

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Mestrado

**ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti* L.
(Culicidae) E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE PARTES AÉREAS DE *Baccharis trimera*
(Less) D.C.**

DANIELLA PATRÍCIA BRANDÃO SILVEIRA

SÃO LUÍS
2018

DANIELLA PATRÍCIA BRANDÃO SILVEIRA

**ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti* L.
(Culicidae) E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE PARTES AÉREAS DE *Baccharis trimera*
(Less) D.C.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós - Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Maranhão, como
requisito para obtenção do título de Mestre
em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Denise Fernandes
Coutinho

SÃO LUÍS
2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

SILVEIRA, Daniella Patrícia Brandão.

ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti* L. (Culicidae) E
COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE PARTES AÉREAS DE
Baccharis trimera Less D.C / Daniella Patrícia Brandão
SILVEIRA. - 2018.

65 p.

Orientador(a): Denise Fernandes Coutinho.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/CCBS, Universidade Federal do Maranhão,
SÃO LUÍS, 2018.

1. Óleos voláteis. 2. Potencial larvicida. 3.
Terpenos. 4. Toxicidade. I. Coutinho, Denise Fernandes.
II. Título.

**ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti* L.
(Culicidae) E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE PARTES AÉREAS DE *Baccharis trimera*
(Less) D.C.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Denise Fernandes Coutinho

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Maria Célia Pires Costa
Universidade Estadual do Maranhão

Prof. Dr^a. Adriana Leandro Câmara
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Flávia Maria Mendonça do Amaral
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr^a. Denise Fernandes Coutinho
Universidade Federal do Maranhão

“A persistência é o menor caminho do êxito”

Charles Chaplin

Dedico aos meus pais
José Silveira e Izabel Brandão
e irmãs, Izabella e Gabriella

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof. Denise Fernandes Coutinho, ao professor Odair Monteiro e José Maia, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, ao corpo docente deste.

Agradeço aos meus familiares e a todos os que participaram direta e indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos colegas de Pesquisa do Laboratório de Farmacognosia 1 e 2 que tanto contribuíram para a Pesquisa pudesse ser realizada.

Agradeço à Universidade Federal do Maranhão, à Universidade Estadual de Campinas, em especial ao CPQBA. Por fim, à CAPES pela bolsa de mestrado.

RESUMO

“Atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* L. (Culicidae) e composição química do óleo essencial de partes aéreas de *Baccharis trimera* (Less) D.C.” As doenças transmitidas por mosquitos ainda persistem como importante problema de saúde mundial. *Aedes aegypti* é um dos principais vetores de doenças transmitidas por mosquitos, a exemplo da Febre Amarela, Dengue, Zika, Chikungunya; arboviroses que podem levar ao choque hemorrágico, malformações embrionárias, doenças articulares e óbito. Desse modo, uma das formas preconizadas pela Organização Mundial de Saúde para controle das arboviroses é o combate ao vetor, o mosquito *Aedes aegypti*. Há uma tendência à busca por produtos naturais que possam ser utilizados como potenciais larvicidas e inseticidas. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química do óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less) DC e verificar se este apresenta atividade contra larvas do vetor *Aedes aegypti* e avaliar a segurança do produto por meio de testes de toxicidade frente organismos não alvos. O material vegetal foi obtido do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas de Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Uma amostra foi enviada ao Herbário da Universidade Federal do Maranhão, para confirmação da espécie. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação e a identificação dos compostos químicos foi obtida por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas. Foi possível identificar 90% das substâncias presentes no óleo essencial em estudo, sendo 10% composto por monoterpenos hidrocarbonados, 14% de monoterpenos oxigenados, 24% de sesquiterpenos oxigenados e 45% de sesquiterpenos hidrocarbonados. O óleo essencial neste estudo teve como compostos majoritários o espatulenol (18,45%), óxido de cariofileno (15,24%) e e-cariofileno (9,18%). A avaliação da atividade larvicida foi realizada para os quatro estágios larvais (L1, L2, L3, L4) em seis concentrações. Testes de citotoxicidade frente *Artemia salina* e *Danio rerio* foram realizados e calculadas as respectivas CL₅₀. Considera-se que o óleo essencial de *Baccharis trimera* é efetivo contra larvas do 1º ao 4º estágio de *Aedes aegypti*, obteve-se CL₅₀ equivalentes a 38,8; 55,8; 89,7; 171,8 µg/mL para 1º, 2º, 3º e 4º estágio, respectivamente. O óleo pode ser considerado tóxico para *Danio rerio*, entretanto mostrou-se atóxico ou de baixa toxicidade em ensaio de toxicidade frente *Artemia salina*.

