aegypti*.

O uso de inseticidas químicos foi a estratégia encontrada há muitos anos com a finalidade de combater os mosquitos vetores da dengue, sobretudo *A. aegypti*, em todo o mundo, o que não é muito diferente nos dias atuais. Esta prática levou ao surgimento de alterações da susceptibilidade da espécie a estes produtos. Assim, os inseticidas passaram a selecionar as populações resistentes de mosquitos, já que a resistência é uma característica genética que pode ser herdada até a décima geração dos mesmos.

Muitos são os estudos utilizando inseticidas específicos como os organofosforados e piretróides para as formas larvais e adultas, respectivamente e, no entanto, já se tem conhecimento da resistência aos produtos químicos em grande parte do território brasileiro e em outras partes do mundo.

Assim, para contornar este problema, a proposta deste trabalho justifica-se, sobretudo, por buscar uma diferente alternativa de controle vetorial na expectativa de conseguir outros compostos, a partir de derivados de plantas, como os óleos essenciais, que apresentem atividade inseticida que possam diminuir a dependência dos produtos químicos convencionais.

Por pertencerem a famílias que têm suas propriedades inseticidas reconhecidas, levantou-se a hipótese destas espécies de plantas *Guatteria blepharophylla*, *G. friesiana*, *G. hispida*, *Cordia curassavica* e *Pimenta pseudocaryophyllus* poderem desempenhar um importante papel no controle de *A. aegypti*. Assim, neste trabalho será explanada a atividade inseticida dos óleos essenciais das plantas *Guatteria* spp. (Annonaceae) e será discorrido sobre a atividade larvicida, o período desta atividade larvicida e o efeito subletal dos óleos essenciais de *Cordia curassavica* (Boraginaceae) e *Pimenta pseudocaryophyllus* (Myrtaceae) contra Larvas de *A. aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) sob condições de laboratório.

1. Geral

- Avaliar a atividade larvicida dos óleos essenciais de cinco espécies diferentes da flora brasileira - *Guatteria blepharophylla*, *G. friesiana*, *G. hispida*, *Cordia curassavica* e *Pimenta pseudocaryophyllus* - sob condições laboratoriais, na busca de novos compostos com possível ação inseticida.

2. Específicos

- Confirmar a presença dos compostos majoritários nos óleos essenciais das espécies *Guatteria blepharophylla*, *G. friesiana* e *G. hispida* com base nos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).
- Determinar os compostos químicos de *Cordia curassavica* através de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS).
- Determinar a susceptibilidade das larvas de *Aedes aegypti*, provenientes da colônia Rockefeller CDC (Center of Disease Control), expostas aos óleos essenciais de *Guatteria blepharophylla*, *G. friesiana* e *G. hispida*, *Cordia curassavica* e *Pimenta pseudocaryophyllus*, para estimar os valores das concentrações letais 50, 95 e 99% (CL₅₀, CL₉₅ e CL₉₉);
- Determinar o período de atividade larvicida dos óleos essenciais das espécies *Cordia curassavica* e *Pimenta pseudocaryophyllus* sobre as larvas de terceiro instar final ou quarto instar inicial
- Avaliar a influência das doses subletais CL₁₀ e CL₅₀ dos óleos essenciais das espécies *Cordia curassavica* e *Pimenta pseudocaryophyllus* sobre as larvas de terceiro instar final ou quarto instar inicial.

1. Coleta das Amostras Vegetais

As folhas de *G. blepharophylla* foram coletadas em Janeiro de 2008 no Campus Universitário da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). As folhas de *G. friesiana* também foram coletadas em Janeiro de 2008, porém na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), uma área de três mil hectares, localizada no Km 38 da BR-174. Já as folhas de *G. hispida* foram coletadas em Julho do mesmo ano, porém na Reserva Florestal Adolpho Ducke, uma área de 100 Km², pertencente ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), situada no Km 26 da AM-010, estrada que liga Manaus ao município de Itacoatiara.

As espécies *G. blepharophylla*, *G. friesiana* e *G. hispida* foram identificadas pelo Prof. Dr. Antônio Carlos Weber, do Departamento de Biologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), e as exsiccatas foram depositadas no herbário da própria UFAM sob os números de registro 7340, 7341 e 7707, respectivamente.

As folhas de *Cordia curassavica* foram coletadas em Novembro de 2007 em São Paulo, e a confirmação de sua identificação foi realizada pelo Dr. Renato Goldenberg do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná.

As folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* também foram coletadas em Novembro de 2007 em uma restinga no município de Ilha Comprida, Estado de São Paulo. Foi identificada pelo Dr. João Coffani-Nunes da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e uma amostra foi depositada no Herbário Hermógenes Leitão Filho-UNESP sob o número 760.

2. Extração dos Óleos Essenciais

Os métodos de extração dos óleos essenciais variam de acordo com a localização destes na planta e com a finalidade de sua utilização, podendo serem extraídos por cinco métodos diferentes segundo Simões *et al.* 2003: enfloração, prensagem, extração com solventes orgânicos, extração por fluido supercrítico e extração por arraste de vapor de água. O método escolhido neste trabalho para extração dos óleos essenciais das plantas, dentre os cinco diferentes métodos, foi o de arraste por vapor d'água, mais especificamente por hidrodestilação, onde a amostra fica imersa na água contida numa caldeira.

Para as três espécies de *Guatteria* utilizaram-se 250 g de folhas obtidas de espécimes floridas. As folhas foram secas à temperatura ambiente por três dias e moídas, sofrendo hidrodestilação por quatro horas e utilizando um aparelho do tipo Clevenger (FIGURA 05). Em seguida, os óleos foram secos sob sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e a percentagem dos seus conteúdos foram calculadas baseadas no peso do material seco. A extração foi realizada em triplicata.

Para a extração dos óleos essenciais das espécies *Cordia curassavica* e *Pimenta pseudocaryophyllus* utilizaram-se 500 g de folhas secas da primeira e 500 g de folhas frescas da segunda. Em ambos os casos o tempo de extração foi de 4 horas e seguiu o mesmo procedimento supracitado.

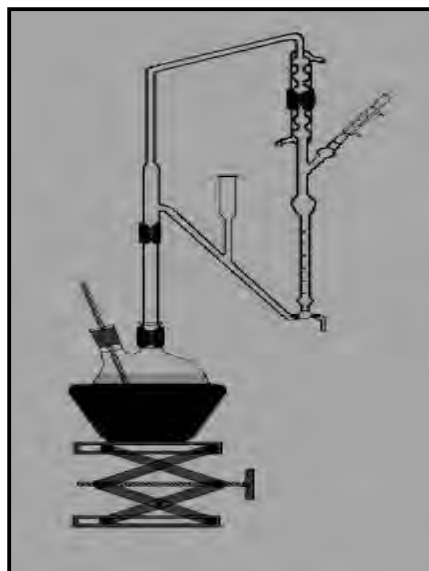


FIGURA 05 - Técnica de hidroddestilação utilizando aparelho de Clevenger. FONTE: Silva *et al.* 2003.

3. Análise dos Óleos Essenciais de *Guatteria blepharophylla*, *G. friesiana* e *G. hispida* por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para confirmação dos compostos majoritários:

A espectrometria por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogênio e de Carbono é utilizada para a identificação destes compostos orgânicos determinando sua natureza e o seu ambiente químico. É a técnica mais importante para a investigação da estrutura molecular (Maciel *et al.* 2002).

A fim de confirmar que os óleos avaliados nos bioensaios obtinham os compostos majoritários registrados por Costa *et al.* (2008 [a]) optou-se em analisar os óleos essenciais *in natura* destas espécies via Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C 1D/2D. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram registrados em um espectrômetro Bruker Avance 400 operando a 9,4 Tesla, observando ^1H a 400 MHz e ^{13}C a 100 MHz. Como solvente deuterado foi utilizado o clorofórmio. Os valores de deslocamentos químicos foram dados em partes por milhão (ppm) relativos ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão de referência interna (δ 0,00).

4. Análise do Óleo Essencial de *Cordia curassavica* por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS).

Normalmente, esta identificação dos compostos químicos dos óleos essenciais em GC-MS é realizada através de um método amplamente utilizado conhecido como “computer library search”, onde o óleo é cromatografado em diferentes dias e é obtida a média do tempo de retenção, e através dos índices de Kovatz encontrados são consultados na literatura (Alencar *et al.* 1990).

A análise GC-MS foi realizada num sistema Varian Saturn 2000/GC/MS constituído de coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 8 CB Low Bleed MS (5% fenilmetilsiloxano - 30m x 0.25 mm x 0.25 mm de espessura de filme) e hélio (1.0 mL/min) como o gás de arraste. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 250°C e do forno regulada na faixa de 60° - 280° C ajustado à 180°C.

Os constituintes químicos foram identificados em relação aos índices de retenção referentes a uma série homóloga de C₉-C₂₀ e auxílio de espectrometria de massa. Além disso, os resultados obtidos foram também comparando aos índices de retenção descritos na literatura. A percentagem da composição dos constituintes químicos na amostra de óleo foi obtida a partir das áreas do pico GC, sem correção para os fatores de resposta.

Essa análise não foi realizada para o óleo essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* pois já existe publicação com esse tipo de abordagem em Marques *et al.* (no prelo). Portanto realizou-se apenas para *Cordia curassavica*.

5. Obtenção das Larvas e Realização dos Bioensaios

5.1. Manejo das Larvas

As larvas foram obtidas a partir de ovos da colônia “Rockefeller-CDC (Center of Disease Control), os quais foram submersos em copos plásticos com capacidade para 770 mL. Adicionou-se 0,026g de ração Purina® Cat Chow® triturada para induzir a eclosão larval. Após observação da eclosão larval, mediante visualização das larvas nadando na água desclorada dentro dos copos, e passadas 24 horas, estas foram transferidas para bandejas plásticas (35,5cm x 21,5cm x 6,5cm) contendo 3.000mL de água também desclorada.

Estas larvas foram mantidas sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada Modelo 347 CDG, no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Assim permaneceram até atingirem o estágio de 3º instar final ou 4º inicial. Não sofreram nenhum tipo de tratamento químico, porém foram alimentadas com a mesma ração supra citada (FIGURA 06).

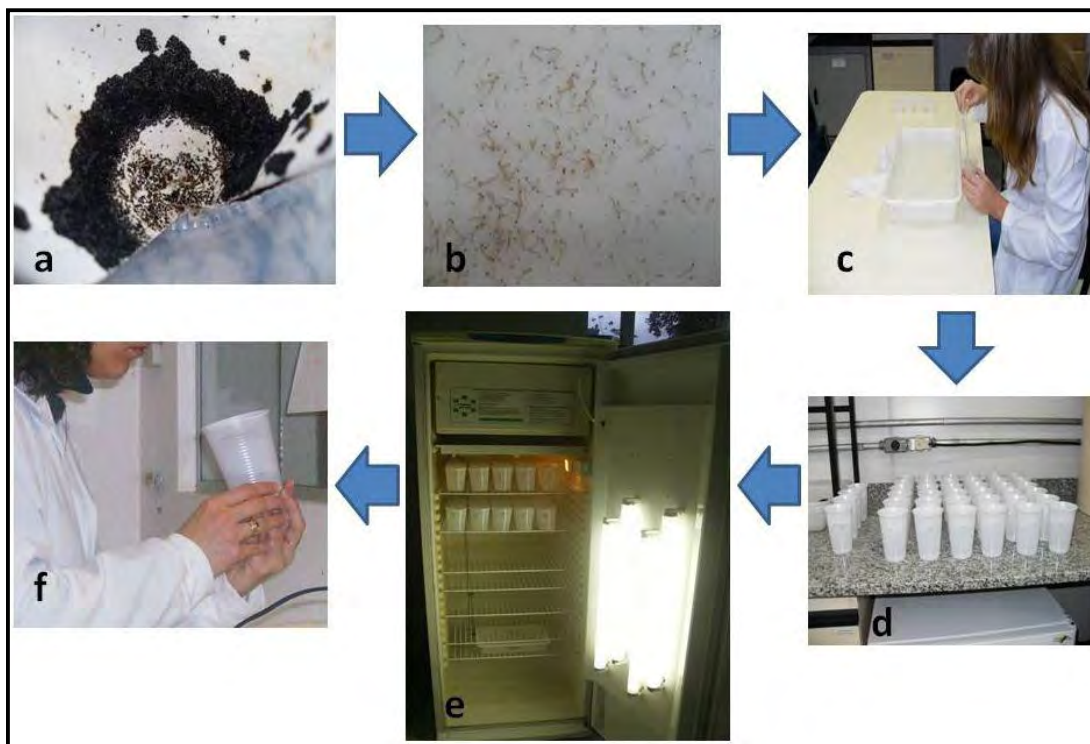


FIGURA 06 – Esquema da realização do bioensaio: a) ovos de *Aedes aegypti* da colônia Rockefeller; b) larvas de 3º instar final ou 4º instar inicial; c) contagem e separação das larvas; d) diferentes concentrações do produto; e) armazenamento em câmara climatizada e f) leitura da mortalidade após 24 horas. Fonte: A autora.

5.2. Preparo das Soluções dos Óleos Essenciais

No Laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, foram preparadas as “soluções estoque” dos cinco óleos essenciais das plantas a serem utilizadas em todos os testes.

A partir do rendimento total dos óleos essenciais de *Guatteria blepharophylla*, *G. friesiana* e *G. hispida* prepararam-se “soluções estoque” nas concentrações de 10.000 ppm (partes por milhão). Para *C. curassivaca* e *P. pseudocaryophyllus* as concentrações das soluções foram de 100.000 ppm. Estas “soluções estoque” foram preparadas pesando-se 1g dos óleos, numa balança analítica de precisão, pré-solubilizando os óleos com 9mL de dimetilsulfóxido (DMSO - PA) - marca Biotec® e pureza 99% - num volume final de 10 mL. Estas soluções foram homogeneizadas e mantidas em frascos âmbar envolvidos com papel alumínio, protegendo-os da luminosidade, e guardados à temperatura ambiente em local seco e seguro.

A partir dessas “soluções-estoque” realizou-se a calibração de todos os óleos com uma série de concentrações de 10 a 120 ppm, sendo escolhidas aquelas que apresentaram bons resultados.

5.3. Bioensaios

a) Atividade Larvícida

Os bioensaios de atividade larvícida seguiram o protocolo da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1981 [a, b]), com ligeiras modificações.

Os testes foram realizados entre três e quatro dias diferentes e, em geral, o desenho experimental esteve de acordo com Robertson & Preisler, 1992. Todos os testes foram realizados com larvas da colônia Rockefeller-CDC e mantidos em câmara climatizada sob as mesmas condições de temperatura, umidade e fotoperíodo anteriormente relatadas.

Os bioensaios da atividade larvícida seguiram o mesmo padrão para todos os óleos essenciais das cinco espécies de plantas. Contudo, diferiram uns dos outros apenas nas concentrações utilizadas e respectivas quantias de óleos, assim como no volume final da solução (FIGURA 07).

Atingindo o estágio larval descrito anteriormente, as larvas foram contadas, separadas e transferidas, com auxílio de pipeta de Pauster, para copos plásticos descartáveis de capacidade 50mL contendo 20mL da mesma água desclorada, totalizando 10 a 20 larvas por copo (por concentração).

Estas larvas foram expostas a concentrações diferentes dos óleos essenciais de *Guatteria* spp. (12, 15, 20, 35, 40, 50, 60, 65, 80, 85, 95 e 120 ppm), e cada concentração foi preparada em quaduplicata, além do controle. No entanto, destas concentrações foram selecionadas as sete que obtiveram melhores resultados (12, 15, 20, 35, 40, 60 e 85 ppm). A quantidade do óleo para cada concentração foi colocada em recipientes plásticos de capacidade de 330mL contendo DMSO 1% (marca BIOTEC® e pureza 99%) e 80mL de água mineral, num volume final de 100mL.

Outras larvas também foram expostas a seis concentrações diferentes do óleo essencial de *Cordia curassavica* (50, 60, 70, 80, 100 e 200 ppm) e cada concentração foi preparada também em quaduplicata, além do controle. A quantidade do óleo para cada respectiva concentração foi colocada em recipientes plásticos de capacidade de 330mL contendo DMSO 1% e 180mL de água mineral, num volume final de 200mL.

Por fim, as larvas restantes foram submetidas a oito concentrações diferentes do seu óleo essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* (3, 10, 50, 60, 70, 80, 100 e 120 ppm), num volume final igual ao de *C. curassavica*.

Após homogeneização da solução, com auxílio de bastão de vidro por 20 segundos, esperou-se cerca de cinco minutos e então as larvas acondicionadas foram adicionadas. Para o tratamento controle uma parcela das larvas foi exposta apenas a DMSO 1% e água mineral.

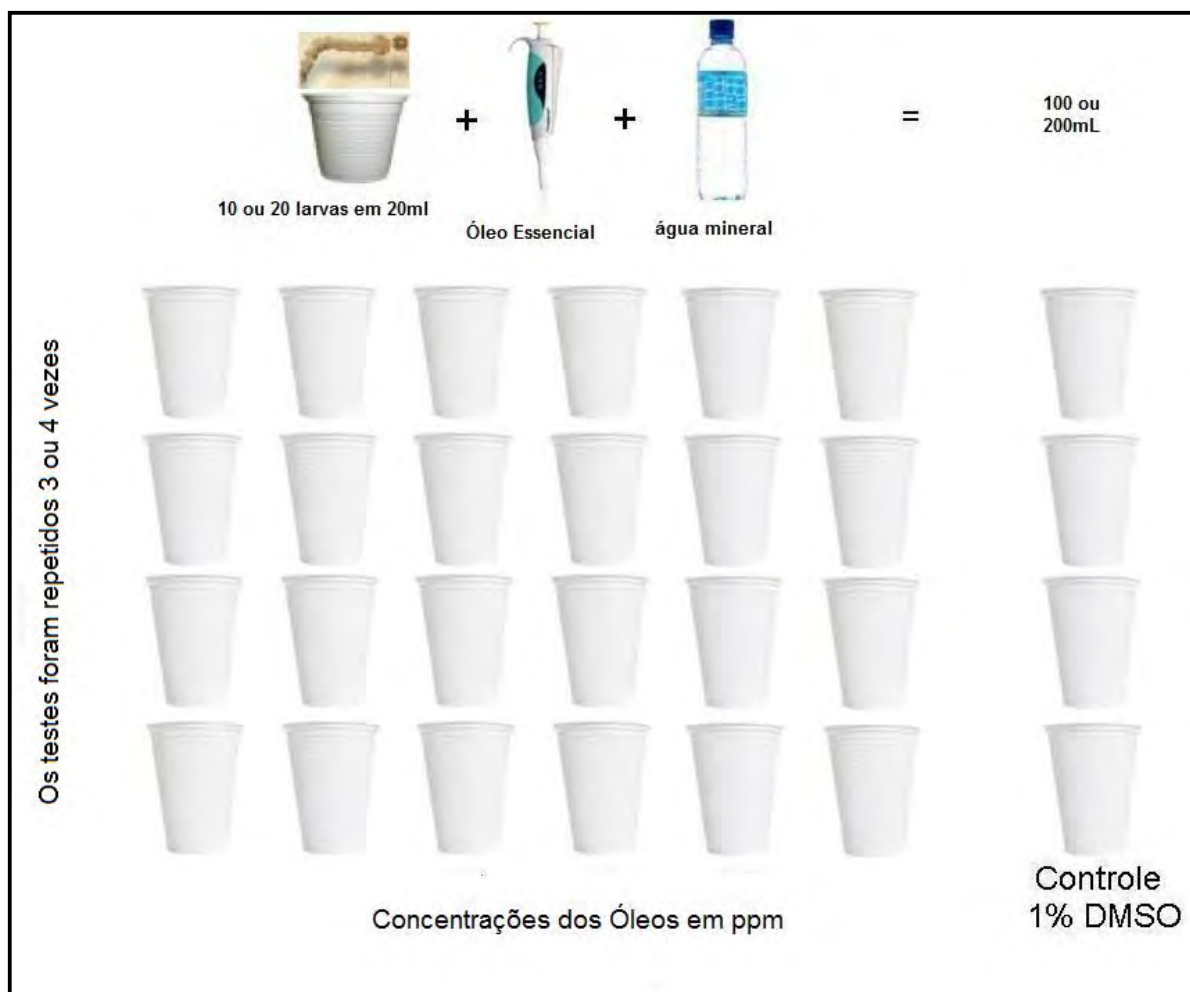


FIGURA 07 – Ilustração esquemática do desenho experimental do bioensaio de atividade larvica utilizado para os óleos essenciais das cinco espécies de plantas: *Guatteria* spp, *Cordia curassavica* e *Pimenta pseudocaryophyllus*, diferindo apenas no número de concentrações e volume final da solução. Fonte: A autora.

b) Período de Atividade Larvica

Na verificação do período de atividade larvica, de entre os cinco óleos essenciais estudados neste trabalho, somente utilizaram-se os óleos de *C. curassavica* e *P. pseudocaryophyllus*, em virtude da quantidade disponível após o bioensaio da atividade larvica. Selecionaram-se as concentrações letais CL_{10} (39,61 ppm) e CL_{50} (90,98 ppm); CL_{10} (18,34 ppm) e CL_{50} (43,35 ppm) respectivamente de ambos os óleos essenciais – anteriormente obtidas nos resultados do ensaio anterior.

Os óleos de *Guatteria* spp., ao final do bioensaio da atividade larvica encontraram-se em quantidades insuficientes a este experimento.

O teste foi realizado utilizando as CL₁₀ e CL₅₀ dos óleos essenciais, e para cada uma destas concentrações usou um número de quatro réplicas (com 20 larvas por copo), além do controle com água mineral e DMSO 1%, num volume final de 200mL. O experimento foi realizado em triplicata para *P. pseudocaryophyllus* duplicata em dias diferentes. Para *C. curassavica* seguiu-se a mesma metodologia, no entanto o experimento foi realizado em duplicata também em dias diferentes (FIGURA 08)

A mortalidade das larvas foi acompanhada após 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas de exposição destas aos óleos.

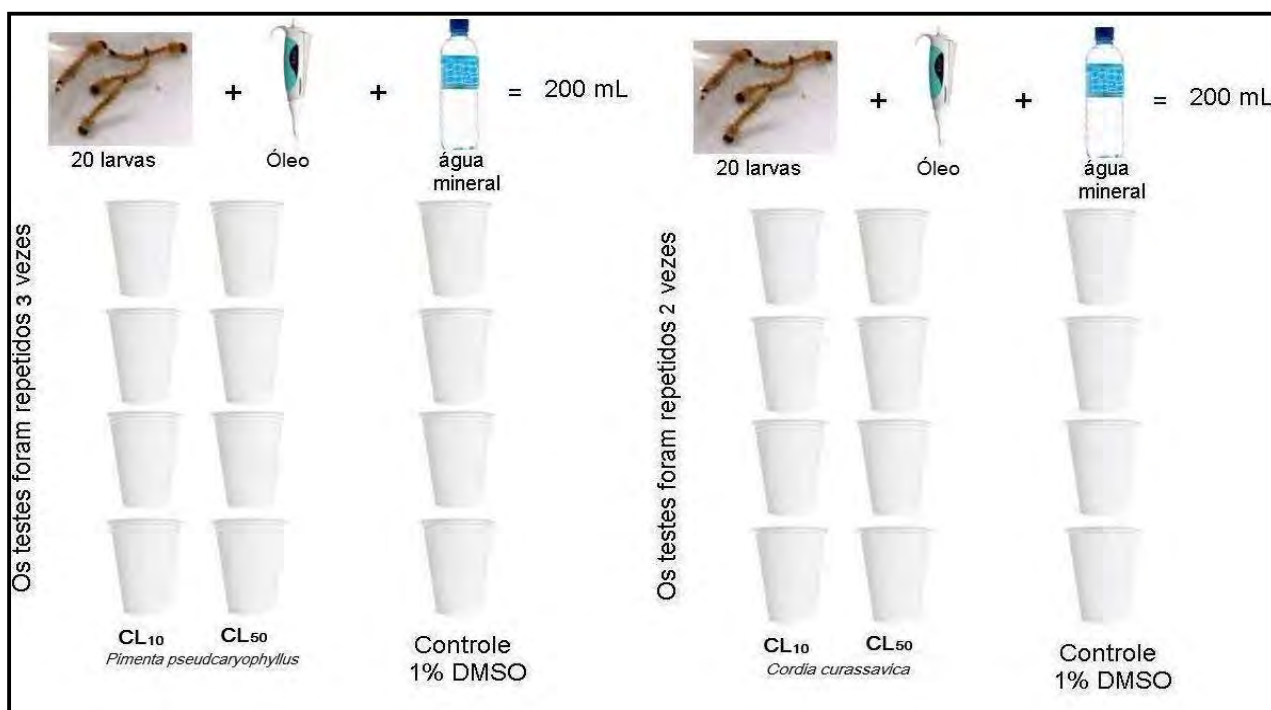


FIGURA 08 - Ilustração esquemática do desenho experimental do bioensaio de período de atividade larvica de *Pimenta pseudocaryophyllus* e *Cordia curassavica*. Fonte: A autora.

c) Efeito Sub letal

Para estabelecer o efeito sub-letal dos óleos essenciais de *C. curassavica* e *P. pseudocaryophyllus* também fez-se uso das CL₁₀ e CL₅₀ e semelhantemente ao ensaio anterior, quatro réplicas foram usadas, cada uma contendo 20 larvas.

A fim de acompanhar o desenvolvimento larval até o estágio de adulto foi adicionado, como fonte de alimentação a cada 3 dias, ração Purina Cat Chow® triturada em pequena quantidade (0,026g por copo). Diariamente foram realizadas as leituras onde verificaram-se o comportamento larval, a mudança de estágio, a presença de exúvia, a emergência dos indivíduos adultos e a eventual mortalidade nas larvas e pupas.

Foram considerados adultos vivos apenas aqueles que conseguiram se libertar completamente da exúvia. Caso houvesse indivíduos mortos na fase pré-pupa estes eram quantificados como pupa, já os indivíduos mortos no momento em que se iniciava a emergência do adulto, foram quantificados como adultos. O mesmo procedimento foi realizado para os controles. O experimento foi conduzido até a última pupa ou adulto morrer ou o último adulto emergir completamente.

d) Calibração do DMSO

Paralelamente realizou-se a calibração do DMSO em cinco concentrações de 1 a 5% para confirmar que a percentagem de 1% utilizada nos ensaios, de fato, não causava mortalidade das larvas.

e) Alterações Morfológicas das Larvas expostas ao Bioensaio de Efeito Subletal

Foram observadas e descritas as alterações morfológicas externas que as larvas e subsequentes estágios de vida de *A. aegypti* apresentaram em resposta ao efeito subletal dos óleos essenciais em questão.

As alterações morfológicas externas foram inicialmente observadas a “olho desarmado” e posteriormente em microscópio estereoscópio, desde o início do experimento até o seu término. Em seguida, larvas e pupas mortas foram removidas e fotografadas nas instalações do *TAX on-line* – Rede Paranaense de Coleções Biológicas – em equipamento videofotográfico acoplado a um computador (Fotos: Leica IM50 Versão 5; Montagem: Auto-Montage-Pro 5.03 Syncroscopy; Câmera: Leica DFC500 e Lupa: Leica Mz16).

6. Mortalidade das Larvas e Tempo de Exposição aos Óleos

A mortalidade das larvas foi verificada após 24 e 48 horas para *C. curassavica* e *P. pseudocaryophyllus*, enquanto para *Guatteria* spp. foi observada após 24 horas de exposição ao tratamento

Larvas incapazes de atingir a superfície da água ou imóveis quando submetidas a estímulos (batidas sucessivas na parede dos copos com pipeta de Pauster) foram consideradas como larvas mortas (WHO, 1981 [a, b]).

7. Análise dos Dados

A estimativa das concentrações capazes de ocasionar mortalidade de 50% (CL₅₀), 95% (CL₉₅) e 99% (CL₉₉) das larvas, o χ^2 , o coeficiente angular (*Slope*) e os intervalos de confiança foram determinados pela análise *Probit* com o auxílio do software PROBIT GW-Basic (Finney, 1971) a partir dos dados de mortalidade obtidos nos bioensaios, com nível de significância de $p < 0,05$. O modelo Probit pode ser expresso matematicamente por:

$$P = F(\alpha + \beta x_i)$$

Onde:

P = Probabilidade da resposta

F = Distribuição da função

α = Interceptação da regressão linear

β = “slope” ou ângulo da regressão linear

x_i = Função da dose - logaritmo da dose [\log_{10} (dose)].

Os gráficos da atividade larvícida foram confeccionados pelo software Biostat 2008 Professional for Windows, sob a análise do tipo Sobrevivência – Análise Probit, e os gráficos do período de atividade larvícida foram executados pelo Software Statisc 7.0, usando análise dos testes não paramétricos - Teste de Kruskal & Wallis (KW) com nível de significância de $p < 0,05$.

Para realizar a diluição dos óleos essenciais na execução dos bioensaios utilizou-se a seguinte fórmula:

$$C1.V1 = C2.V2$$

Onde:

C1 = Concentração inicial

V1 = Volume inicial

C2 = Concentração final

V2 = Volume final

1. Extração dos Óleos Essenciais

A partir da extração dos óleos essenciais das espécies de *Guatteria*, *Cordia* e *Pimenta* por arraste de vapor de água, tipo hidrodestilação, foi possível obter suas características físico-químicas e seu rendimento, os quais são expostos na TABELA 02.

O rendimento de extração dos extratos ou óleos essenciais de origem vegetal é um fator para levar em conta num produto de origem botânica com ação biológica. O maior rendimento foi obtido para o óleo essencial de *G. friesiana* (0,52%), seguido por *G. hispida* (0,44%). Enquanto, *G. blepharophylla* foi a espécie que apresentou menor rendimento (0,27%). Quando comparados com alguns rendimentos de espécies de Annonaceae publicados na literatura (Boyom *et al.*, 2003), observou-se que os rendimentos destas espécies de *Guatteria* foram relativamente superiores.

Para as espécies *Cordia curassavica* e *Pimenta pseudocaryophyllus* obteve-se um rendimento de 0,25% e 0,48% (m/m), respectivamente. Araújo, 2007 encontrou valores de rendimento do óleo essencial de *C. curassavica*, a partir de 50 g de folhas, que variaram de 0,03 a 0,15%. Já para *P. pseudocaryophyllus*, Girard *et al.* 2007 registraram um rendimento percentual de 2,42 a 3,02, a partir de 200 g de folhas.

Os nossos resultados mostram bons rendimentos, principalmente se considerarmos que apenas usaram-se 250 g de folhas por cada espécie de *Guatteria* spp. e 500 g para *C. curassavica* e *P. pseudocaryophyllus* para todo o processo de extração. Indicando que eventualmente numa produção em grande escala, o rendimento de produção não seria um problema devido estas cinco espécies serem ricas em óleos essenciais.

A utilização desses inseticidas botânicos pode ser vantajosa em relação aos sintéticos, pois esses são provenientes de recursos renováveis e por ser uma mistura de vários compostos ativos agindo sinergicamente, a resistência pode ocorrer mais lentamente (Barreto, 2005 [a]). Além disso, esses fitoquímicos não colocam em risco outros organismos.

TABELA 2 - Características físico-químicas e rendimento dos óleos essenciais de *Guatteria* spp., *Cordia curassavica* e *Pimenta pseudocaryophyllus* obtidos no Laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química – Depto. de Química - Universidade Federal do Paraná.

Espécies	Aspecto	Densidade (g.mL ⁻¹)	Rendimento (%)
<i>G. blepharophylla</i>	Óleo amarelado	0,95	0,27
<i>G. friesiana</i>	Óleo escuro	0,93	0,52
<i>G. hispida</i>	Óleo incolor	0,90	0,44
<i>C. curassavica</i>	Óleo amarelado	-	0,25
<i>P. pseudocaryophyllus</i>	Óleo amarelo claro	2,4	0,48

2. Análise dos Óleos Essenciais de *Guatteria* spp. por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para confirmação dos Compostos Majoritários

Costa *et al.* 2008 [a] identificaram a presença de mono e sesquiterpenos na composição química destes óleos: os compostos α -, β - e γ -eudemols (23,70%, 51,60% e 23,60%) (**1**, **2** e **3** respectivamente) presentes no óleo essencial de *G. friesiana*; óxido de cariofileno (69,25%) (**4**) presente no óleo de *G. blepharophylla*; e α - e β -pinenos (30,77%, 38,18%) (**5** e **6**), e (*E*)-cariofileno (20,59%) (**7**) presentes no óleo de *G. hispida* (FIGURA 09 e Anexo 1). E em nossa análise de RMN confirmamos a presença destes compostos e em seguida utilizamo-nos na avaliação da atividade inseticida contra larvas de *A. aegypti*.

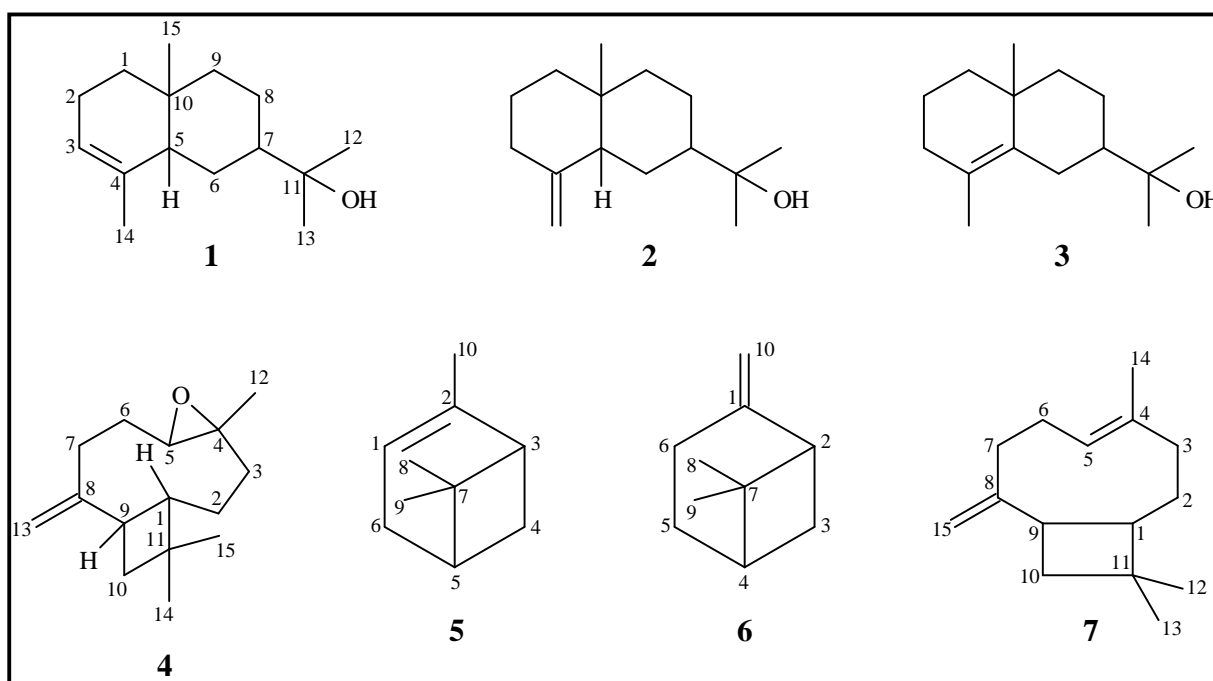


FIGURA 09 - Constituintes majoritários identificados nos óleos essenciais das folhas de *Guatteria* spp. (1) α -eudemol; (2) β -eudemol; (3) γ -eudemol; (4) óxido de cariofileno; (5) α -pineno; (6) β -pineno e (7) (*E*)-cariofileno. Fonte: Costa *et al.* 2008 [a].

A presença desses compostos nos óleos aqui estudados foi confirmada com base nos seus respectivos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

Pela análise do espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do óleo essencial de *G. friesiana* verificou-se a presença de três constituintes majoritários: α -, β - e γ -eudesmols (**1**, **2** e **3**) quando comparado com os dados descritos na literatura (Raharivelomanana *et al.* 1995; Costa *et al.*, 2008 [a]).

Pelo espectro observou-se dois sinais em δ 4,71 (1H) e δ 4,44, ambos duplos dubletos ($J = 3,2$ e $1,6$ Hz) típicos dos hidrogênios metilênicos terminais H-14b e H-14a do composto β -eudesmol (**2**).

Observou-se também um sinal em δ 5,31 (1H, s), característico de hidrogênio vinílico compatível com o H-3 do composto α -eudesmol (**1**). Verificou-se ainda um sinal em δ 2,63 (1H, dt, $J = 13,4$ e $2,3$ Hz) compatível com o H-6b do composto γ -eudesmol (**3**) (FIGURA 10).

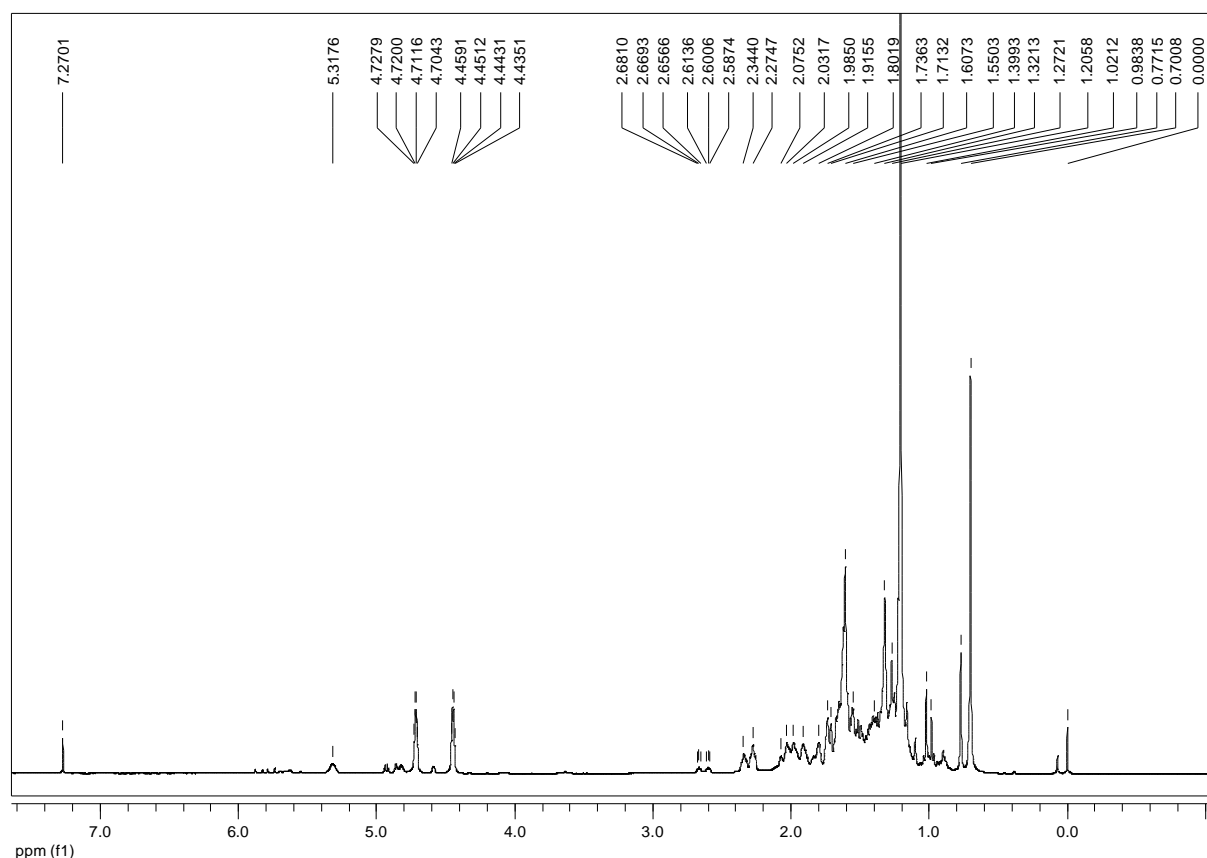


FIGURA 10 - Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial das folhas de *Guatteria friesiana*

A ocorrência desses três compostos no óleo essencial de *G. friesiana* foi confirmada principalmente pela análise do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), sendo o β -eudesmol (**2**) o composto majoritário presente na mistura, devido as intensidades dos seus respectivos carbonos. Os sinais dos carbonos sp^2 do β -eudesmol (**2**) foram observados em δ 151,1 (C-4) e δ 105,3 (C-14), enquanto os sinais dos carbonos sp^2 do α -eudesmol (**1**) foram verificados em δ 135,2 (C-4) e δ 121,0 (C-3). Já os sinais dos carbonos sp^2 do composto γ -eudesmol (**3**) foram observados em δ 134,8 (C-5) e δ 124,4 (C-4) (FIGURAS 11 e 12, TABELA 3). Na TABELA 3 são apresentados os corretos valores dos carbonos dos compostos **1-3** determinados com base no espectro de RMN de ^{13}C , bem como comparações com os dados descritos na literatura (Raharivelomanana *et al.*, 1995).