Palavras-chave: Toxicidade; óleos voláteis; terpenos; pontencial larvicida

ABSTRACT

"Larvicidal activity on *Aedes aegypti* L. (Culicidae) and chemical composition of the essential oil of aerial parts of *Baccharis trimera* (Less) D.C." Mosquito-borne diseases still persist as an important global health problem. *Aedes aegypti* is one of the main vectors of diseases transmitted by mosquitoes, such as Yellow Fever, Dengue, Zika, Chikungunya; arboviruses that can lead to hemorrhagic shock, embryonic malformations, joint diseases and death. Thus, one of the ways recommended by the World Health Organization for the control of arboviruses is the vector control, the mosquito *Aedes aegypti*. In this sense, there is a tendency to search for natural products that can be used as potential larvicides and insecticides. In this context, the objective of this work was to evaluate the chemical composition of *Baccharis trimera* (Less) DC and to verify if it presents activity against larvae of the *Aedes aegypti* vector and evaluate the toxicity of the product against non-target organizations. Plant material was obtained from the Multidisciplinary Center for Chemical, Biological and Agricultural Research - CPQBA of the State University of Campinas - UNICAMP. A sample was sent to the Herbarium of the Federal University of Maranhão, to confirm the species. The essential oil was extracted by hydrodistillation and the identification of the chemical compounds was obtained by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry. It was possible to identify 90% of the substances present in the essential oil under study, being 10% composed of hydrocarbon monoterpenes, 14% of oxygenated monoterpenes, 24% of oxygenated sesquiterpenes and 45% of hydrocarbon sesquiterpenes. The essential oil in this study had as its major compounds spatulenol (18.45%), caryophyllene oxide (15.24%) and ϵ -caryophyllene (9.18%). The evaluation of larvicidal activity was performed for the four larval stages (L1, L2, L3, L4) at six concentrations. Cytotoxicity tests against *Artemia salina* and *Danio rerio* were performed and the respective LC₅₀ were calculated. It is considered that the essential oil of *Baccharis trimera* is effective against larvae between the 1st and 4th stage of *Aedes aegypti*, it was obtained LC₅₀ equivalent to 38.8; 55.8; 89.7; 171.8 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for 1st, 2nd, 3rd and 4th stages, respectively. The oil may be considered toxic for *Danio rerio*, however it was non-toxic or of low toxicity in a toxicity test against *Artemia salina*.

Key words: Toxicity; volatile oils; terpenes; potencial larvicide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa mundial para risco de infecção por Zika vírus.....	17
Figura 2. Distribuição mundial de <i>Aedes aegypti</i>	18
Figura 3. Representação do das fases do ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i>	20
Figura 4. Representação do Dimorfismo sexual de <i>Aedes aegypti</i>	21
Figura 5. Espículas latero-torácicas quitinizadas; sifão respiratório; escamas (Pecten) do segmento VIII com espinhos laterais e um central de <i>Aedes aegypti</i>	21
Figura 6. Esquema representativo da biossíntese dos metabólitos secundários.....	26
Figura 7. Esquema da biossíntese de monoterpenos a partir de DMAPP E IPP	27
Figura 8. Esquema da biossíntese de sesquiterpenos (C15).....	28
Figura 9. Esquema da biossíntese Triterpenos.....	29
Figura 10. A. Arbusto de <i>Baccharis trimera</i> com inflorescências dispostas lateralmente nos ramos.....	31
Figura 11. Representação estrutural dos componentes majoritários presentes no óleo essencial de partes aéreas de <i>Baccharis trimera</i>	38
Figura 12. Porcentagem de monoterpenos hidrocarbonetos (MH), monoterpenos oxigenados (MO), sesquiterpenos hidrocarbonetos (SH) e sesquiterpenos oxigenados (SO) identificados no óleo essencial de <i>Baccharis trimera</i>	41
Figura 13. Gráfico das concentrações (CL ₅₀ e CL ₉₀) do óleo essencial de <i>Baccharis trimera</i> para os diferentes estágios larvais de <i>Aedes aegypti</i>	42
Figura 14. Morfologia das larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de tratamentos nas diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Baccharis trimera</i>	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais constituintes identificados no óleo essencial das partes aéreas de <i>Baccharis trimera</i>	39
Tabela 2. Avaliação do óleo essencial <i>Baccharis trimera</i> sobre <i>Aedes aegypti</i> em diferentes estádios larvais	43
Tabela 3. Taxa de mortalidade e CL ₅₀ em ensaio de toxicidade do óleo essencial de <i>Baccharis trimera</i> frente <i>Artemia salina</i>	45
Tabela 4: Taxa de mortalidade e CL ₅₀ em ensaio de toxicidade do óleo essencial de <i>Baccharis trimera</i> frente <i>Danio rerio</i>	46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

A. salina - *Artemia salina*

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

Ae. aegypti – *Aedes aegypti*

CDC – Center For Disease Control and Prevention

CL₅₀ – Concentração Letal capaz de matar 50% dos indivíduos testados

CL₉₀ – Concentração Letal capaz de matar 90% dos indivíduos testados

CPQAB – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas de Químicas, Biológicas e Agrícolas

DMSO – Dimetil Sulfóxido

OE – Óleo essencial

WHO – World Helth Organization

SUMÁRIO

1	Introdução	12
2.	Referencial teórico	15
3.	Objetivos	33
3.1	Objetivo Geral.....	33
3.2	Objetivo Específico.....	33
4.	Material e Métodos.....	34
5.	Resultados.....	38
6.	Discussão	47
7.	Conclusão.....	51
8.	Referências.....	52
	ANEXOS.....	65

1. INTRODUÇÃO

Os mosquitos tem protagonizado o cenário atual da saúde devido o forte impacto sobre a mortalidade e morbidade humana que as doenças por eles transmitidas tem causado. Este fato pode ser observado principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Sendo *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* os gêneros que mais se destacam por serem vetores responsáveis por doenças importantes e persistentes como malária, dengue e filariose, respectivamente (GOVINDARAJAN et al., 2016).

Acredita-se que o mosquito *Aedes aegypti* Lianneus 1762 tenha origem no Egito, se adaptou bem às diversas alterações antrópicas e teve a capacidade de se dispersar pelas regiões dos trópicos e subtrópicos juntamente com o homem, onde encontrou boas condições para sobrevivência (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). No Brasil, a introdução do mosquito aconteceu, provavelmente, no período colonial (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; FORATTINE, 2002). No município de São Luís, a presença de *A. aegypti* foi detectada em 1969 (BRASIL, 2001) e somente em 1996 foi registrada a primeira epidemia de dengue neste município, com a notificação de 4.641 casos, causados pelo sorotipo DENV-1 (VASCONCELOS et al., 1999).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2016), a dengue é a doença mais importante transmitida por mosquitos, é também a de mais rápida propagação e endêmica em mais de 100 países, tornando vulnerável cerca de 40% da população mundial (WHO, 2016).