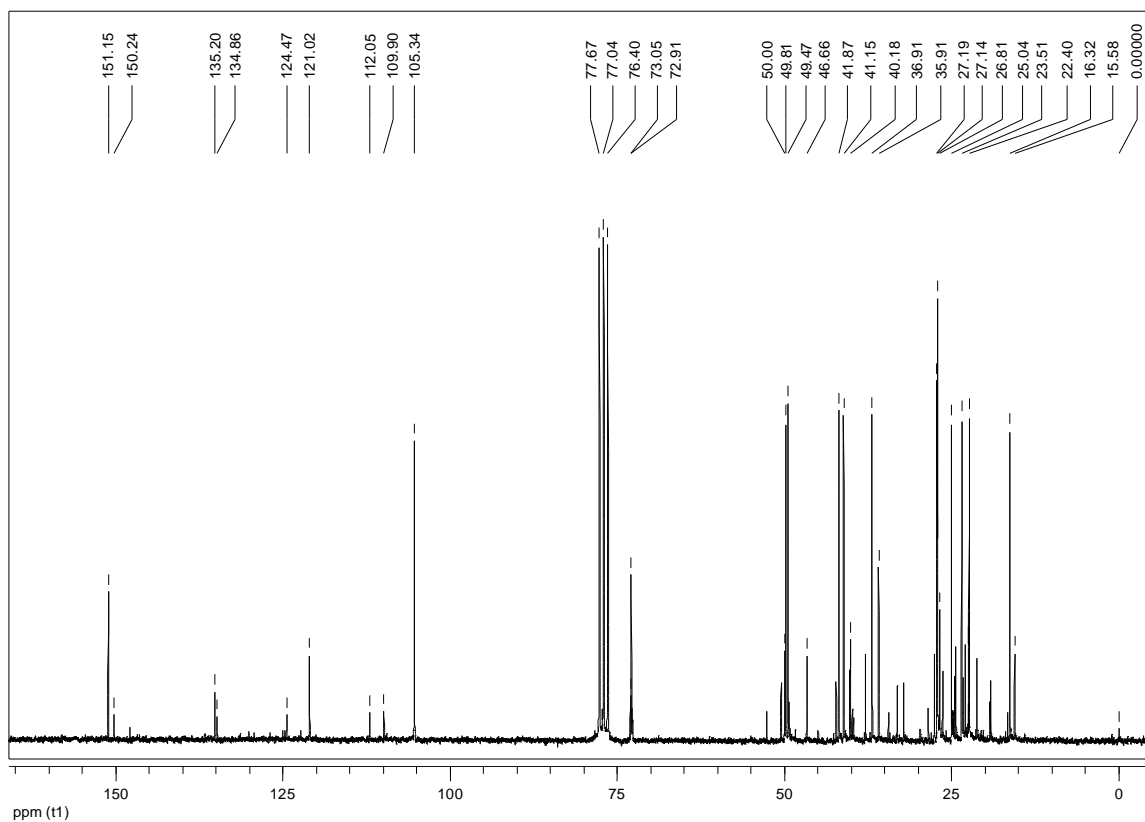


FIGURA 11 - Espectro de RMN de ^{13}C do óleo essencial das folhas de *Guatteria friesiana*.

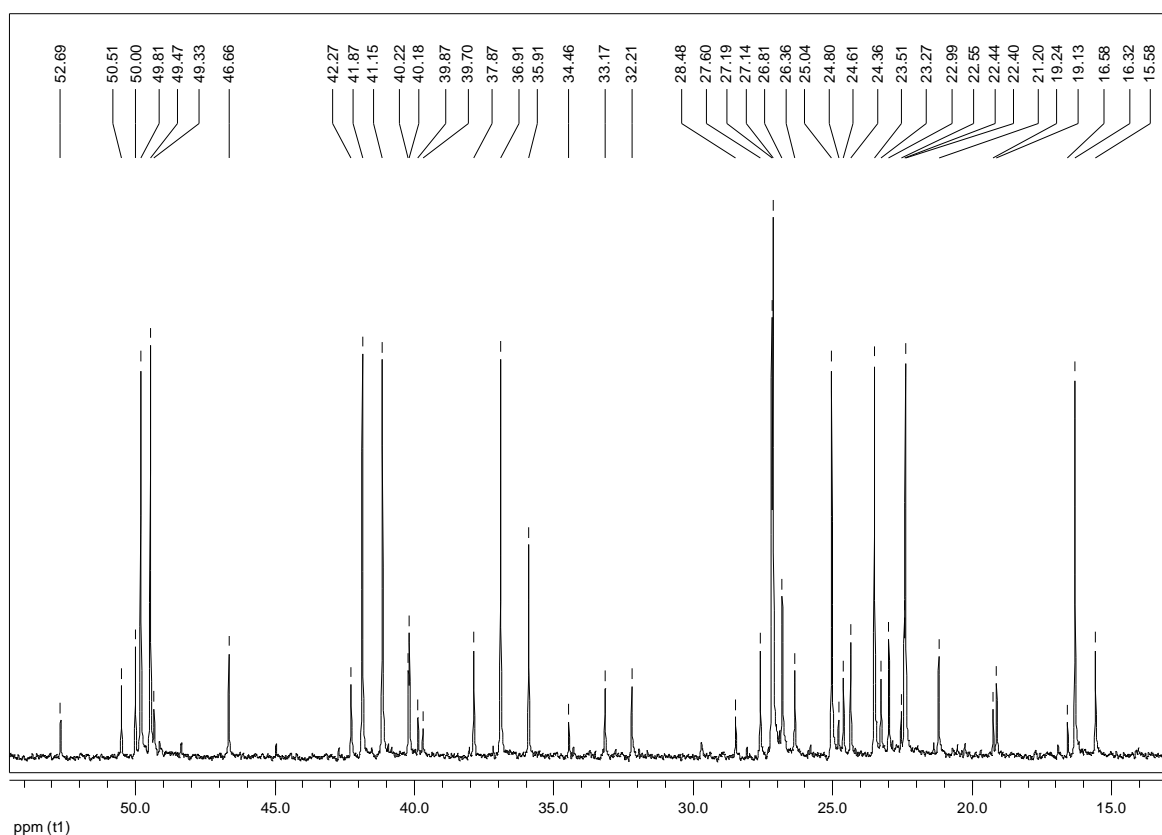


FIGURA 12 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do óleo essencial das folhas de *Guatteria friesiana*.

TABELA 03 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos γ -, α - e β -eudesmols presentes no óleo essencial das folhas de *Guatteria friesiana*

Posição	^{13}C (δ)					
	α -eudesmol (1) ^a	α -eudesmol ^b	β -eudesmol (2) ^a	β -eudesmol ^b	γ -eudesmol (3) ^a	γ -eudesmol ^b
1	37,8	37,8	41,8	41,8	42,2	42,3
2	22,9	22,9	23,5	23,4	19,1	19,1
3	121,0	120,9	36,9	36,8	33,2	33,2
4	135,2	135,1	151,1	150,9	124,4	124,4
5	46,6	46,6	49,8	49,7	134,8	134,9
6	24,3	24,3	25,0	24,9	26,3	26,4
7	50,0	49,9	49,4	49,4	50,5	50,5
8	22,4	22,3	22,4	22,3	23,2	23,3
9	40,1	40,1	41,1	41,1	40,2	40,2
10	32,2	32,1	35,9	35,8	34,4	34,5
11	73,0	73,0	72,9	72,7	72,9	72,8
12	27,6	27,4	27,14	27,08	27,1	27,1
13	26,8	26,7	27,19	27,08	26,8	26,8
14	21,2	21,1	105,3	105,3	19,2	19,2
15	15,5	15,5	16,3	16,2	24,6	24,6

^a Experimento realizado a 50 para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão de referência interna. ^b Raaharivelomanana *et al.*, 1995 (100 MHz, CDCl_3). (δ) Deslocamentos em ppm.

Pela análise do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do óleo essencial de *G. blepharophylla* observou-se praticamente a presença de um constituinte majoritário: o óxido de cariofileno (4). Pelo espectro (FIGURA 13) verificou-se os sinais para três metilas em δ 1,19 (3H, s), δ 1,00 (3H, s) e δ 0,98 (3H, s), bem como dois sinais de hidrogênio de grupo metilênico terminal em δ 4,97 (1H, d, J = 1,0 Hz) e δ 4,85 (1H, d, J = 1,0 Hz). Verificou-se também um sinal em δ 2,87 (1H, dd, J = 10,6 e 4,2 Hz) típico de hidrogênio de grupo epóxido compatível com o H-5 do composto óxido de cariofileno (4).

Assim como observado para o espectro de RMN de ^1H , a análise do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) também revelou a presença de um único constituinte majoritário, confirmando a presença do composto óxido de cariofileno (4) (FIGURA 14). Os carbonos sp^2 do composto óxido de cariofileno (4) foram verificados em δ 151,7 (C-8) e δ 112,7 (C-13), assim como os carbonos do grupo epóxido em δ 59,8 (C-4) e δ 63,7 (C-5). Os grupos metílicos foram verificados em δ 16,9, δ 21,6 e δ 29,8. Os outros sinais dos carbonos do óxido de cariofileno são apresentados na TABELA 4, comparados com os dados descritos na literatura (Ragasa *et al.*, 2002, 2003).

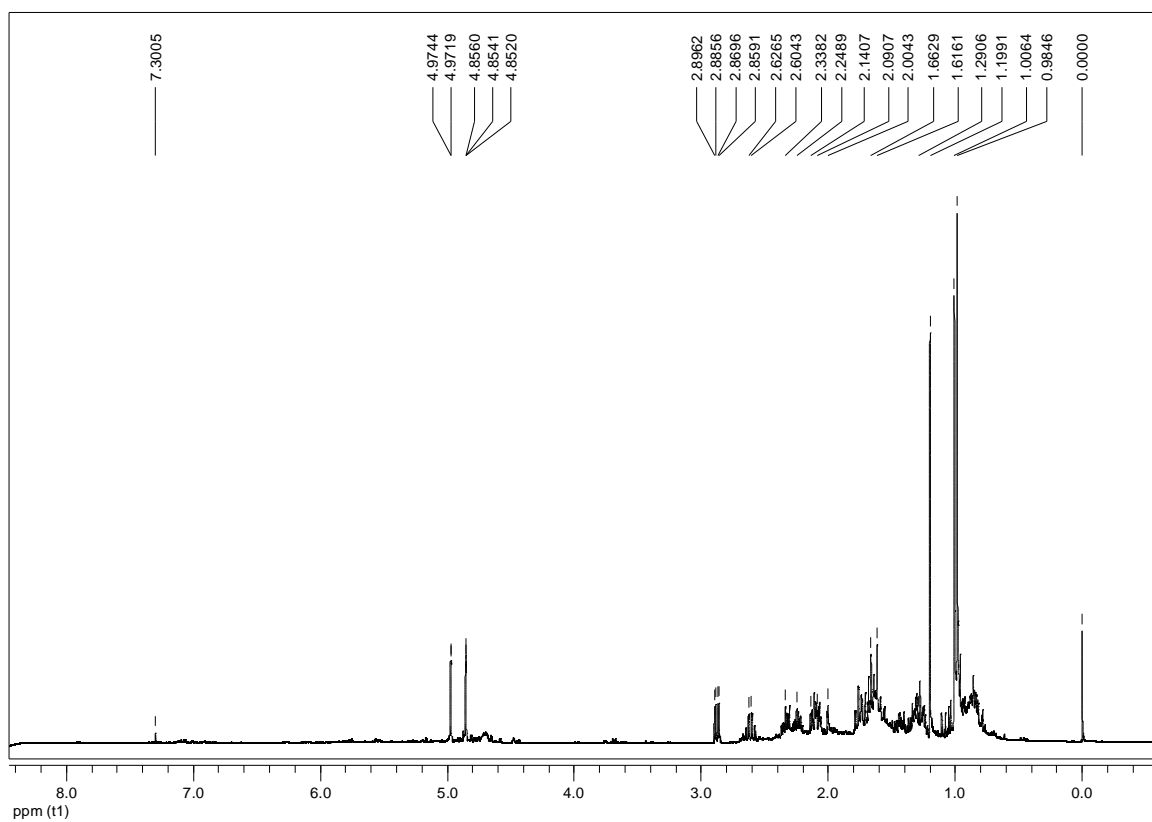


FIGURA 13 - Espectro de RMN de ^1H do óleo essencial das folhas de *Guatteria blepharophylla*.

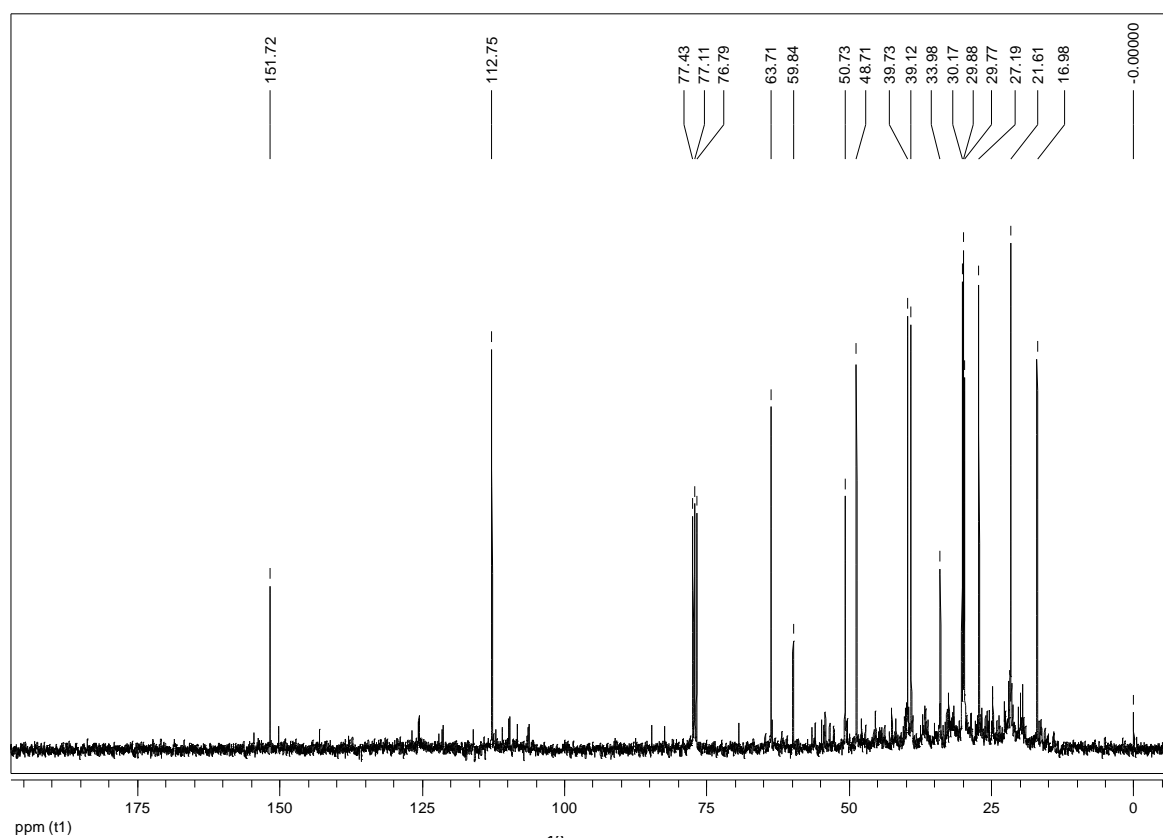


FIGURA 14 - Espectro de RMN de ^{13}C do óleo essencial das folhas de *Guatteria blepharophylla*.

TABELA 4 - Dados de RMN de ^{13}C do composto óxido de cariofileno presente no óleo essencial das folhas de *Guatteria blepharophylla*

Posição	^{13}C (δ)	
	Óxido de cariofileno (4) ^a	Óxido de cariofileno ^b
1	50,7	50,8
2	27,1	27,2
3	39,1	39,2
4	59,8	59,8
5	63,7	63,7
6	29,8	29,9
7	29,7	29,8
8	151,7	151,9
9	48,7	48,7
10	39,7	39,8
11	33,9	34,5
12	16,9	17,0
13	112,7	112,7
14	21,6	21,6
15	30,1	30,2

^a Experimento realizado a 100 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^b Ragasa *et al.*, 2003 (100 MHz, CDCl_3). (δ) Deslocamentos em ppm.

Assim como observado para o óleo essencial de *G. friesiana*, a análise dos espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do óleo essencial de *G. hispida* também revelou a presença de três constituintes majoritário, α - e β -pinenos (**5** e **6**), e (*E*)-cariofileno (**7**), sendo os compostos (**5**) e (**6**) os principais constituintes. Pelo espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) observou-se a presença de dois grupos metílicos em δ 0,71 (3H, s, H-9) e δ 1,23 (3H, s, H-8), bem como dois sinais em δ 4,61 (1H, m) e δ 4,55 (1H, m) típicos dos hidrogênios metilênicos terminais H-10b e H-10a do composto β -pineno (**6**). A presença três grupos metílicos, sendo dois em δ 0,83 (3H, s, H-8) e δ 1,26 (3H, s, H-9), e um δ 1,65 (3H, q, $J = 2,13$ Hz, H-10) sob dupla ligação, bem como um sinal de hidrogênio vinílico em δ 5,18 (1H, m, H-1) evidenciaram o composto α -pineno (**5**). Pelo espectro de RMN de ^1H observou-se ainda três grupos metílicos, sendo dois em δ 0,97 (3H, s, H-13) e δ 0,99 (3H, s, H-12), e um δ 1,60 (3H, s, H-14) sob dupla ligação, bem como três sinais de hidrogênios ligados a carbonos sp^2 , sendo dois em δ 4,93 e δ 4,81 ambos doubletos ($J = 1,3$ Hz) típicos dos hidrogênios metilênicos terminais H-15b e H-15a, e um sinal em δ 5,30 (1H, m), característico de hidrogênio vinílico atribuído a H-5 do composto (*E*)-cariofileno (**7**) o evidenciando na mistura (FIGURA 15).

Os três compostos presentes na mistura (**5**, **6** e **7**) foram confirmados com base na análise do espectro de RMN de ^{13}C (FIGURAS 16 e 17, TABELA 5), bem como amostras autênticas de α - e β -pinenos, e dados da literatura (Barero *et al.*, 1995; Kolehmainen *et al.*, 1997).

A presença dos carbonos sp^2 do composto α -pineno (**5**) foi evidenciada em δ 144,5 (C-2) e δ 116,0 (C-1), assim como os grupos metílicos em δ 26,3 (C-8), δ 22,9 (C-9) e δ 20,8 (C-10). Os carbonos sp^2 do composto β -pineno (**6**) foram observados em δ 152,0 (C-1) e δ 106,0 (C-10), enquanto os grupos metílicos foram verificados em δ 26,1 (C-8) e δ 21,8 (C-9). Para (*E*)-cariofileno (**7**) verificou-se os sinais para dois pares de carbonos sp^2 , um em δ 154,8 (C-8) e δ 111,6 (C-15) e outro em δ 135,3 (C-4) e δ 124,3 (C-5), bem como três sinais de grupos metílicos, sendo dois em δ 30,0 (C-13) e δ 22,6 (C-12), e um em δ 16,2 (C-14) novamente sob dupla ligação. Na Tabela 5 é apresentado os corretos valores dos carbonos dos compostos **5-7** determinados com base no espectro de RMN de ^{13}C , amostras autênticas, e comparação com os dados descritos na literatura (Barero *et al.*, 1995; Kolehmainen *et al.*, 1997).