Em 2017 foram registrados 251.711 casos prováveis de dengue no Brasil; em 2018, até a semana 25 (31/12/2017 à 23/06/2018) já foram registrados 171.582 casos prováveis. Há uma incidência de 86,6 casos/100 mil habitantes. A alta incidência da doença se deve a grande dispersão de *A. aegypti*, principal vetor da dengue, considerando que as condições socioambientais para a proliferação deste inseto são favoráveis em nosso país (BRASIL, 2018).

Além da dengue, o mosquito *A. aegypti* também é responsável pela transmissão de outras viroses prevalentes em países tropicais, a exemplo da febre amarela, febre Chikungunya (CHIKV) e o Zika vírus (ZIKV) considerados graves problemas de saúde pública no panorama mundial e nacional (WHO, 2012).

A ocorrência das arboviroses é crescente tanto no Brasil como em outros países tropicais e, apesar dos programas de controle com altos financiamentos, ainda é considerada pela Organização Mundial de Saúde uma doença negligenciada. Necessita-se, portanto, de investimentos em pesquisas direcionadas à redução da morbimortalidade da doença e, ao desenvolvimento de novas tecnologias e metodologias para o combate de *A. aegypti*, uma vez até então dispõe-se apenas de vacina no controle da Dengue, que apresenta limitações,

podendo levar ao aumento da incidência da infecção mais grave em locais de baixa transmissão, e assim, aumentar o número de hospitalizações. No caso de locais com moderada incidência, aumenta os riscos de infecção por Dengue para pacientes vacinados quando soronegativos. A vacina é licenciada em poucos países, e no Brasil ainda não faz parte do calendário de vacinação, sendo assim a principal forma de combate à Dengue e demais arboviroses está no combate ao vetor (TAUIL, 2006; WHO 2012; MARCOS, 2016; FERGUSON et al., 2016).

Em relação ao combate desse mosquito, são poucos os larvicidas convencionais disponíveis para uso em políticas de saúde, além disso, o aumento da resistência dos vetores aos inseticidas tem demonstrado a necessidade de aplicação de dosagens cada vez mais elevadas para obter-se eficácia no combate aos insetos (BRAGA et al., 2007). A resistência destes pode ser contornada, ainda que temporariamente, com a formulação de produtos a partir de plantas, uma vez que são constituídas por diversas substâncias que podem atuar sinergicamente, dificultando os mecanismos envolvidos no aumento da resistência. Somado a isso, os metabólitos de espécies vegetais são fontes naturais de constituintes inseticidas e antimicrobianos, justificável pela sua co-evolução com os insetos e microrganismos, tendo dentre suas funções fisiológicas a proteção e defesa química contra o ataque de patógenos (PINTO et al., 2002; BRAZ FILHO, 2010).

O uso de inseticidas de origem vegetal tem aumentado nas últimas décadas devido a boa atividade que os compostos tem apresentado e devido à não dispersão de resíduos tóxicos no meio ambiente e nem um potencial efeito de acumulação (GHRAMH et al., 2018).

O uso de biomoléculas para controle dos insetos e larvas tem sido realizados em muitos estudos com alguns resultados satisfatórios e como alternativas promissoras (SUGUMAR et al., 2014), a exemplo de produtos a base de óleos essenciais que tem sido desenvolvidos como potencial larvicida. (GHOSH et al., 2013).

O gênero *Baccharis* tem sido amplamente estudado desde o início do Século XX e, em relação à composição química, já foram isolados mais de 150 compostos, sendo os mais frequentes os flavonóides e os terpenóides, como monoterpenos, sesquiterpenos e triterpenos (VERDI et al., 2005).

A espécie *Baccharis trimera*, popularmente chamada de carqueja, está entre as 71 plantas medicinais de interesse do Sistema Único de Saúde, com monografia descrita na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010). Extratos de plantas do gênero *Baccharis* já demonstraram sua atividade antifúngica, anticâncer, antimutagênica (VERDI et al., 2005). Seu óleo essencial já demonstrou atividade inseticida e repelente contra insetos da espécie

Acanthoscelides obtectus (CAMPOS, 2014).

Em estudos realizados com diferentes espécies do gênero *Baccharis* para larvas de mosquitos *A. aegypti*, obteve-se resultados satisfatórios para toxicidade das larvas. Desse modo, acredita-se que o óleo essencial das folhas de *Baccharis trimera* apresenta constituintes com ação tóxica contra larvas do mosquito *A. aegypti*, podendo ser, dessa forma, uma importante alternativa de controle de sua proliferação e, por conseguinte, o controle da disseminação de doenças.

Considerando a problemática dessas viroses no Brasil, o aumento da resistência de *A. aegypti* aos inseticidas disponíveis e a importância dos óleos essenciais, este trabalho foi desenvolvido visando avaliar o potencial larvicida do óleo essencial das folhas de *Baccharis trimera*, como forma de buscar novas alternativas para o controle da população de *A. aegypti* em áreas com alta incidência de arboviroses.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Arboviroses de interesse para a Saúde e relacionadas ao *Aedes aegypti*

O termo arbovírus se refere a todo e qualquer vírus que possua parte de seu ciclo de vida associado a um artrópode. Nesse sentido, os mosquitos ocupam um papel importante na disseminação de doenças causadas por vírus, incluindo os Flaviviruses (vírus da Dengue - DENV, da febre amarela - YFV, vírus do Nilo Ocidental - WNV, vírus da zika - ZIKV); os Alfavírus (vírus chikungunya- CHIKV, vírus Sindbis - SINV); e bunyaviruses como vírus da febre do vale do Rift (RVFV) (KEAN et al., 2015).

Dentre os sintomas mais comuns às viroses associadas aos mosquitos que atingem humanos, destacam-se: febre, dor de cabeça, alteração neurológica, vômitos, artralgia, mialgia e artrite, sendo mais frequentes em regiões tropicais e subtropicais, devido às condições ideais para seus transmissores, os artrópodes (BECKHAM et al., 2015).

Em relação à Dengue, pode-se destacar como sintomas associados: febre alta acompanhada de cefaléia frontal, fadiga, dor retro-orbitária, artralgia e erupção cutânea, trombocitopenia. Em seu estado mais grave, pode ocorrer o aumento da permeabilidade vascular acompanhada de eventos hemorrágicos, plaquetopenia, com riscos de evoluir para hipotensão e choque (DICK et al., 2012; MORAES et al., 2013).

Juntamente com sua versão hemorrágica, a Dengue se destacou como a virose transmitida por mosquitos mais importante para o âmbito da saúde (GUBLER et al., 2011; WHO, 2013; WHO, 2012). Segundo a Organização Mundial de Saúde (2016), a incidência da virose cresceu drasticamente nos continentes nos últimos anos. São cerca de 390 milhões de casos por ano, sendo que 96 milhões apresentam manifestações clínicas (BHATT et al., 2013). Quanto à sua prevalência, estima-se que 3,9 bilhões de pessoas em 128 países estão em risco de infecção (WHO, 2016).

A doença é endêmica em pelo menos 100 países entre as regiões do Oriente Médio, África, Ásia-Pacífico e nas Américas, onde os casos aumentaram drasticamente nas últimas décadas (WHO, 2011; MURRAY et al., 2013).

Acreditava-se que a virose estava relacionada a quatro sorotipos diferentes, DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4; em 2013 foi revelada a existência de um quinto sorotipo, DENV-5. A recombinação gênica, seleção natural e os gargalos genéticos são responsáveis pelo surgimento deste novo sorotipo, que juntamente com outros tipos silvestres são obstáculo para o investimento em vacina contra a Dengue (MUSTAFA et al., 2015).

O DENV-5 foi isolado no Sul da Malásia, de material biológico de um agricultor internado em um hospital no ano de 2007. Em estudo de sequência do genoma viral, foi

possível identificar a presença de um novo sorotipo, filogeneticamente diferente dos demais, com proximidade para o DENV-2. O DENV-5 pôde ser detectado em outros casos tratados em ambulatórios do mesmo estado, o que sugere uma manifestação leve da doença (MUSTAFA et al., 2015).