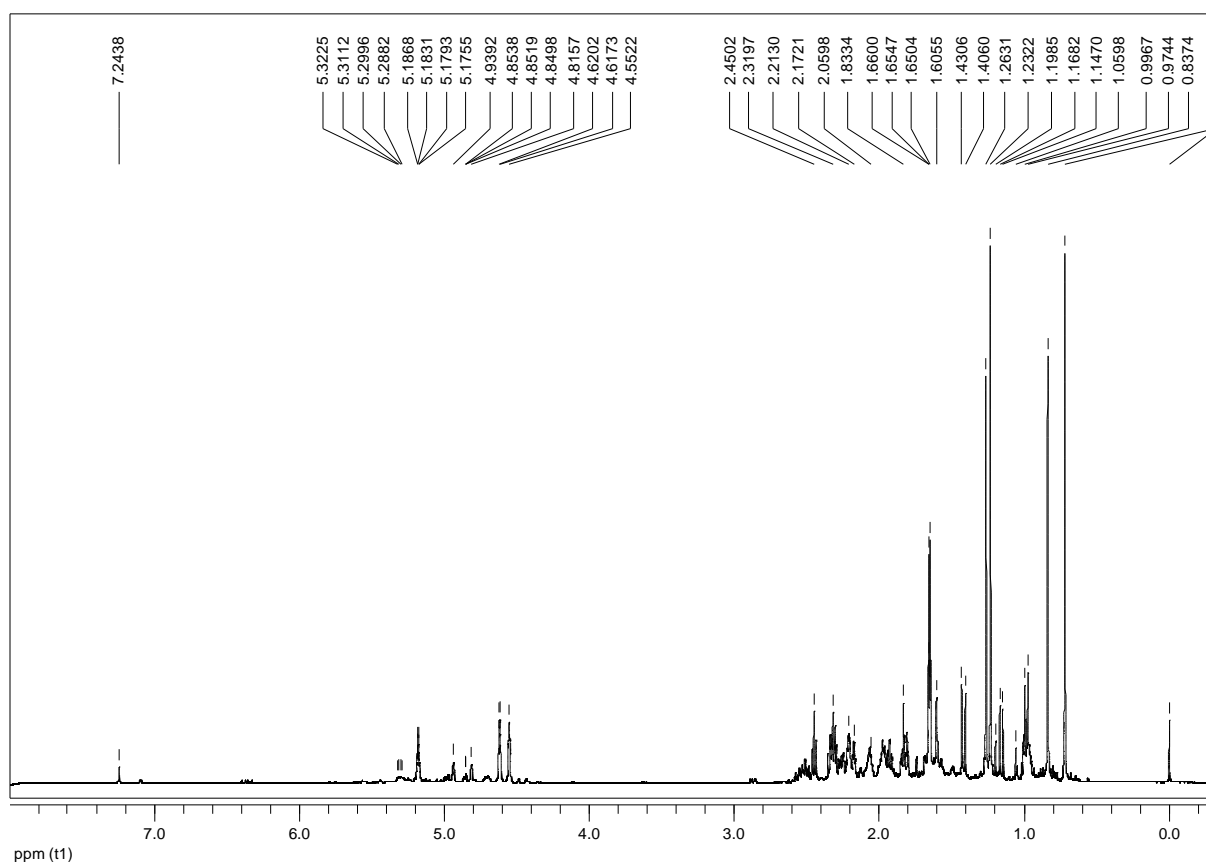


FIGURA 15 - Espectro de RMN de 1H do óleo essencial das folhas de *Guatteria hispida*.

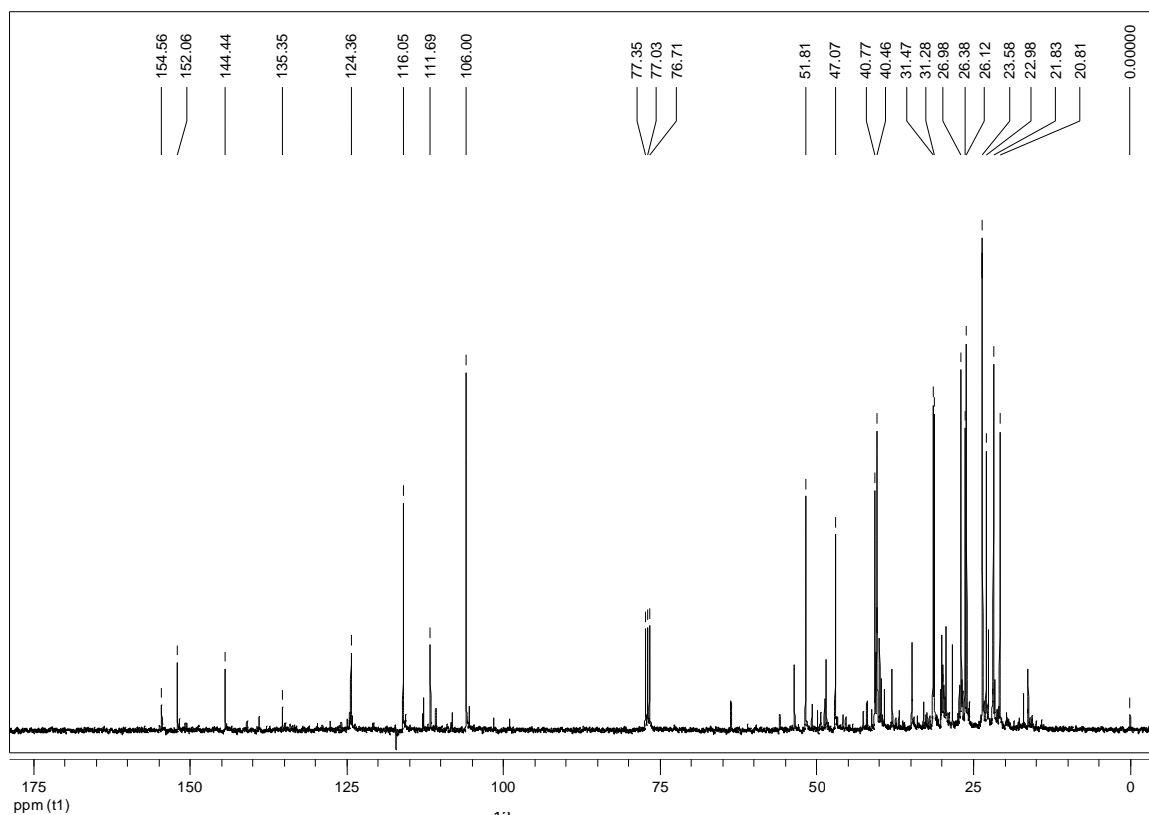


FIGURA 16 - Espectro de RMN de ^{13}C do óleo essencial das folhas de *Guatteria hispida*.

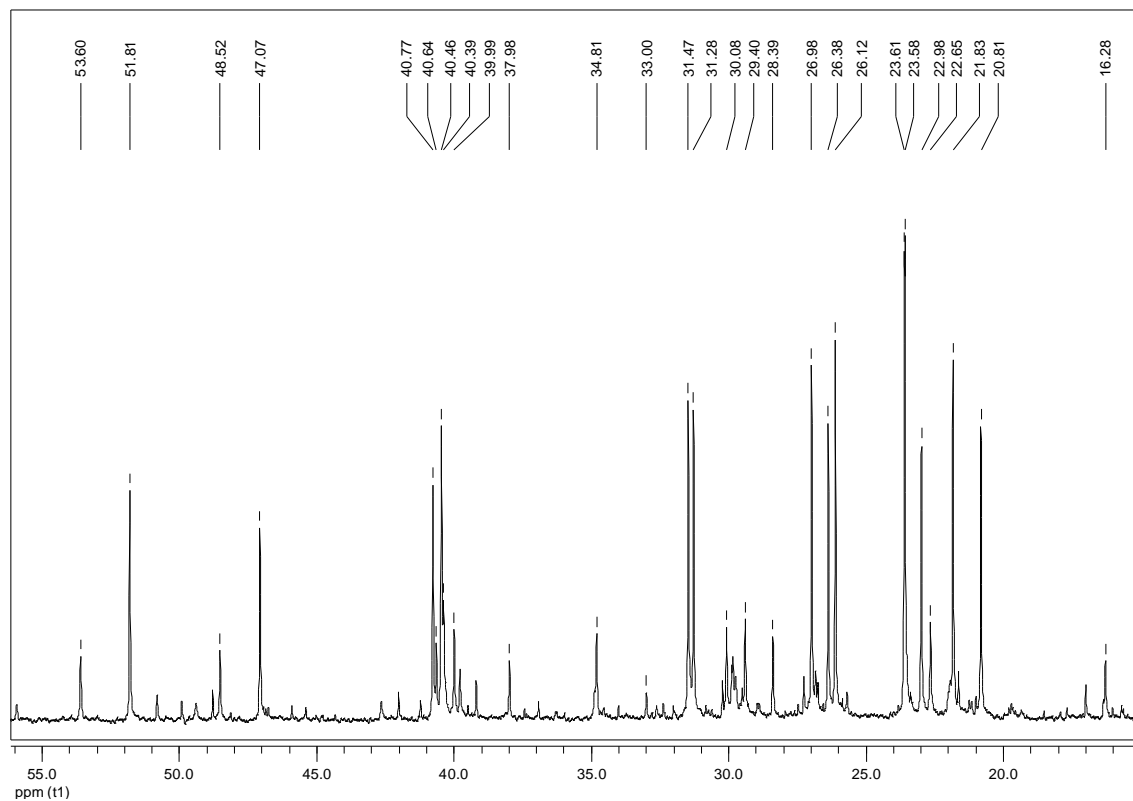


FIGURA 17 - Amplificação do espectro de RMN de ^{13}C do óleo essencial das folhas de *Guatteria hispida*.

TABELA 5 - Dados de RMN de ^{13}C dos compostos α - e β -pinenos, e (E)-cariofileno presentes no óleo essencial das folhas de *Guatteria hispida*.

Posição	^{13}C (δ)				Posição	^{13}C (δ)	
	α -pineno (5) ^a	α -pineno ^b	β -pineno (6) ^a	β -pineno ^b		(E)-cariofileno (7) ^a	(E)-cariofileno ^c
1	116,0	116,0	152,0	151,9	1	53,6	53,7
2	144,4	144,5	51,8	51,9	2	28,3	28,4
3	47,0	47,1	26,9	27,0	3	39,9	40,1
4	31,4	31,4	40,7	40,6	4	135,3	135,6
5	40,7	40,8	23,5	23,6	5	124,3	124,4
6	31,2	31,3	23,6	23,7	6	29,4	29,5
7	37,9	38,0	40,4	40,5	7	34,8	34,9
8	26,3	26,4	26,1	25,9	8	154,5	154,8
9	22,9	22,9	21,8	21,9	9	48,5	48,6
10	20,8	20,8	106,0	106,2	10	40,3	40,4
					11	33,0	33,1
					12	22,6	22,7
					13	30,0	30,2
					14	16,2	16,4
					15	111,6	111,7

^a Experimento realizado a 100 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão de referência interna; ^b Amostra autênticas de α - e β -pinenos (Padrões); ^c Barero *et al.*, 1995 (100 MHz, CDCl_3). (δ) Deslocamentos em ppm.

Através da análise de RMN de ^1H e ^{13}C 1D/2D dos óleos essenciais *in natura* das três espécies em estudo foi possível a determinação estrutural e confirmação dos constituintes majoritários utilizados nos bioensaios, corroborando nossos compostos com Costa *et al.* (2008 [a]).

3. Análise do Óleo Essencial de *Cordia curassavica* por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS).

Foi obtida a lista completa dos componentes voláteis e a composição em percentagem do óleo essencial de *C. curassavica* que estão exibidas na TABELA 6. Após análise do óleo através de GC-MS foram identificados vinte e seis compostos, todos sesquiterpenos, representando 84,03% da composição total do óleo. O principal componente foi o cis-Isolongifolano (30,16%), seguido de epi-Longipinanol (9,06%), delta-Cadineno (5,41%) e allo-Aromadendreno (5,30%), sendo cis-Isolongifolano o componente majoritário.

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

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

Embora os estudos desenvolvidos pelos autores supracitados demonstrem mais uma vez ação maior dos sesquiterpenos, em Costa *et al.* 2005 este padrão não é seguido com óleos de *Hyptis martiusii* Benth. (Labiatae), *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) e *Syzigium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae), cujos compostos majoritários são os monoterpenos 1,8-cineol, timol e eugenol, apresentando CLs₅₀ similares às reportadas por Santos *et al.* 2006 e Simas *et al.* 2004 contra larvas de *A. aegypti*.

Quando comparam-se as CL₅₀ e CL₉₅ observa-se que diterpenos poderiam ter um efeito ainda mais tóxico que sesquiterpenos para esta espécie de mosquito, como demonstrado em *Copaifera reticulata* Ducke (Fabaceae) com os diterpenóides ácido 1[(-)-3β-acetoxilabdan-8(17)-13-dien-15-oico] (CL₅₀ = 0,8 ppm e CL₉₅ = 8,2 ppm) e ácido 2{alepterolico [(-)-3β-hidroxilabdan-8(17)-13-dien-15-oico]} (CL₅₀ = 87,3 ppm e CL₉₅ = 128,8 ppm) (Geris *et al.* 2008). E provavelmente tetranortriterpenóides (azadiractina) apresentem menor efeito que monoterpenos, sesquiterpenos e triterpenos, segundo as CLs para *A. aegypti* (Wandscheer *et al.* 2004). Finalmente, observando-se os resultados descritos em Furtado *et al.* 2005 e Cavalcanti *et al.* 2004, os óleos essenciais de poucas plantas apresentam CLs com valores próximos aos determinados neste estudo, colocando as espécies estudadas entre as mais promissórias em relação a sua atividade larvídica.

TABELA 6 - Identificação dos vinte e seis compostos voláteis do óleo essencial de *Cordia curassavica* através da Análise de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS).

Composto	Resultado (%)	Kovatz ¹	C _n ^a	C _{n-1} ^b	T _n ^c	T _{n-1} ^d	T _x ^e
alpha-Ylangene	0,67	1376	15	13	41,613	32,668	36,067
beta-Elemene	0,58	1390	15	13	41,613	32,668	36,708
beta-isocomene	0,40	1408	15	13	41,613	32,668	37,483
alpha-gurjunene	0,22	1411	15	13	41,613	32,668	37,650
(E)-Caryophyllene	2,21	1420	15	13	41,613	32,668	38,033
beta-Gurjunene	2,32	1431	15	13	41,613	32,668	38,517
alpha-Humulene	0,89	1455	15	13	41,613	32,668	39,608
allo-Aromadendrene	5,30	1460	15	13	41,613	32,668	39,833
trans-Cadina-1(6),4-diene	0,96	1475	15	13	41,613	32,668	40,475
gamma-Murolene	0,45	1481	15	13	41,613	32,668	40,742
germacrene D	1,92	1488	15	13	41,613	32,668	41,075
bicyclogermacrene	2,37	1494	15	13	41,613	32,668	41,367
alpha-Murolene	1,33	1498	15	13	41,613	32,668	41,508
trans-calamenene	4,88	1511	17	15	49,623	41,613	42,042
delta-Cadinene	5,41	1519	17	15	49,623	41,613	42,358
alpha-Calacorene	0,88	1542	17	15	49,623	41,613	43,300
epi-Longipinanol	9,06	1556	17	15	49,623	41,613	43,858
beta-Calacorene	0,49	1564	17	15	49,623	41,613	44,158
germacrene D-4-ol	1,59	1570	17	15	49,623	41,613	44,417
caryophyllene oxide	0,72	1585	17	15	49,623	41,613	45,000
Viridiflorol	1,05	1598	17	15	49,623	41,613	45,525
cis-Isolongifolane	30,16	1611	17	15	49,623	41,613	46,067
epi-alpha-Murolol	1,75	1647	17	15	49,623	41,613	47,500
eudesma-4(15),7-dien-1-beta-ol	0,63	1681	17	15	49,623	41,613	48,875
eudesm-7(11)-en-4-ol	2,85	1696	17	15	49,623	41,613	49,467
???	3,03	1751	19	17	56,965	49,623	51,483
14-hydroxy-alpha-Murolene	1,91	1773	19	17	56,965	49,623	52,308
TOTAL	84,03						

¹ Índice de retenção de Kovatz; ^a Número de carbonos do alcano posterior; ^b Número de carbonos do alcano anterior; ^c Tempo de retenção do C_n; ^d Tempo de retenção do C_{n-1}; ^e Tempo de retenção do Composto X.

4. Bioensaios

4.1. Atividade Larvica dos cinco Óleos Essenciais

Quanto à atividade larvica dos cinco óleos essenciais, observou-se que todos eles apresentaram resultados significativos contra as larvas de *A. aegypti* (TABELA 7).

TABELA 7 – Análise da atividade larvica dos óleos essenciais de *Guatteria* spp., *Cordia curassavica* e *Pimenta pseudocaryophyllus* com suas respectivas concentrações letais (CL), intervalos de confiança, qui-quadrado (χ^2) e coeficiente angular (*Slope*) após leitura de 24 e 48 horas de exposição das larvas de *Aedes aegypti* aos óleos.

		G.			P.	
		<i>blepharophylla</i>	<i>G. friesiana</i>	<i>G. hispida</i>	<i>C. curassavica</i>	<i>pseudocaryophyllus</i>
24h		58,72 ppm	52,60 ppm	85,74 ppm	87,70 ppm	44,09 ppm
	CL ₅₀	(55,08 - 62,81)	(50,11 - 55,17)	(74,05 - 112,78)	(83,11 - 95,20)	(39,87 - 47,42)
		107,64 ppm	94,37 ppm	199,35 ppm	182,84 ppm	128,14 ppm
	CL ₉₅	(95,28 - 128,16)	(85,96 - 107,09)	(140,19 - 435,37)	(150,13 - 256,50)	(113,41 - 152,91)
		138,37 ppm	120,22 ppm	282,76 ppm	247,88 ppm	199,37 ppm
	CL ₉₉	(117,98 - 174,53)	(106,09 - 142,82)	(180,92 - 769,05)	(191,04 - 388,28)	(164,76 - 263,63)
	χ^2	3,20	3,58	0,31	3,26	3,36
	<i>Slope</i>	6,25 ± 0,62	6,48 ± 0,55	4,48 ± 0,89	5,15 ± 0,70	3,55 ± 0,34
48h		-	-	-	62,52 ppm	39,42 ppm
	CL ₅₀	-	-	-	(59,12 - 65,68)	(35,16 - 42,86)
		-	-	-	176,73 ppm	119,07 ppm
	CL ₉₅	-	-	-	(144,70 - 245,11)	(106,74 - 138,71)
		-	-	-	271,80 ppm	188,23 ppm
	CL ₉₉	-	-	-	(204,73 - 433,16)	(158,02 - 241,42)
	χ^2	-	-	-	7,53	3,98
	<i>Slope</i>	-	-	-	3,64 ± 0,45	3,42 ± 0,31

De entre as espécies de *Guatteria*, o óleo de *G. friesiana* foi o mais eficaz com concentrações letais (CL₅₀, CL₉₅ e CL₉₉) iguais a 52,60; 94,37 e 120,22 ppm, respectivamente. Comparando os intervalos de confiança de cada concentração letal das três espécies, observou-se que *G. hispida* não se enquadra entre as demais espécies do seu gênero, devido ao distanciamento de seus valores. Entretanto, *G. blepharophylla* e *G. friesiana* foram consideradas similares. Todos os experimentos foram ajustados ao modelo *Probit* ($p < 0,05$). A atividade larvica demonstrada pelos óleos essenciais das espécies de *Guatteria* pode ser atribuída aos compostos α -, β - e γ -eudemols presentes no óleo essencial de *G. friesiana*; óxido de cariofileno presente no óleo de *G. blepharophylla*; e α - e β -pinenos e (*E*)-cariofileno presentes no óleo de *G. hispida*, conforme trabalho publicado por Costa *et al.* 2008 [a], indicando assim, suas atividades antimicrobianas e inseticidas.

Relativamente ao óleo essencial de *Cordia curassavica* os valores das CLs_{50, 95} e₉₉ estimados foram iguais a 87,70; 182, 84 e 247,88 ppm, respectivamente. Evidenciando assim, sua eficaz ação contra as larvas do mosquito em questão, embora também possa agir em outros organismos, o que pode ser observado nos trabalhos de Ioset *et al.* 2000 [a], Kaufmann, 2002 e Santos *et al.* 2006. Muito provavelmente sejam os compostos majoritários (sesquiterpenos) os responsáveis pela atividade larvicida apresentada, atuando seja isoladamente ou sinergicamente com os outros compostos. Pois estudos demonstram que os sesquiterpenos possuem importante atividade larvicida (Simas *et al.* 2004; Yajima *et al.* 2007).

Devido a estas evidências, o número de trabalhos relacionados ao gênero *Cordia* vem gradativamente aumentando, envolvendo outras espécies do gênero. Tais como, *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken contra fungo *Cladosporium cucumerinum* e larvas de *A. aegypti* (Ioset, *et al.* 2000 [b]); *C. piauhiensis* Fresen e *C. leucomalloides* Taroda também contra larvas de *A. aegypti* (Santiago *et al.* 2005; Santos *et al.* 2005); e Arrebola *et al.* 2004 que investigaram os teores lipídicos do óleo das sementes de *C. ecalyculata* Vell., *C. myxa* L. e *C. sellowiana* Cham. para uso nas indústrias farmacêutica e alimentícia, áreas estas onde também apresentam relevante utilização.

O óleo essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* também apresentou potencial larvicida. Suas CLs_{50, 95} e₉₉ foram iguais a 44,09, 128,14 e 199,37 ppm, respectivamente.

Acredita-se que pelo fato do gênero *Pimenta* ser constituído apenas por uma única espécie no Brasil - *P. pseudocaryophyllus* – (Landrum & Kawasaki, 1997), isto leva ao desconhecimento de sua existência e da pouca informação acumulada sobre sua utilização como inseticida. No entanto, Lima *et al.* 2006 [b] avaliaram a atividade antimicrobiana do seu óleo essencial contra fungos (*Candida albicans*) e bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*). Os autores observaram bons resultados bactericidas e fungicidas no óleo desta espécie, pois encontraram em sua constituição química os compostos eugenol (71,9%) e 4-metil-eugenol (94,6%), que segundo a literatura têm propriedades contra bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (Friedman *et al.* 2002).

Santos *et al.* 2009 isolaram o composto chavibetol (35,3%) do óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus* e seguindo a mesma linha de raciocínio, Marques *et al.* (no prelo) descreveram pela primeira vez a composição química completa do óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus* através de cromatografia gasosa em espectrometria de massa e também identificaram o seu composto majoritário – o chavibetol (70,9%). Segundo Kumbar *et al.* 2006 este composto é utilizado na indústria cosmética na fabricação de perfumes, na indústria médica por suas atividades antisépticas e analgésicas, além de ter ação atrativa para insetos. Em virtude desta última propriedade estar relacionada a insetos, levantou-se a hipótese deste óleo provavelmente agir como larvicida, e após execução dos bioensaios, verificou-se tal atividade.

Assim, o tipo de composto e suas características químicas são fatores primordiais para determinar se um extrato ou óleo essencial servem como inseticida.

As FIGURAS 18 a 20 ilustram graficamente a análise *Probit* da atividade larvica dos óleos essenciais das três espécies de *Guatteria* sobre as larvas de *A. aegypti* após 24 horas de exposição. Nestes gráficos observa-se que a partir da concentração em log 1,6 tem-se um aumento mais acentuado da mortalidade das larvas. Observa-se também que o óleo essencial de *Guatteria blepharophylla* comporta-se um pouco diferente, em relação aos óleos das outras duas plantas. Nas concentrações mais reduzidas o efeito inseticida é discreto com sua ação mais efetiva ocorrendo a partir de 1,6. Assim, pode-se dizer que todos os três óleos têm compartimento similar sobre a mortalidade das larvas de *A. aegypti*.

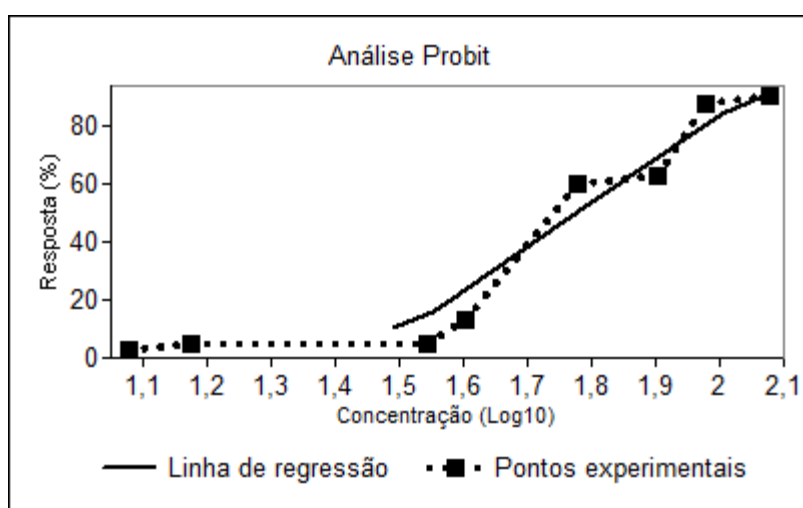


FIGURA 18 – Ilustração gráfica da análise *Probit* da atividade larvica do óleo essencial de *Guatteria blepharophylla* sobre larvas de *Aedes aegypti*, após 24 horas de exposição ao tratamento.

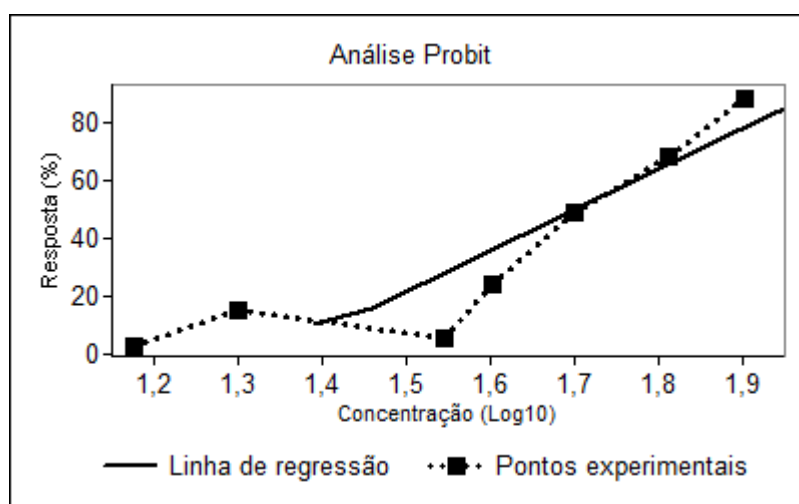


FIGURA 19 – Ilustração gráfica da análise *Probit* da atividade larvica do óleo essencial de *Guatteria friesiana* sobre larvas de *Aedes aegypti*, após 24 horas de exposição ao tratamento.

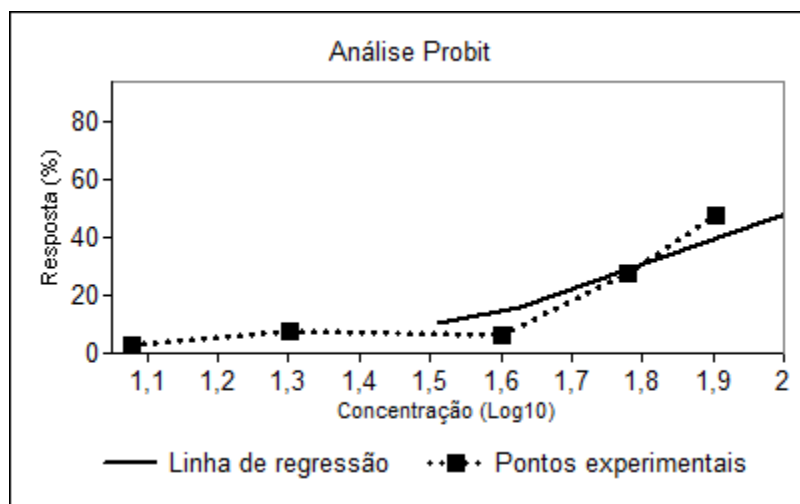


FIGURA 20 – Ilustração gráfica da análise *Probit* da atividade larvicida do óleo essencial de *Guatteria hispida* sobre larvas de *Aedes aegypti*, após 24 horas de exposição ao tratamento.

As FIGURAS 21 e 22 ilustram graficamente a análise *Probit* da atividade larvicida dos óleos essenciais das espécies de *Cordia curassavica* e *Pimenta pseudocaryophyllus*, sobre as larvas após 24 e 48 horas de exposição, respectivamente. Os gráficos demonstram a relação direta entre o aumento da concentração e a taxa de mortalidade das larvas, ou seja, seus efeitos larvicidas são observados já nas concentrações iniciais.

Assim, em todos os gráficos (FIGURAS 18 a 22) as retas da regressão linear encontraram-se bem ajustadas ao modelo matemático confirmando que os resultados encontrados são previsíveis. Mostram que os dados obtidos em relação aos esperados estão muito próximos, ou seja, os pontos estão bem ajustados a uma linha de regressão (nível de confiança de 95%) o que influencia nos estreitos intervalos das concentrações letais (TABELA 7). Relativamente aos valores do χ^2 e do *slope*, isto indica que existe uma heterogeneidade sistemática dos dados, isto é, vários pontos consecutivos acima ou abaixo da linha calculada.

Portanto, os resultados mostram a eficácia como larvicida dos óleos essenciais das espécies vegetais testadas.

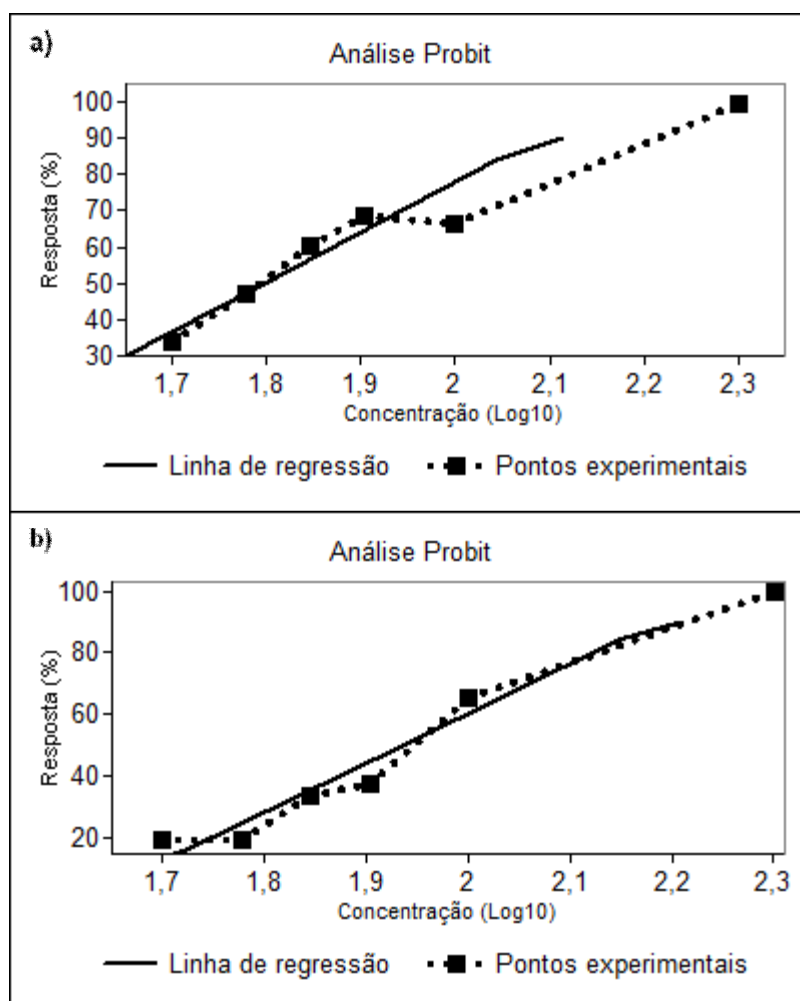


FIGURA 21 – (a) Ilustração gráfica da análise *Probit* da atividade larvicida do óleo essencial de *Cordia curassavica* sobre larvas de *Aedes aegypti*, após 24 horas de exposição ao tratamento e (b) após 48 horas de exposição.

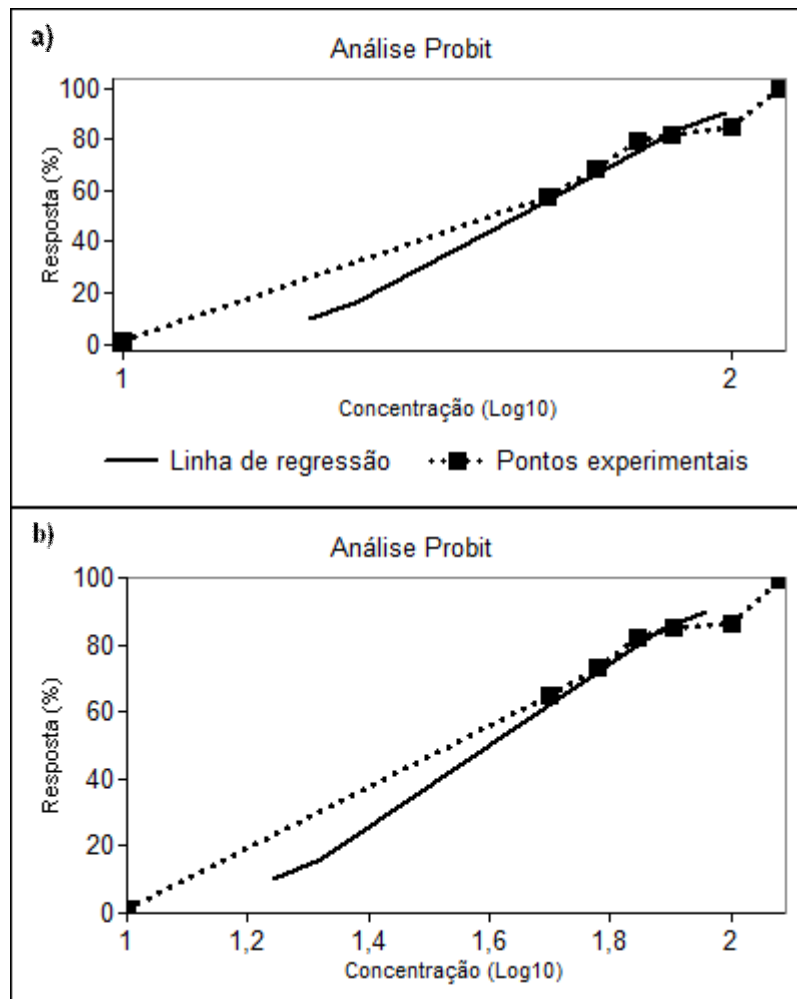


FIGURA 22 – (a) Ilustração gráfica da análise *Probit* da atividade larvicida do óleo essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* sobre larvas de *Aedes aegypti*, após 24 horas de exposição ao tratamento e (b) após 48 horas de exposição.

4.2. Período de Atividade Larvícida dos Óleos Essenciais de *Cordia curassavica* e *Pimenta pseudocaryophyllus*

O período de atividade larvícida determinou o tempo de ação em que os óleos essenciais atuaram sobre as larvas de *A. aegypti* em relação as concentrações letais CL_{10} e CL_{50} (CL_{10} = 18,34 ppm e CL_{50} = 43,35 ppm) – previamente calculadas.

Na literatura consultada não foi comum encontrar estudos que realizassem esta abordagem. Na grande maioria dos trabalhos era feita unicamente a avaliação da atividade larvícida de determinado óleo essencial, concluindo, apenas, o quanto potencialmente este era eficaz. Porém, o presente estudo se propôs também acompanhar o período da atividade larvícida dos óleos essenciais de *C. curassavica* e *P. pseudocaryophyllus* a cada duas horas, num intervalo de 10 horas e 24 horas após a análise ter sido iniciada.

Observou-se em *C. curassavica* que a concentração que causa mortalidade de 10% (CL_{10}), atuou sobre as larvas nas 24 horas de exposição destas ao tratamento. Já o efeito letal da CL_{50} do mesmo óleo deu início a partir da quarta hora de exposição, embora sua ação começou intensivamente sobre as larvas oito horas após o início do tratamento, alcançando seu efeito propriamente dito às 24 horas (FIGURA 23). Houve diferença significativa na CL_{10} ($\chi^2 = 13$ e $p < 0,05$), da mesma forma para a CL_{50} ($\chi^2 = 12$ e $p = 0,05$).

Já para o óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus*, a CL_{10} começou a atuar sobre as larvas a partir da sexta hora, intensificando-se e 24 horas de exposição ao tratamento. Enquanto na CL_{50} , a mortalidade ocorreu a partir da segunda hora de exposição, com maior mortalidade na quarta hora. A análise mostra que não ocorrem diferenças significativas na porcentagem não acumulada de mortalidade na CL_{10} ($\chi^2 = 13$ e $p < 0,05$), enquanto para CL_{50} ($\chi^2 = 7,5$ e $p > 0,05$) há diferença significativa (FIGURA 24).

Resultados estes que divergem de Prophiro 2008. A autora submeteu larvas de 3º instar inicial ou 4º final de mosquitos *A. aegypti* a diferentes concentrações de dois óleos essenciais das espécies vegetais *Carapa guianensis* (Aublet) (Meliaceae) e *Copaifera* sp. (Linnaeus) (Leguminosae). Foi analisado o efeito letal nas 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas. Em seus resultados foi observado que o efeito letal dos óleos sobre as larvas ocorreu principalmente entre as duas ou três primeiras horas de exposição destas aos óleos.

No entanto, os nossos resultados corroboram com Amer & Mehlhorn 2006 [a]. Os autores avaliaram a potencialidade larvícida de 41 óleos essenciais, analisando esse efeito após 1, 12 e 24 horas. Mais de 48% destes óleos só agiram após 12 horas de exposição, ou seja, não durante as primeiras horas, tal como Prophiro *et al.* 2008. Porém, deve-se levar em conta que os autores citados investigaram plantas diferentes, com talvez princípios ativos diferentes.

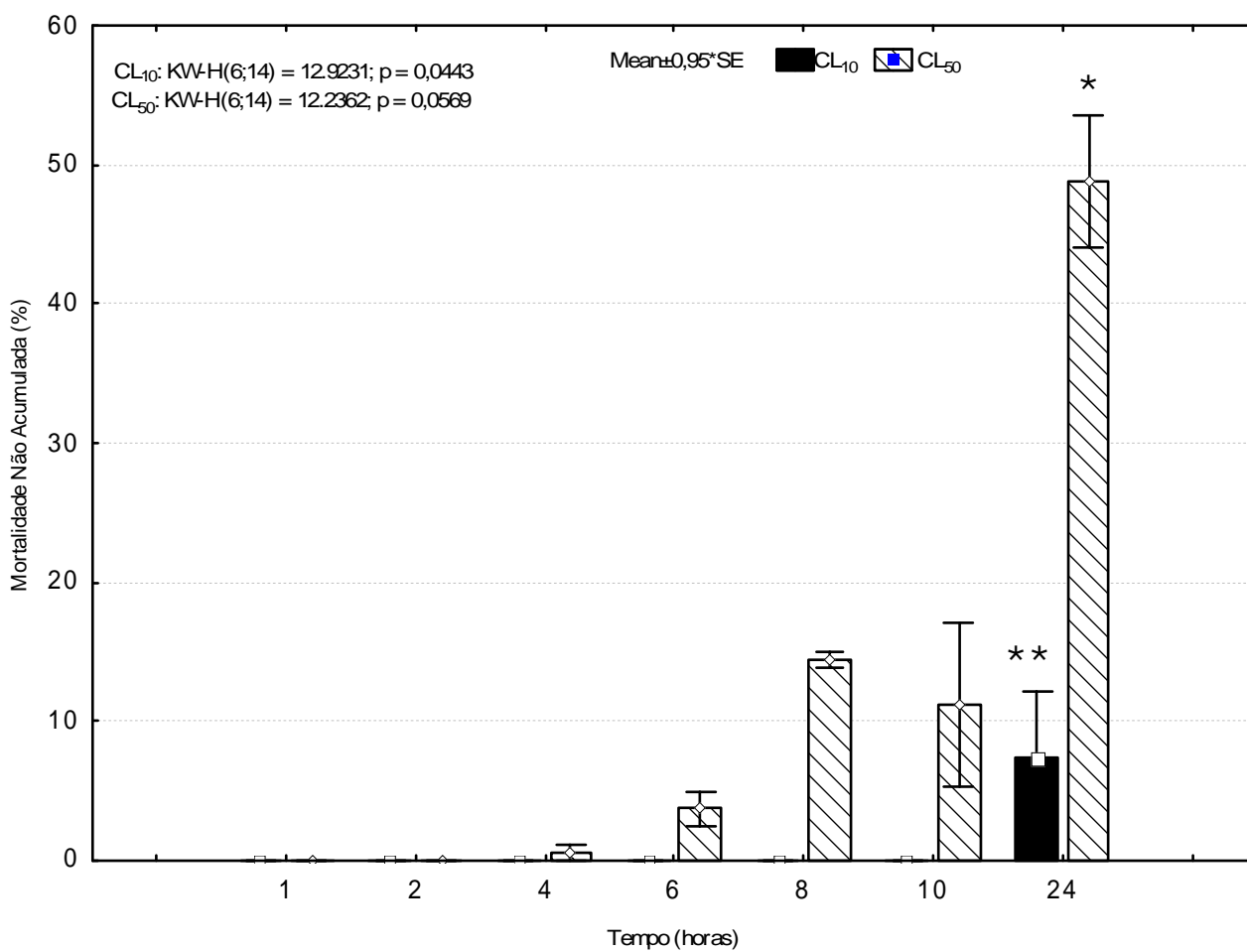
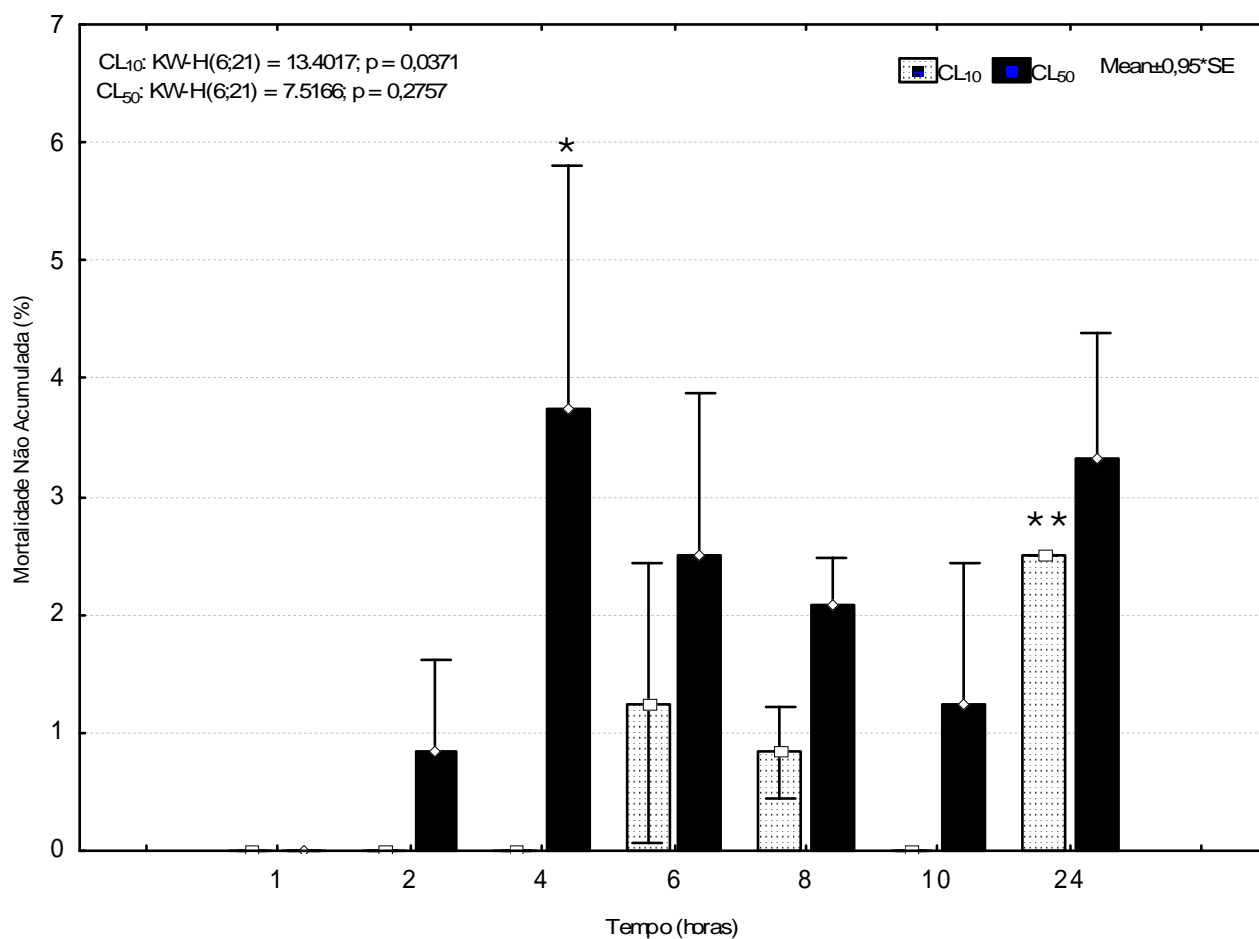