Dengue é apontada como uma importante causa de doença neurológica, juntamente com duas outras arboviroses que se destacaram nos últimos anos, o Chikungunya e Zika vírus, considerados agentes neuroinvasivos (WHO, 2009; BURT, 2012). Seus sintomas são semelhantes aos da Dengue, com ênfase para erupções cutâneas, febre aguda e desordens neurológicas. As arboviroses podem estar associadas também a Síndrome de Guillain-Barré, doença auto-imune que causa paralisia flácida aguda ou subaguda (LEBRUN et al., 2009; CAO-LORMEAU et al., 2016).

A infecção ocasionada pelo Zika foi inicialmente descrita como uma doença febril leve, com erupção cutânea, conjuntivite, dores articulares e cefaleias; após o surto na Polinésia Francesa (Pacífico Sul), entre 2013 e 2014, houve a associação desta com Guillain-Barré (CAO-LORMEAU et al., 2016).

Sua epidemia foi considerada a maior já registrada na América Latina e as evidências apontam para a relação entre o vírus e malformações neonatais como a microcefalia. O que fez da infecção um grave problema de saúde no Brasil. O surto desta rara condição foi, recentemente, associado à infecção por Zika no útero. Além da microcefalia, outras manifestações têm sido relatadas em recém-nascidos como convulsões, problemas de deglutição, problemas de audição, falhas visuais (WHO, 2016; BRASIL, 2016; DREZETT et al., 2016). A figura 1 retrata as principais áreas de risco para a infecção.



Figura 1. Mapa mundial para risco de infecção por Zika vírus. Fonte: CDC, 2017.

Já a infecção por CHIKV, causador da Chikungunya, fora inicialmente relacionada a um surto no sul da Tanzânia, na província de Tanganyca (África), com um quadro similar ao da infecção causada por DENV, com severidade na artralgia, diferenciada por impedir o paciente de mudar a posição do corpo sem ajuda (MASON; HADDOW, 1957; VU et al, 2017). As manifestações articulares podem perdurar por anos, podendo se assemelhar aos sintomas da artrite reumatóide (BOUQUILLARD et al., 2018).

Além destes, vale ressaltar também a importância da Febre Amarela no cenário nacional atual. Segundo o Ministério da Saúde (2017), o Brasil vive o maior surto de febre amarela já observado nos últimos anos. Esta por sua vez, é causada pelo arbovírus YFV, e pode ser do tipo urbana, onde o homem atua como o hospedeiro disseminador da doença e o mosquito *A. aegypti* como o vetor no meio urbano. A febre amarela silvestre tem como vetores, mosquitos do gênero *Haemagogus* e *Sabethes*; na África outras espécies de *A.* participam da transmissão, como *A. africanus*, *A. furcifer* e *A. simpson* (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; VASCONCELOS, 2004; BRASIL, 2017).

A doença esteve durante muito tempo sob controle no Brasil com uso de vacinas, tendo ocorrência apenas em áreas da região amazônica e registros de pequenos surtos em populações não vacinadas. A preocupação ressurgiu diante do número de casos registrados

principalmente nos estados da região Sudeste, como no estados de Minas Gerais e Espírito Santo (MONATH, 2001; ALMEIDA et al, 2012).

A febre amarela pode ser caracterizada como doença infecciosa viral aguda, com período de incubação de 3 a 6 dias, tendo curta duração (12 dias) e de variável gravidade, uma vez que pode ser oligossintomática ou assumir forma mais severa. No último caso, observam-se icterícia, albuminúria e hemorragia, associados a quadros de insuficiência renal e hepática que podem levar a morte. As formas leves da doença podem ser detectadas por exames específicos (VASCONCELOS, 2003; BRASIL, 2004).

A fêmea do mosquito se torna um vetor destas arboviroses durante o repasto sanguíneo, ao picar uma pessoa infectada. O flavivírus, por exemplo, interage com receptores celulares e infecta células epiteliais do intestino médio por onde passam por um processo de maturação e então se dispersam para células de órgãos-alvos secundários, as glândulas salivares (WOODRING, 1996; BLACK et al.,2002).