FIGURA 23 – Mortalidade Não Acumulada no Período de Atividade Larvica analisado em 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas após a exposição das larvas de *Aedes aegypti* ao óleo essencial de *Cordia curassavica* nas concentrações CL₁₀ e CL₅₀.



* Não difere significativamente dos intervalos 2, 6, 8, 10 e 24 na CL₅₀ pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, p > 0,05
 ** Difere significativamente dos intervalos 1, 2, 4, 6, 8 e 10 na CL₁₀ pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, p < 0,05

FIGURA 24 – Mortalidade Não Acumulada no Período de Atividade Larvica analisado em 1, 2, 4, 6, 8 10 e 24 horas após a exposição das larvas de *Aedes aegypti* ao óleo essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* nas concentrações CL₁₀ e CL₅₀.

Nossos resultados também corroboram com Amer & Mehlhorn 2006 [b], onde os autores analisando a ação larvicida de 13 óleos perceberam que estes atuaram de forma menos intensificada com o passar das horas e semanas – fator também investigado.

Em nosso estudo, o tempo de exposição foi importante para os valores das CLs₅₀. Estes valores tiveram uma relação inversamente proporcional ao tempo, ou seja, a toxicidade diminuiu rapidamente com o tempo, o que foi ratificado na pesquisa semelhante dos autores.

Estes dados fazem supor que, os referidos óleos não iniciam seu efeito larvicida sobre as larvas de 3º instar final e 4º instar inicial de *A. aegypti* nas primeiras horas de exposição destas ao tratamento, mas sim em quatro a oito horas após esta exposição ter sido iniciada, atingindo o efeito letal correspondente a determinada concentração 24 horas após início.

Acredita-se que, por se tratar de substâncias derivadas de plantas estas estão sujeitas a alterações na sua composição devido ao fato dos óleos essenciais serem voláteis, sensíveis à luminosidade, estocagem, entre outros fatores. Os compostos voláteis dos óleos essenciais têm um papel importante para produzir toxicidade, da mesma forma que eles também evaporam rapidamente quando armazenados e expostos por longos períodos de tempo.

4.3. Efeito Sub letal

O bioensaio do efeito sub letal pretendeu analisar a ação das concentrações CL₁₀ e CL₅₀ (CL₁₀ = 18,34 ppm e CL₅₀ = 43,35 ppm) nos organismos envolvidos neste estudo, uma vez que estas não são totalmente letais quando aplicadas. Para isto, usaram-se os óleos essenciais de *C. curassavica* e *P. pseudocaryophyllus*.

Os experimentos do efeito sub letal com *C. curassavica* na concentração CL₁₀ duraram cerca de 11 dias ($\pm 1,41$), já com a concentração CL₅₀ duraram 07 dias ($\pm 1,41$). Durante todos estes dias os indivíduos foram acompanhados e observado seu comportamento, se conseguiram desenvolver-se e atingir o estágio adulto. No experimento da CL₁₀, ao final de 11 dias, das 160 larvas expostas a esta concentração, houve uma mortalidade de 66,8%. Entre as que conseguiram desenvolver-se, 53 transformaram-se em pupas, porém ocorreu uma mortalidade de 2,5% ainda neste estágio e 26,8% finalmente chegaram a adulto. Já no experimento da CL₅₀, ao final dos 07 dias, a mortalidade foi de 98,75% das larvas expostas, com 1,25% atingindo o estágio adulto. No grupo controle os experimentos duraram 14,5 dias ($\pm 2,12$) e houve apenas mortalidade de duas larvas e uma pupa. Caso a mortalidade no grupo controle estivesse entre 5% a 20%, esta seria reajustada pela fórmula de Abbott ou então descartado todo o experimento, segundo recomendações da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1981 [a, b]) (TABELA 8).

Os experimentos do efeito sub letal com *P. pseudocaryophyllus* na concentração CL₁₀ duraram cerca de 18 dias ($\pm 1,53$), já com a concentração CL₅₀ duraram 15 dias ($\pm 3,5$). Durante todos estes dias os indivíduos também foram acompanhados e observado seu comportamento, e se conseguiram atingir o estágio adulto. Na CL₁₀, ao final de 18 dias, das 240 larvas expostas a esta concentração, a mortalidade foi de 14,17%. Entre as que conseguiram se desenvolver, 206 transformaram-se em pupas, porém ocorreu mortalidade de 17,5% ainda neste estágio e 68,33% finalmente chegaram a adulto. Já no experimento da CL₅₀, ao final dos 15 dias, a mortalidade das larvas expostas foi de 54,2%. Contudo, 6,2% se desenvolveram em pupas, e também morreram, e 39,6% emergiram para adultos. No grupo controle os experimentos duraram 20 dias ($\pm 5,7$) e não houve nenhuma mortalidade (TABELA 8).

Espécimes de *A. aegypti* foram expostos a concentrações sub letais de inseticidas químicos por Adanan *et al.* 2005 e a inseticidas sintéticos e extratos de *Callitris glaucophylla* Thompson & Johnson 1986 (Cupressaceae) por Shaalan *et al.* 2005 [b], onde demonstrou-se que, mesmo não sendo fatal, estas concentrações sub letais conduzem a uma desordem na biologia do inseto, morfologicamente e fisiologicamente falando, atuando no tempo de duração de larvas e pupas expostas a estas concentrações refletindo na emergência de adultos.

Assim, acredita-se que concentrações sub letais podem servir como eficaz ferramenta em novas estratégias de controle aos vetores e inibir a resistência aos inseticidas sintéticos existentes (Haynes, 1988) e reforça o interesse que estas podem acarretar à indústria, independente do produto a ser manipulado.

TABELA 8 – Tempo de duração dos experimentos do Efeito Sub Letal dos óleos essenciais de *Cordia curassavica* e *Pimenta pseudocaryophyllus* nas concentrações letais CL₁₀ e CL₅₀, apresentando o percentual das mortalidades larval, pupal e emergência de adultos.

Óleos Essenciais		Duração do Experimento (Dias)	Mortalidade das Larvas (%)	Mortalidade das Pupas (%)	Emergência de Adultos (%)
<i>Cordia curassavica</i>	CL ₁₀	11	66,8	2,5	26,8
	CL ₅₀	07	98,75	-	1,25
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	CL ₁₀	18	14,17	17,5	68,33
	CL ₅₀	15	54,2	-	39,6

4.4. Calibração do DMSO - dimetilsulfóxido (CH₃)₂SO

Por se apresentarem, geralmente, na forma oleosa esses derivados das plantas não são solúveis em água após sua extração e se faz necessário o uso de substâncias que possam solubilizá-los para realização de estudos laboratoriais e bioensaios. Existem, portanto, na literatura muitos trabalhos que para este fim, fazem uso de DMSO.

Este é solvente eficiente que solubiliza substâncias insolúveis tanto em água como em meios orgânicos devido a sua molécula ser anfipática com grande domínio polar e apresentar dois grupos metil, apolares (Santos *et al.*, 2003). Portanto, é amplamente utilizado nas áreas médicas e farmacológicas. O mesmo autor citou os aspectos farmacológicos, celulares e moleculares causados pela administração do DMSO em humanos e animais de laboratório, os quais variaram desde ação anti-inflamatória, ação oxidante, até seu uso no tratamento de diversas doenças. No entanto, não está livre de efeitos colaterais, mesmo em pequenas doses (Melo, *et al.* 2008).

Em virtude do conhecimento de algumas desvantagens ao uso do DMSO, surgiu a preocupação se este solvente poderia interferir nos resultados de mortalidade das larvas no estudo em questão. Assim, paralelamente à execução dos bioensaios realizou-se a calibração do produto em concentrações que variaram de 1 a 5%, e após calibração e análise *Probit* verificou que de fato, a utilização deste a 1% em relação ao volume total de 200 ml utilizados nos bioensaios não causou mortalidade das larvas (TABELA 9). A literatura aponta trabalhos que utilizam percentagens relativamente elevadas de DMSO nos bioensaios quando comparados aos nossos (Ioset *et al.* 2000 [b]; Costa *et al.* 2005; Furtado *et al.* 2005; Moraes *et al.* 2006), embora também seja possível encontrar aqueles que utilizem concentração semelhante a este estudo (Cavalcanti *et al.* 2004; Rodrigues *et al.* 2006; Omena *et al.* 2007).

Em estudos desta natureza é relevante realizar a calibração do solvente utilizado a fim de elucidar que o uso do produto não está contribuindo com a mortalidade e o resultado encontrado seja somente atribuído aos óleos essenciais.

TABELA 9 – Análise *Probit* da calibração do DMSO exibindo CL₅₀ e CL₉₉, intervalos de confiança, qui-quadrado e *slope*.

DMSO	
%	
CL ₅₀	4,70 (4,45 - 5,00)
CL ₉₉	12,66 (10,71 - 15,87)
xi ²	0,72
<i>Slope</i>	5,40 ± 0,42

4.5. Alterações Comportamentais e Morfológicas das Larvas

Acredita-se que observar as alterações morfológicas e comportamentais de larvas submetidas a tratamentos com derivados de plantas seja relevante, pois provavelmente levará a um amplo esclarecimento da ação tóxica dos óleos essenciais sobre larvas de culicídeos. Afinal, apresentando indicações da forma de atuação no organismo das larvas, pode-se potencializar os seus efeitos e produzir um inseticida de elevada efetividade e que não interfira em outros organismos e nem no meio ambiente.

Nossos resultados demonstram que em ambos os experimentos, as larvas apresentaram padrões de alterações comportamentais e morfológicas, os quais são descritos e ilustrados a seguir.

As larvas-controle (FIGURA 28 [a]) apresentaram aspecto vermiforme, alongado e coloração esbranquiçada, como normalmente se apresentam. Sifão respiratório curto e tubular, com cerdas bem definidas na superfície do corpo, exibindo uma morfologia robusta e demarcada.

Nos primeiros momentos de contato das larvas com a solução contendo óleo de *P. pseudocaryophyllus*, estas mantiveram-se ativas semelhante ao estudo de Chaitong *et al.* 2006. Entretanto, alterações comportamentais foram observadas posteriormente, as quais caracterizaram-se por movimentos natatórios acelerados e/ou lentos, movimento corporal serpentiforme, mesmo quando estimuladas, corroborando desta forma com os autores. Observou-se, todavia em ambas as concentrações e em ambos os experimentos, que essas mesmas larvas continuaram a se alimentar normalmente, apenas diminuindo a intensidade quando comparadas ao controle, onde praticamente não foi observado restos de alimento.

Morfolologicamente, as larvas expostas à CL₁₀ deste mesmo óleo apresentaram alterações no tamanho do corpo (aspecto encolhido) e aspecto curvado, concordando em parte com Barreto *et al.* 2006 que também fizeram uso de extrato botânico. Já na CL₅₀ as larvas exibiram escurecimento das partes posteriores do corpo, além de esticamento do corpo, nomeadamente no cérvix (conectivo das regiões cefálica e torácica) (FIGURA 29 [a, b]). Estes resultados são similares a Abed *et al.* 2007 onde os autores também investigaram as alterações causadas por óleo essencial, embora tenha sido de *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae) em larvas de *A. aegypti*. Em nossos resultados também observaram-se larvas letárgicas. Segundo os mesmos autores, este escurecimento ocorre, provavelmente, em virtude da sobreposição das cutículas dos segmentos abdominais.

Já para o óleo essencial de *C. curassavica* na concentração CL₁₀ as larvas exibiram leve escurecimento dorso- posterior. Enquanto na CL₅₀ as larvas mostraram forte escurecimento na cápsula cefálica e em ambas as extremidades do corpo, acentuando o escurecimento nas papilas anais. Além de desordem comportamental a partir da quarta hora de exposição a esta mesma concentração (FIGURA 30 [a, b]). Aparentemente as alterações na morfologia das larvas assemelharam-se nas duas concentrações.

Borges *et al.* 2004, no entanto, investigaram a ação de reguladores de crescimento de insetos (IGR – Insect Grow Regulator) – o diflubenzuron – sobre larvas de *A. aegypti*. Este tipo de inseticida ocasiona alterações fisiológicas e morfológicas interferindo no ciclo larval, pois age na ecdise do inseto entre uma mudança e outra de fase (Awad & Mulla, 1984) e interrompendo o desenvolvimento e o crescimento ao invés da intoxicação direta (Martins & Silva, 2004).

Os autores submeteram as larvas a duas diferentes concentrações de diflubenzuron e estas apresentaram comportamentos e alterações morfológicas semelhantes aos descritos neste trabalho. Outros estudos desta natureza também têm sido realizados com outras espécies de mosquitos de interesse à Saúde Pública como *Anopheles gambiae* (Kihampa *et al.* 2009) utilizando reguladores de crescimento de insetos, como em *Anopheles stephensi* (Sharma *et al.* 2006) utilizando o fitoextrato de *Artemisia annua* L. (Asteraceae), *Chenopodium álbum* L. (Amaranthaceae) e *Sonchus oleraceus* L. (Asteraceae).

Percebe-se portanto, que tanto os produtos botânicos quanto os inseticidas reguladores do crescimento alteram consideravelmente a morfologia e a fisiologia das larvas. Provavelmente este comportamento letárgico deve-se a ação destas substâncias no sistema nervoso da larva, deixando-a incapaz de movimentar-se normalmente. O esticamento, encurtamento e/ou encurvamento do corpo pode ser causado por contrações musculares.

Já o escurecimento das suas extremidades, possivelmente, se dar devido sobreposição das cutículas dos segmentos abdominais como foi levantado por Abed *et al.* 2007.



FIGURA 25 – Aspectos morfológicos das larvas (a) e das pupas (b) de *A. aegypti* pertencentes ao tratamento controle. A imagem da larva foi aumentada em 25x e da pupa em 20x, ambas numa escala de 1mm. Fonte: A autora.



FIGURA 26 – Aspectos morfológicos das larvas de *A. aegypti* expostas à concentração CL₁₀ do óleo de *Pimenta pseudocaryophyllus* (a) e das larvas expostas à concentração CL₅₀ do mesmo óleo essencial (b). As imagens (a) das larvas foram aumentadas em 40x e em (b) em 25x, todas numa escala de 1mm. Fonte: A autora.



FIGURA 27 – Aspectos morfológicos das larvas de *A. aegypti* expostas à concentração CL₁₀ do óleo de *Cordia curassavica* (a) e das larvas expostas à concentração CL₅₀ do mesmo óleo essencial (b). Todas as imagens das larvas foram aumentadas em 20x e escala de 1mm.

Em relação às pupas, normalmente estas permanecem imóveis, contudo quando perturbadas ficam agitadas e se movimentam de forma muito rápida. Aquelas pupas que tiveram contato com as soluções contendo os óleos essenciais, quando comparadas ao tratamento controle não apresentaram este tipo de comportamento e estiveram mais tempo na interface entre a superfície da solução. Por vezes, na solução que continha o óleo essencial de *C. curassavica*, foram encontradas pupas mortas com deformações e sinais de despigmentação. Esta mortalidade e deformações aconteceram antes da formação da pupa (pré-pupa) ou no momento de transição à fase adulta do inseto (FIGURA 31 [a, b]).

Estes resultados são ratificados com o trabalho de Costa 2007 em que o autor investigou a ação de diflubenzuron sobre larvas de *Anopheles darlingi* Root 1926, e apesar de serem substâncias diferentes atuando em culicídeos diferentes, os resultados imensamente assemelharam-se, quando o autor menciona o acometimento de pupas incompletamente formadas, coloração clara com pouca melanização e pupas que não se transformaram completamente em adultos, ficando presos à exúvia. Tudo isto reforça a especulação anteriormente já citada sobre a possível analogia entre o efeito dos derivados de plantas e outras substâncias como os reguladores de crescimento dos insetos.



FIGURA 28 – Aspectos morfológicos das pupas despigmentadas (a) e das pupas com formação de adulto ficando preso à exúvia (b) submetidas às concentrações CL₁₀ do tratamento com o óleo essencial de *C. curassavica*. As imagens foram aumentadas em 20 e 25x, respectivamente, ambas numa escala de 1mm. Fonte: A autora.

As observações para os adultos foram quanto à emergência dos adultos, nomeadamente ao dimorfismo sexual. A emergência de indivíduos machos (67,4%) foi maior que a de indivíduos fêmeas (32,6%), corroborando com Forattini 2002 que descreve que os primeiros 10% de indivíduos que emergem são machos. Portanto, este padrão não foi alterado. Já quanto ao aspecto morfológico, os adultos que conseguiram emergir não apresentaram alterações morfológicas visíveis.

Os bioensaios realizados ofereceram excelentes resultados quanto ao potencial ativo dos cinco óleos sobre as larvas de *A. aegypti*. Diante dos experimentos apresentados conclui-se que os óleos têm forte atividade larvicida, e mesmo sobrevivendo algumas larvas, estas têm seu desenvolvimento alterado, sendo interrompido na fase pupal e/ou adulto. E dos adultos que ainda possam sobreviver, estes ficam vulneráveis. Estas observações são importantes no que diz respeito a controle biológico pois acarretam em alterações bioecológicas. Assim como, abrem possibilidade de mais investigações da eficiência das propriedades larvicidas destes óleos essenciais.

As plantas da flora brasileira estudadas neste trabalho, sendo ricas em óleos essencial que contêm em sua estrutura os monoterpenos como α e β -pinenos, os sequiterpenos como o cis-Isolongifolano são alternativas interessantes que podem ser usadas para o controle de larvas do mosquito *A. aegypti*, oferecendo um método de controle mais seguro ambientalmente do que o uso de inseticidas químicos.

Diante dos resultados dos compostos majoritários presentes nos óleos essenciais é sugerido então, elaborar formulações que possam ser produzidas sinteticamente e comercializadas, posteriormente utilizadas como alternativa natural para o controle vetorial.

Este estudo demonstrou e enfatizou a potencialidade de Annonaceae, Boraginaceae e Myrtaceae contra larvas de *A. aegypti* e seu benefício ao desenvolvimento de novos tipos de larvicidas usados no controle vetorial.

Num trabalho que envolva o uso de produtos derivados de plantas como inseticidas, é importante estudar a composição química destes produtos. Pois através deste tipo de abordagem pode inferir ao certo quais compostos possivelmente estão atuando sobre o inseto, se de forma sinérgica ou isolada.

Tendo em vista que existe um aumento de populações resistentes de *A. aegypti* a inseticidas, se faz necessário no controle de mosquitos encontrar candidatos que substituam os pesticidas químicos por outros produtos que tenham efetividade inseticida comprovada e também que sejam ambientalmente seguros. Novos registros de plantas com poder biológico surgem dia-a-dia com esta característica e podem ser incorporados ao combate de culicídeos.

Em virtude de mosquitos vetores de doença afetarem milhares de pessoas em todo o mundo a cada ano, são necessárias pesquisas com produtos à base de plantas com potencial larvicida, nomeadamente com óleos essenciais, visto que estes exercem resultados diversos sobre as diferentes fases de vida dos mosquitos servindo como uma nova alternativa de controle de vetores.

- Abed, R. A.; Cavasin, G. M.; Silva, H. H. G. da; Geris, R. & Silva, I. G. da. 2007. Alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeu, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pela atividade larvívica do óleo-resina da planta medicinal *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae). **Revista de PatologiamTropical** **36** (1): 75-86.
- Acosta-Bas, C. & Gómez-Cordero, I. 2005. Biología y métodos diagnosticos del dengue. **Revista Biomédica** **16** (2): 113 – 117.
- Adanan, C. R.; Zairi, J. & Ng, K. H. 2005. Efficacy and sublethal effects of mosquito mats on *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Proceedings of the Fifth International Conference on Urban Pests**: 265-269.
- Ahmad, R.; Chu, W.; Lee, H. & Phang, S. 2001. Effect of four chlorophytes on larval survival, development and adult body size of the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Applied Phycology** **13**: 369-374.
- Akisue, G.; Oliveira, F.; Akisue, M. K. & Mancini, B. 1983. Caracterização farmacognóstica da droga e tintura de *Cordia verbenaceae* AC. DC: Boraginaceae. **Revista de Farmácia e Bioquímica da USP** **5** (2): 69-82.
- Alali, F. Q.; Liu, X. & McLaughlin, J. L. 1999. Annonaceous acetogenis: recent progress. **Journal of Natural Products** **62**: 504-540.
- Albuquerque, C. M. R. de; Melo-Santos, M. A. V.; Bezerra, M. A. S.; Barbosa, R. M. R.; Silva, D. F. S. & Silva, E. da. 2000. Primeiro registro de *Aedes albopictus* em área de Mata Atlântica, Recife, PE, Brasil. **Revista de Saúde Pública** **34** (3): 314-315.
- Alencar, J. W.; Craveiro, A. A.; Matos, F. J. A. & Machado, M. I. L. 1990. Kovats indices simulations in essential oil analysis. **Química Nova** **13** (4): 282-284.
- Amer, A. & Mehlhorn, H. 2006 [a]. Larvicidal effects of various essencial oils against *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). **Parasitology Research** **99**: 466-472.
- Amer, A. & Mehlhorn, H. 2006 [b]. Persistency of larvicidal effects of plant oli extracts under different storage conditions. **Parasitology Research** **99**: 473-477.
- Ansari, M. A.; Mittal, P. K.; Razdan, R. K. & Sreehari, U. 2005. Larvicidal and mosquito repellent activities of Pine (*Pinus longifolia*, Family: Pinaceae) oil. **Journal of Vector Borne Diseases** **42**: 95-99.
- Araújo, J. S. de. 2007. Desenvolvimento vegetal, produção e composição química do óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae) em função do fornecimento de N, P, K e B e da aplicação de ácido Jasmônico. **Dissertação de Mestrado**. 85p. Universidade Estadual de Campinas.
- Arrebola, M. R. B.; Peterlin, M. F.; Bastos, D. H. M.; Rodrigues, R. F. de O. & Carvalho, P. de O. 2004. Estudo dos compostos lipídicos das sementes de três espécies do gênero *Cordia* L. (Boraginaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** **14** (1): 57-65
- Autran, E. S.; Neves, I. A.; Silva, C. S. B. da; Santos, G. K. N.; Câmara, C. A. G. da; & Navarro, D. M. A. F. 2009. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essencial oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Bioresource Technology** **100**: 2284-2288.
- Awad, T. I. & Mulla, M. S. 1984. Morphogenetic and histopathological effects of the insect growth regulator cyromazine in larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae). **Journal of Medical Entomology** **21** (4):427-431.
- Barero, A. F.; Molina, J.; Oltra, J. E.; Altarejos, J.; Barragán, A.; Lara, A.; Segura, M. 1995. Stereochemistry of 14-hydroxy- β -caryophyllene and related compounds. **Tetrahedron** **51** (13): 3813-3822.
- Barreto, C. F. 2005. *Aedes aegypti* – resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos** **1** (2): 62-73.

- Barreto, C. F.; Cavasin, G. M.; Silva, H. H. G. da & Silva, I. G. da. 2006. Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponária* Lin. (Sapindaceae). **Revista de Patologia Tropical** **35** (1): 37-57.
- Beserra, E. B.; Fernandes, C. R. M.; Queiroga, M. de F. C. de & Castro-Junior, F. P. de. 2007. Resistência de populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefós na Paraíba. **Neotropical Entomology** **36** (2): 303-307.
- Biber, P. A.; Dueñas, J. R.; Almeida, F. L.; Gardenal, C. N. & Almirón, W. R. 2006. Laboratory evaluation of susceptibility of natural subpopulations of *Aedes aegypti* larvae to temephos. **Journal of the American Mosquito Control Association** **22** (3): 408-411.
- Bisset, J. A. 2002. Uso de la insecticidas: control de la resistencia. **Revista Cubana de Medicina Tropical** **54** (3): 202-219.
- Borges, R. A.; Cavasin, G. M.; Silva, I. G. da; Arruda, W.; Oliveira, E. S. F. de; Silva, H. H. G. da. & Martins, F. 2004. Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora de diflubenzuron na ecdise de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista de Patologia Tropical** **33** (1): 91-104.
- Bosio, C. F.; Fulton, R. E.; Salasek, M. L.; Beaty, B. J. & Black IV, W. C. 2000. Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. **Genetics** **156**: 687-698.
- Boyom, F. F.; Ngouana, V.; Zollo, P. H. A.; Menut, C.; Bessiere, J. M.; Gut, J. & Rosenthal, P. J. 2003. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. **Phytochemistry** **64**: 1269-1275.
- Braga, I. A.; Lima, J. B. P.; Soares, S. da S. & Valle, D. 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the State of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **99** (2): 199-203.
- Braga, I. A. & Valle, D. 2007 [a]. *Aedes aegypti*: histórico de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, **16** (2): 113-118.
- Braga, I. A. & Valle, D. 2007 [b]. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** **16** (4): 295-302.
- Brown, A. W. A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. **Journal of the American Mosquito Control Association** **2**: 123-140.
- Câmara, F. P.; Theophilo, R. L. G.; Santos, G. T. dos; Pereira, S. R. F. G.; Câmara, D. C. P. & Matos, R. R. C. de. 2007. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **40** (2): 192-196.
- Cardoso, C. M. V. & Sajo, M. das G. 2006. Nervação foliar em espécies brasileiras de Myrtaceae Adans. **Acta Botanica Brasilica** **20** (3): 675-669.
- Carvalho, A. F. U.; Melo, V. M. M.; Craveiro, A. A.; Machado, M. I. L.; Batim, M. B. & Rabelo, E. F. 2003. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **98** (4): 569-571.
- Castro, M. G. de; Nogueira, R. M. R.; Schatzmayr, H. G.; Miagostovich, M. P. & Lourenço-de-Oliveira, R. 2004. Dengue virus detection by using Reverse Transcription-Polymerase Chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **99** (8): 809-814.
- Cavalcanti, E. S. B.; Morais, S. M. de; Lima, M. A. A. & Santana, E. W. P. 2004. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **99** (5): 541-544.

- Chaitong, U.; Choolote, W.; Kamsuk, K.; Jitpakdi, A.; Tippawangkosol, P.; Chaivasit, D.; Champakaew, D.; Tuetun, B. & Pitasawat, B. 2006. Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology** **31** (1): 138-144.
- Chaivasit, D.; Choochote, W.; Rattanachanpichai, E.; Chaithong, U.; Chaiwong, P.; Jitpakdi, A.; Tippawangkosol, P.; Riyong, D. & Pitasawat, B. 2006. Essential oils as potential adulticides against two populations of *Aedes aegypti*, the laboratory and natural field strains, in Chiang Mai province, Northern Thailand. **Parasitology Research** **99**: 715-721.
- Chávez, J.; Vargas, J. & Vargas, F.. 2005. Resistencia a deltametrina en dos poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) del peru. **Revista Peruana de Biología** **12** (1): 161-164.
- Cheng, S. S.; Liu, J. Y.; Tsai, K. H.; Chen, W. J. & Chang, S. T. 2004. Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* provenances. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **52**: 4395-4400.
- Cheng, S.; Huang, C.; Chen, Y.; Yu, J.; Chen, W. & Chang, S. 2008. Chemical composition and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. **Bioresource Technology**: 1-5.
- Consoli, R. A. G. B. & Lourenço-de-Oliveira, R. 1994. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora FioCruz. Fundação Oswaldo Cruz. 225p.
- Costa, J. G. M.; Rodrigues, F. F. G.; Angélico, E. C.; Silva, M. R.; Mota, M. L.; Santos, N. K. A.; Cardoso, A. L. H. & Lemos, T. L. G. 2005. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **15** (4): 304-309.
- Costa, F. M. 2007. Avaliação da atividade inseticida do regulador de crescimento de insetos diflubenzuron contra *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Dissertação de Mestrado**. 73p. Universidade Federal do Amazonas.
- Costa, E. V.; Teixeira, S. D.; Marques, F. A.; Duarte, M. C. T.; Delarmelina, C.; Pinheiro, M. L. B.; Trigo, J. R. & Maia, B. H. L. N. S. 2008 [a]. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatteropsis* species. **Phytochemistry** **69**: 1895-1899.
- Costa, J. F. O.; David, J. P. L.; David, J. M.; Giulietti, A. M.; Queiroz, L. P.; Santos, R. R. & Soares, M. B. P. 2008 [b]. Immunomodulatory activity of extracts from *Cordia superba* Cham. and *Cordia ryfescens* A. DC. (Boraginaceae), plant species native from Brazilian semi-arid. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **18** (1): 11-15.
- Costa, E. V.; Pinheiro, M. L. B.; Silva, J. R. A.; Maia, B. H. L. N. S.; Duarte, M. C. T.; Amaral, A. C. F.; Machado, G. M. C. & Leonor, L. L. 2009. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). **Química Nova** **32**: 78-81.
- Cruz, A. V. de M. & Kaplan, M. A. C. 2004. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente** **11** (1): 47-52.
- D'Amato, C.; Torres, J. P. M. & Malm, O. 2002. DDT (Diclordifenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão. **Química Nova** **25** (6): 995-1002.
- Donini, A.; Gaidhu, M. P.; Strasberg, D. R. & O'Donnell, M. J. 2007. Changing salinity induces alterations in hemolymph ion concentration and Na⁺ and Cl⁻ transport kinetics of the anal papillae in the larval mosquito *Aedes aegypti*. **The Journal of Experimental Biology** **210**: 983-992.
- Doyle J. A. & Thomas A. L. 1997. Phylogeny and geographic of Annonaceae. **Géographie physique et Quaternaire**. **51**(3): 353-361.
- Erkens R. H. J. & Maas P. J. M. 2008. The *Guatteria* group disentangled: sinking *Guatteropsis*, *Guatterella*, and *Heteropetalum* into *Guatteria*. **Rodriguésia**. **59**(2): 401-406.

- Fantinatti, E. C. S.; Duque, J. E. L.; Silva, A. M. & Navarro-Silva, M. A. 2007. Abundância e agregação de ovos de *Aedes aegypti* L. e *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) no Norte e Nordeste do Paraná. **Neotropical Entomology** **36** (6): 960-965.
- Farnesi, L. C.; Martins, A. J.; Valle, D. & Rezende, G. L. 2009. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **104** (1): 124-126.
- Figueiredo, R. M. P. de; Thatcher, B. D.; Lima, M. L. de; Almeida, T. C.; Alecrim, W. D. & Guerra, M. V. de F. 2004. Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, no período de 1998-1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **37** (6): 476-479.
- Finney, D. J. 1971. **Probit Analysis**. Cambridg University Press, 3rd Edition. 126p.
- Flores, A. E.; Albeldaño-Vázquez, W.; Salas, I. F.; Badii, M. H.; Becerra, H. L.; Garcia, G. P.; Fuentes, S. L.; Brogdon, W. G.; Black IV, W. C. & Beaty, B. 2005. Elevated α -esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Mexico. **Pesticide Biochemistry and Physiology** **82**: 66-78.
- Flores, A. E.; Grajales, J. S.; Salas, I. F.; Garcia, G. P.; Becerra, M. H. L.; Lozano, S.; Brogdon, W. G.; Black IV, W. C. & Beaty, B. 2006. Mechanisms of resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. **Journal of the American Mosquito Control Association** **22** (4): 672-677.
- Fonseca, I. & Quiñones, M. L. 2005. Resistencia a insecticidas en mosquitos (Diptera: Culicidae): mecanismos, detección y vigilancia en salud pública. **Revista Colombiana de entomología** **31** (2): 107-115.
- Forattini, O. P. 2002. **Culicidologia Médica. Identificação, biologia e epidemiologia**. Vol II. Editora da Universidade de São Paulo, 860p.
- Forattini, O. P. & Brito, M. de. 2003. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública** **37** (5): 676-677.
- Friedman, M.; Henika, P. R. & Mandrell, R. E. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteric*. **Journal of Food Protection** **65** (10): 1545-1560.
- Funasa – Fundação Nacional de Saúde, 2001. **Dengue: Instruções para pessoal de combate ao vetor – Manual de Normas Técnicas**. Ministério da Saúde Brasileira. 3ª Edição revisada. 75p.
- Funasa – Fundação Nacional de Saúde, 2002. **Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Vigilância Epidemiológica**. Ministério da Saúde Brasileira. 34p.
- Furtado, R. F.; Lima, M. G. A. de; Andrade-Neto, M.; Bezerra, J. N. S. & Silva, M. G. de V. 2005. Atividade larvial de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology** **34** (5): 843-847.
- Georghiou, G. P. & Lagunes-Tejeda, A. 1991. **The occurrence of resistance to pesticides in Arthropods**. 318p.
- Geris, R.; Silva, I. G. da; Silva, H. H. G. da; Barison, A.; Rodrigues-Filho, E. & Ferreira, A. G. 2008. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** **50** (1): 25-28.
- Girard, E. A. 2005. Volume, biomassa e rendimento de óleos essenciais do craveiro (*Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum) em floresta ombrófila mista. 72p. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná.

- Girard, E. A.; Koehler, H. S. & Péllico-Netto, S. 2007. Volume, biomassa e rendimento de óleos essenciais do craveiro (*Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum). **Revista Acadêmica, Curitiba** 5 (2): 147-165.
- Gomes, A. de C. G.; Souza, J. M. P. de; Bergamaschi, D. P.; Santos, J. L. F. dos; Andrade, V. R.; Leite, O. F.; Rangel, O.; Souza, S. S. L. de; Guimarães, N. S. N. & Lima, V. L. C. de. 2005. Anthropophilic activity of *Aedes aegypti* and of *Aedes albopictus* in area under control and surveillance. **Revista de Saúde Pública** 39 (2): 1-5.
- Gomes, A. dos S.; Sciavico, C. J. de S. & Eiras, A. E. 2006. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 39 (4): 327-332.
- Gubler, D. J. & Clark, G. C. 1995. Dengue / Dengue Hemorrhagic Fever: the emergence of a global health problem. **Emerging Infectious Diseases** 1 (2): 55-57.
- Gubler, D. J. 1998. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews** 11(3): 480-496.
- Gubler, D. J. 2001. Human arbovirus infections worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences** 951: 13-24.
- Guzmán, M. G.; García, G. & Kourí, G. 2006. El dengue y el dengue hemorrágico: prioridade de investigación. **Revista Panamericana de Salud Pública** 19 (3): 204-215.
- Haynes, K. F. 1988. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. **Annual Review of Entomology** 33: 149-168.
- Holmes, E. C.; Bartley, L. M. & Garnet, G. P. 1998. The emergence of dengue past, present and future. In: **Krause, R. M. Editor. Emerging Infectors, London: Academic Press** 301-325.
- Hombach, J. 2007. Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages. **Revista Panamericana de Salud Pública** 21 (4): 254-260.
- Ibáñez-Bernal, S.; Briseño, B.; Mutebi, J. P.; Argot, E.; Rodriguez, G.; Martínez-Campos, C.; Paz, Román P. de La Fuente-San; Tapia-Conyer, R. & Flisser, A. 1997. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. **Medicine and Veterinary Entomology** 11: 305-309.
- Isoet, J. R.; Marston, A.; Gupta, M. P. & Hostettmann, K. 2000 [a]. Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots of *Cordia curassavica*. **Phytochemistry** 53: 613-617
- Isoet, J. R.; Marston, A.; Gupta, M. P. & Hostettmann, K. 2000 [b]. Antifungal and larvicidal compounds from the root bark of *Cordia alliodora*. **Journal of Natural Products** 63 (3): 424-426.
- Isman, M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology** 51: 45-46.
- Joshi, V.; Mourya, D. T. & Sharma, R. C. 2002. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene** 67: 158 – 161.
- Kamaraj, C.; Rahuman, A. A. & Bagavan, A. 2008. Antifeedant and larvicidal effects of plant extracts against *Spodoptera litura* (F.), *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say. **Parasitology Research** 103: 325-331.
- Kaufmann, G. T. 2002. Investigação fitoquímica de *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem & Schult monitorada pelo ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina*. **Dissertação de Mestrado**. 99p. Universidade de Santa Catarina.

- Kawada, H.; Higa, Y.; Nguyen, Y. T.; Tran, S. H.; Nguyen, H. T. & Takagi, M. 2001. Nationwide investigation of the pyrethroid susceptibility of mosquito larvae collected used tires in Vietnam. **Plos Neglected Tropical Diseases** **3** (3): 1-8.
- Kihampa, C.; Joseph, C. C.; Nkuya, M. H. H.; Magesa, S. M.; Hassanali, A.; Heydenreich, M. & Kleinfelter, E. 2009. Larvicidal and IGR activity of extract of Tanzanian plants against malaria vector mosquitoes. **Journal of Vector Borne Diseases** **46**: 145-152.
- Kolehmainen, E.; Laihia, K.; Laatikainen, R.; Vepsäläinen, J.; Niemitz, M. & Suontamo, R. 1998. Complete spectral analysis of the ^1H NMR 16-spin system of β -pinene. **Magnetic Resonance in Chemistry** **35** (7): 463-467.
- Kroeger, A. & Nathan, M. B. 2006. Dengue: setting the global research agenda. **The Lancet** **368**: 2193-2195.
- Kumbar, S. M.; Shambhag, G. V. & Halligudi, S. B. 2006. Synthesis of monoallyl guaiacol via allylation using HYzeolite. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical** **244**: 278-282.
- Landrum, L. R. & Kawasaki, M. L. 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia** **49** (4): 508-536.
- Lapa, F. S. 2006. *Cordia curassavica* (JACQ.) ROEM. & SCHULT.: Influência de fatores ambientais no crescimento e na produção de metabólitos. **Dissertação de Mestrado**. 59p. Universidade de Santa Catarina.
- Lee, H. 2006. Mosquito larvicidal activity of aromatic medicinal plant oils against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens*. **Journal of the American Mosquito Control Association** **22** (2): 292-295.
- Lima, M. M. & Aragão, M. B. 1987. Tratamento focal e perifocal contra *Aedes aegypti*. **Cadernos de Saúde Pública** **2** (3): 142-147.
- Lima, J. B. P.; Pereira-da-Cunha, M.; Silva-Júnior, R. C. da; Galardo, A. K. R.; Soares, S. da S.; Braga, I. A.; Ramos, R. P. & Valle, D. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **68** (3): 329-333.
- Lima, E. P.; Oliveira-Filho, A. M. de; Lima, J. W. de O.; Ramos-Júnior, A. N.; Cavalcanti, L. P. de G. & Pontes, R. J. S. 2006 [a]. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **39** (3): 259-263.
- Lima, M. E. L.; Cordeiro, I.; Young, M. C.M.; Sobra, M. E. G. & Moreno, P. R. H. 2006 [b]. Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum (Myrtaceae) native from São Paulo State – Brazil. **Pharmacologyonline** **3**: 589-593.
- Logan, J. G. & Birkett, M. A. 2007. Review semiochemicals for biting fly control: their identification and exploitation. **Pest Management Science** **63**: 647-657.
- López-Vélez, R. & Moreno, R. M. 2005. Cambio climático en España y riesgo de enfermedades infecciosas y parasitarias transmitidas por artrópodos y roedores. **Revista Española de Saúde Pública** **79** (2): 177-190.
- Löwy, I. 1999. Representing and intervening in public health: viruses, mosquitoes and Rockefeller Foundation experts in Brazil. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos** **5** (3): 647-677. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010459701999000100006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt Acessado em 20.05.2009.

- Lozovei, A. L. 2001. Culicídeos (mosquitos), p. 59-104. In: Marcondes, C. B. (ed.). **Entomologia Médica e Veterinária**. Editora Atheneu, 432 p.
- Luna, J. E. D.; Martins, M. F.; Anjos, A. F. dos; Kuwabara, E. F. & Navarro-Silva, M. A. 2004. Susceptibility of *Aedes aegypti* to temephos and cypermethrin, Brazil. **Revista de Saúde Pública** **38** (6): 1-2.
- Machado, R. F. 2000. A importância da prevenção, tratamento e erradicação do vírus da dengue, como instrumento da política de saúde pública no Brasil. **Educação e Tecnologia** **5** (2): 13-20.
- Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C. & Veiga-Júnior, V. F. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova** **25** (3): 429-438.
- Macoris, M. de L. G.; Andrighetti, M. T. M.; Takaku, L.; Glasser, C. M.; Garbelato, V. C. & Bracco, J. E. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the State of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **98** (5): 703-708.
- Marques, F. A.; Wendler, E. P.; Baroni, A. C. M. & Guerrero-Júnior, P. G. (no prelo). Leaf essential oil composition of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum Native from Brazil. **Journal of Essential Oil Research**.
- Marques, G. R. A. M.; Santos, R. da La Corte, dos & Forattini, O. P. 2001. *Aedes albopictus* em bromélias de ambiente antrópico no Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública** **35** (3): 243-248.
- Medeiros, J. R.; Medeiros, N.; Medeiros, H.; Davin, L. B. & Lewis, N. G. 2002. Composition of the bioactive essential oils from the leaves of *Eugenia stipitata* McVaughn ssp. *Sororia* from the Azores. **Journal of Essential Oil Research** **15**: 293-295.
- Mellor, P. S. 2004. Infection of the vectors and bluetongue epidemiology in Europa. **Veterinaria Italiana** **40** (3): 167-174.
- Melo, J. U. de S.; Vasconcelos, P. R. L. de; Santos, J. M. V.; Campos-Júnior, M. M.; Barreto, M. V. A. & Kimura, O. De S. 2008. Efeitos do Dimetilsulfóxido no estresse oxidativo e na regeneração hepática pós-hepatectomia em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias** **35** (2): 103-108.
- Melo, J. I.M. de & Lyra-Lemos, R. P. de. 2008. Sinopse taxônomica de Boraginaceae *sensu latu*. A. Juss., no Estado de Alagoas, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** **22** (3): 701-710
- Miller, T. a. 1988. Mechanisms of resistance to pyrethroid insecticide. **Parasitology Today** **4** (7): 8-12.
- Ministério da Saúde do Brasil, 2007. **Informe Epidemiológico da dengue, Janeiro a Dezembro de 2007**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos>. Acessado em 02.07.2008.
- Monath, T. P. 1994. Dengue: The risk to developed and developing countries. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **91**: 2395-2400.
- Morais, S. M.; Cavalcanti, E. S. B.; Bertini, L. M.; Oliveira, C. L.; Rodrigues, J. R. B. & Cardoso, J. H. L. 2006. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti* L. **Journal of the American Mosquito Control Association** **22** (1): 161-164.
- Navarro-Silva, M. A.; Marques, F. A. & Duque, J. E. L. 2009. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae. **Revista Brasileira de Entomologia** **53** (1): 1-6.
- Nogueira, R. M. R.; Araújo, J. M. G. de & Schatzmayr, H. G. 2007. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. **Revista Panamericana de Salud Publica** **22**(5): 358-363.

- Oliveira, M. C. B. L. de. 2002. Atividade antiinflamatória dos extratos obtidos de *Cordia curassavica* DC. **Dissertação de Mestrado**. 131p. Universidade Estadual de Campinas.
- Oliveira, R. L. de, 2005. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias, p. 75-97. In: Coura, J. R. (ed.). **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Vol. I**. Editora Guanabara Koogan, Rio e Janeiro. 1132p.
- Omena, M. C. de; Navarro, D. M. A. F.; Paula, J. E. de; Luna, J. S.; Ferreira de Lima, M. R. & Sant'Anna, A. E. G. 2007. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology** **98**: 2549-2556.
- Periago, M. R. & Guzmán, M. G. 2007. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas. **Revista Panamericana de Salud Pública** **21**: 187-191.
- Ping, L. T.; Yatiman, R. & Gek, L. S. 2001. Scientific note susceptibility of adult field strain of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Singapore to pirimiphos-methyl and permethrin. **Journal of the American Mosquito Control Association** **17 (2)**: 144-146.
- Pinheiro, F. P. & Corber, S. J. 1997. Global situation of dengue and dengue hemorrhagic fever and its emergence in the Americas. **World Health Statistics Quarterly** **50 (3-4)**: 161-169.
- Ponlawat, A.; Scott, J. G. & Harrington, L. C. 2005. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* across Thailand. **Journal of Medical Entomology** **42 (5)**: 821-825.
- Pontes, R. J. S. & Ruffino-Neto, A. 1994. A dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. **Revista de Saúde Pública** **28 (3)**: 218-227.
- Prajapati, V.; Tripathi, A. K.; Aggarwal, K. H. & Khanuja, S. P. S. 2005. Insecticidal, repellent and oviposition – deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Bioresource Technology** **96**: 1749:1757.
- Pridgeon, J. W.; Pereira, R. M.; Becnel, J. J.; Allan, S. A.; Clark, G. G. & Linthicum, K. J. 2008. Susceptibility of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* Say, and *Anopheles quadrimaculatus* Say to 19 pesticides with different modes of action. **Journal of Medical entomology** **45 (1)**: 82-87.
- Prophiro, J. S. 2008. Análise de susceptibilidade de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) a organofosforados e alternativa de controle de imaturos do vetor *Aedes aegypti* utilizando produtos de origem botânica. **Dissertação de Mestrado**. 119p. Universidade Federal do Paraná.
- Ragasa, C. Y.; Ganzon, J.; Hofilena, J. & Rideout, J. A. 2002. New furanoid diterpenes from *Caesalpinia pulcherrima* . **Journal of Natural Products** **65 (8)**: 1107-1110
- Ragasa, C. Y.; Ganzon, J.; Hofilenã, J.; Tamboong, B. & Rideout, J. A. 2003. A new furanoid diterpene from *Caesalpinia pulcherrima*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin** **51**, 1208-1210.
- Raharivelomanana, P.; Bianchini, J.-P.; Cambon, A.; Azzaro, M. & Faure, R. 1995. Two-Dimensional NMR of sesquiterpenes. **Magnetic Resonance in Chemistry**. **33 (3)**: 233-235.
- Ramos, D. R.; Cardoso, C. A. L. & Yamamoto, N. T. 2007. Avaliação do potencial citotóxico e atividade antioxidante em *Campomanesia adamantium* (Cambess) O. Berg (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências** **5 (2)**: 774-776.
- Raven, P. H.; Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. 2001. A composição molecular das células vegetais, p. 17-39. In: Raven, P. H.; Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. (ed.). **Biologia Vegetal**. 6ª edição. Editora Guanabara, Rio de Janeiro. 906p.

- Rawlins, S. C. 1998. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. **Revista Panamericana de Salud Pública 4 (4)**: 243-251.
- Rezende, G. L.; Martins, A. J.; Gentile, C.; Farnesi, L. C.; Pelajo-Machado, M.; Peixoto, A. A. & Valle, D. 2008. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. **BMC Developmental Biology 8**: 82.
- Robertson, J. L. & Preisler, H. K. 1992. **Pesticide bioassays with Arthropods**. 127p.
- Rodríguez, M. M.; Bisset, J.; Feranandez, D. M. de; Lauzán, L. & Soca, A. 2001. Detection of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba and Venezuela. **Entomological Society of America 38 (5)**: 623-628.
- Rodríguez, M. M.; Bisset, J.; Ruiz, M. & Soca, A. 2002. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. **Journal of Medical Entomology 39 (6)**: 882-888.
- Rodríguez, M. M.; Bisset, J. A.; Armas, Y. de & Ramos, F. 2005. Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. **Journal of the American Mosquito Control Association 21 (4)**: 437-445.
- Rodrigues, A. M. S.; Paula, J. E. de; Degallier, N.; Molez, J. F. & Espindola, L. S. 2006. Larvicidal activity of some cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association 22 (2)**: 314-317.
- Rosen, L. 1999. Comments on the epidemiology, pathogenesis and control of dengue. **Medicine Tropical 59**: 495-498.
- Ruppert, E. E. & Barnes, R. D. 1996. **Zoologia dos Invertebrados**. 6ª edição. Editora Roca. São Paulo. 1029p.
- Sanches, J. L. 1981. Carlos J. Finlay and the conception of contagion. **Indian Journal of History of Science 16 (2)**: 156-168.
- Santiago, G. M. P.; Viana, F. A.; Pessoa, O. D. L.; Santos, R. P.; Pouliquen, Y. B. M.; Arriaga, A. M. C.; Andarde-Neto, M. & Braz-Filho, R. 2005. Avaliação da atividade larvica de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd) Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia 15 (3)**: 187-190.
- Santos, N. C.; Figueira-Coelho, J.; Martins-Silva, J. & Saldanha, C. 2003. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxido: pharmacological, cellular and molecular aspects. **Biochemical Pharmacology 65**: 1035-1041.
- Santos, R. P. dos; Lemos, T. L. E.; Pessoa, O. D. L.; Braz-Filho, R.; Rodrigues-Filho, E.; Viana, F. A. & Silveira, E. R. 2005. Chemical constituents of *Cordia piauiensis* – Boraginaceae. **Journal of Food Protection 68 (10)**: 1545-1560.
- Santos, R.P.; Nunes, E.P.; Nascimento, R.F.; Santiago, G.M.P.; Menezes, G.H.A.; Silveira, E.R. & Pessoa, O.D.L. 2006. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society 17(5)**: 1027-1030.
- Santos, B. C. B. dos; Silva, J. C. T. da; Guerrero-Júnior, P. G.; Leitão, G. G. & Barata, L. E. S. 2009. Isolation of chavibetol from essential oil of *Pimenta pseudocaryophyllus* leaf by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A 1216**: 4303-4306.

- Serufo, J. C.; Oca, H. M. de; Tavares, V. A.; Souza, A. M.; Rosa, R. V.; Jamal, M. C.; Lemos, J. R.; Oliveira, M. A.; Nogueira, R. M. R. & Schatzmayr, H. G. 1993. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **88** (3): 503-504.
- Shaalán, E. A. S.; Canyon, D.; Younes, M. W. F.; Abdel- Wahab, H. & Mansour, A. H. 2005 [a]. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environonment International** **31**: 1149-1166.
- Shaalán, E. A. S.; Canyon, D.; Younes, M. W. F.; Abdel- Wahab, H. & Mansour, A. H. 2005 [b]. Effects of sub-lethal concentrations of synthetic insecticides and *Callitris glaucophylla* extracts on the development of *Aedes aegypti*. **Journal of Vector Ecology** **30** (2): 295-298.
- Sharma, P.; Mohan, L. & Srivastava, C. N. 2006. Phytoextract-induced developmental deformities in malária vector. **Bioresource Technology** **97**: 1599-1604.
- Silva, D. D. da; Chierice, G. O.; Galhiane, M. E.; Chaar, J. da S. & Mouchrek-Filho, V. E. 2003. Quantificação do linalol no óleo essencial da *Aniba duckei* Korstermans utilizando uma nova coluna capilar PolyH4-MD em Cromatografia gasosa. **Química Nova** **26** (4): 461-465
- Simas, N.K.; Lima, E.C.; Conceição, S.R.; Kuster, R.M. & Filho A.M.O. 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue- atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**. **27**(1): 46-49.
- Simões, C. M. O. & SPITZER, V. 2000. Óleos voláteis. In: Simões, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. (ed.) **Farmacognosia**. Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 2ª edição. 387-416.
- Soares, V. A. R. C.; Rodrigues, W. C. & Cabral, M. M. de O. 2008. Estudo das áreas e depósitos preferenciais de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) e *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) no município de Paracambi – Rio de Janeiro, Brasil. **EntomoBrasilis** **1** (3): 63-68.
- Soper, F. L. 1965. The status of *Aedes aegypti* eradication and yellow fever in the Americas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **14** (6): 887-891
- Teixeira, M. da G.; Barreto, M. L. & Guerra, Z. 1999. Epidemiologia e medidas de prevenção do Dengue. **Informe Epidemiológico do SUS** **8** (4): 5-33.
- Tellez, M. R.; Khan, I. A.; Kobisy, M.; Schrader, K. K.; Dayan, F. E. & Osbrink, W. 2002. Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (Walp.). **Phytochemistry** **61**: 149-155.
- Tiwary, M.; Naik, S. N.; Tewary, D.K.; Mittal, P. R. & Yadav, S. 2007. Chemical composition and larvicidal activities of the essential oil of *Zanthoxylum armatum* DC (Rutaceae) against three mosquito vectores. **Journal of Vector Borne Diseases** **44**: 198-204.
- Trumble, J. T. 2002. Caveat emptor: safety considerations for natural products used in Arthropod control. **American Entomologist** **48** (1): 7-13.
- Urbínatti, P. R. 2004. Observações ecológicas de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) em áreas de proteção ambiental e urbana da periferia na Grande São Paulo. **Tese de Doutorado**. 91p. Universidade de São Paulo.
- Vasconcelos, P. F. C.; Lima, J. W. O.; Rosa, A. P. A. T. da; Timbó, M. J.; Rosa, E. S. T. da; Lima, H. R.; Rodrigues, S. G. & Rosa, J. F. S. T. da. 1998. Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: inquérito soro-epidemiológico aleatório. **Revista de Saúde Pública** **32** (5): 447 – 454.

Wandscheer, C. B.; Duque, J. E.; Silva, M. A. N. da; Fukuyama, Y.; Wohlke, J. L.; Adelman, J. & Fontana, J. D. 2004. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. **Toxicon** **44**: 829-835.

Whalon, M. E.; Mota-sanchez, D. & Hollingworth, R. M. 2008. **Global Pesticide Resistance in Arthropods**. Editora Cabi. 208 p.

World Health Organization (WHO) 1981 [a]. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides**. Geneva. WHO/VBC/81. 807: 1-6.

World Health Organization (WHO) 1981 [b]. **Criteria and Meaning of Tests for Determining the Susceptibility or Resistance of Insects to Insecticides**. Geneva.

World Health Organization (WHO) 1992. **Vector resistance to pesticides**. Fifteenth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. 61p. Geneva

World Health Organization (WHO) 1995. Prevention and control of Dengue and Dengue Haemorrhagic fever. **Comprehensive guidelines 16**. New Delhi.

World Health Organization (WHO) 1997. **Dengue haemorrhagic fever diagnosis, treatment, prevention and control**. 2nd edition. Geneva.

World Health Organization (WHO) 2009. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>

Yajima, A.; Yamaguchi, A.; Saitou, F.; Nukada, T. & Yabuta, G. 2007. Asymmetric synthesis of abictanediterpenoids via β -alkyl Suzuki-Miyaura coupling. Formal total asymmetric synthesis of 12-deoxyroyleanone and cryptochinone. **Tetrahedron** **63** (5): 1080-1084.

Web Sites Acessados em 2008 e 2009.

http://www.coc.fiocruz.br/areas/dad/guia_acervo/arq_pessoal/fundacao_rockfeller.htm

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010459701999000100006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_010208.pdf

Anexo 1 - Constituintes químicos identificados por CG/EM nos óleos essenciais das folhas das espécies de *Guatteria* segundo Costa e tal. 2008.

Constituintes	RI ^a	G. <i>hispid</i> (%)	G. <i>blepharophylla</i> (%)	G. <i>friesiana</i> (%)
1 α -Pinen	934	30,77		
2 Camfeno	944	0,43		
3 β -Pinen (6)	977	38,18		
4 Myrceno	991	0,47		
5 <i>p</i> -Cymeno	1022	0,10		
6 Limoneno	1026	0,36		
7 Citronellal	1152		0,08	
8 α -Terpinen-4-ol	1174	0,08		
9 α -Terpineol	1188	0,13		
10 δ -Elemeno	1336		0,11	
11 Cyclosativeno	1368		0,12	
12 α -Ylangeno	1373	0,27	0,89	
13 β -Bourboneno	1388		0,21	
14 β -Elemeno	1390		1,18	
15 (<i>E</i>)-Cariofileno (7)	1420	20,59	0,99	
16 β -Ylangeno	1425		0,12	
17 α - <i>Trans</i> -bergamoteno	1434	0,13	0,33	
18 Aromadendreno	1441		0,10	
19 α -Humuleno	1451	0,70		
20 (<i>E</i>)- β -Farneseno	1458	0,46		
21 <i>Trans</i> -cadin-1-(6),4-dieno	1475	0,16		
22 γ -Gurjuneno	1479	0,63	0,24	
23 γ -muuroleno	1478		0,15	
24 γ -curcumen	1482		0,68	
25 γ -Himachaleno	1485	1,44		
26 Germacreno D	1489		0,14	
27 <i>epi</i> -Cubebol	1492		0,14	
28 β -Selineno	1493	0,78	0,39	
29 Cupareno	1496			
30 β -Bisaboleno	1507		0,31	
31 γ -Cadineno	1511		0,18	
32 δ -Cadineno	1523	1,20	1,07	
33 <i>Trans</i> -cadin-1(2),4-dieno	1531		0,38	
34 α -Calacoreno	1541		0,69	
35 Elemol	1551			2,16
36 <i>Trans</i> -ether-cadineno	1551		2,03	
37 Germacreno B	1554		0,31	
38 Espatuleno	1578			2,64
39 Óxido de cariofileno (4)	1581	2,77	69,25	
40 β -Copaen-4- α -ol	1592		0,70	
41 Epóxido de humuleno II	1609	0,12	1,98	
42 10- <i>epi</i> - γ -Eudesmol	1617			1,40
43 1- <i>epi</i> -Cubenol	1627		0,33	
44 <i>Cis</i> -cadin-4-en-7-ol	1631		1,84	
45 Cariofila-4(14),8(15)-dien-5-ol ^b	1636		0,55	
46 γ -Eudesmol (3)	1638			23,70
47 Hinesol	1641			0,89
48 Cubenol	1641		0,42	
49 β -Eudesmol (2)	1660			51,60
50 α -Eudesmol (1)	1662			14,56
51 14-hidroxy-9- <i>epi</i> -(<i>E</i>)-cariofileno	1670		2,50	
52 Ishwarono	1679		2,01	
53 14-oxy- α -muuroleno	1770		0,22	
54 Carissono	1926			0,18
Monoterpenos identificados		70,52	0,08	
Sesquiterpenos identificados		29,25	90,56	97,13
Total		100	100	100

Anexo 2 – Composição química do óleo essencial da folha de *Pimenta pseudocaryophyllus* identificada por GC-MS, segundo Marques *et al.* (no prelo).

Compostos		RI ^a	Percentage (%)
1	Tricyclene	932	0,5
2	o-cimene	1023	2,8
	1,8-cineole	1031	1,2
4	p-mentha,2-4 (8)-diene	1088	0,9
5	Terpinen-4-ol	1177	0,8
6	Eugenol	1350	tr
7	Chavibetol	1371	70,9
8	Methyl eugenol	1405	20,7
TOTAL			97,8