2.2 Aspectos sobre o vetor *Aedes aegypti*

A. aegypti é uma espécie pertencente à família Culicidae, subfamília Culicinae e subgênero *Stegomyia*, é considerado um mosquito cosmopolita de regiões tropicais e subtropicais. Sendo uma espécie de mosquito nativa da África e atualmente distribuído em todo o mundo (Figura 2) (KRAEMER et al., 2015).

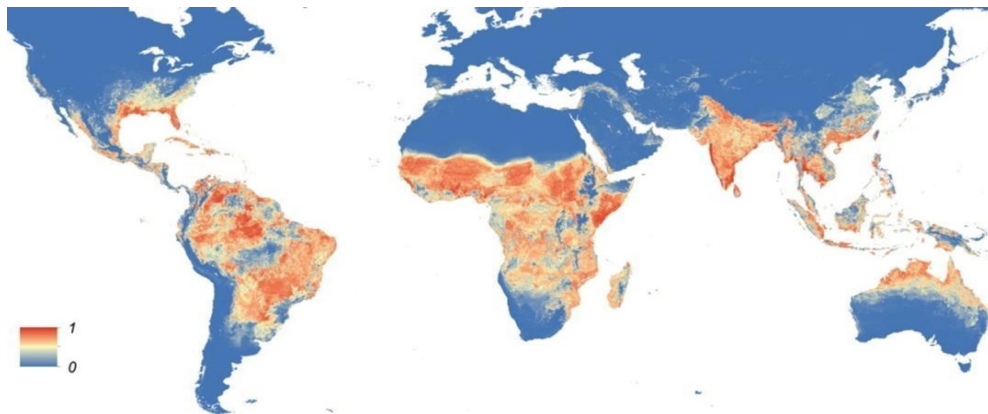


Figura 2. Distribuição mundial de *Aedes aegypti*. O mapa mostra a probabilidade de ocorrência (de 0 azul para 1 vermelho) em uma resolução espacial de 5 km × 5 km. Fonte: KRAEMER et al., 2015.

De ocorrência urbana, o mosquito é a espécie mais sinantrópica da família Culicidae, estando relacionado ao peridomicílio e domicílio humano (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; OLIVEIRA et al., 2015). Segundo Consoli e Oliveira (1994), o vetor foi introduzido no Brasil durante o tráfico de escravos, no período colonial; por sua importância como vetor da febre

amarela, foi severamente combatido e erradicado em 1955. Cerca de dez anos mais tarde, foi reintroduzido no país. Recipientes artificiais como pneus, latas, vidros, frascos de pet, pratos de vasos, xaxins e vasos de planta são criadouros preferenciais. Ambientes como caixas d'água, latões, lagos artificiais, piscinas e aquários também são focos do mosquito, principalmente pela capacidade de armazenarem água parada e limpa (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Nesse sentido, para Varejão et al. (2005) o ciclo aquático do *A. aegypti* depende da qualidade do reservatório de água disponível. Entretanto, sabe-se hoje que o mosquito se adapta as mais diversas situações, utilizando como criadouros, bromélias, poças de água e até ambientes com elevado grau de poluição como esgotos domésticos e esgotos a céu aberto (BEZERRA et al., 2009).

Durante a estação chuvosa, a densidade populacional do mosquito é aumentada, embora ele consiga manter sua população também nas estações secas. Este fato pode ser evidenciado pelo número de infecções as quais o *A. aegypti* atua como vetor (VIANA; IGNOTTI, 2013).

Somente as fêmeas são hematofágicas, fazendo seu pasto sanguíneo em horários diurnos, ao amanhecer e pouco antes do crepúsculo vespertino, podendo atacar a noite por proximidade do homem ao seu abrigo. A cópula acontece nos ambientes domiciliares e peridomiciliares, assim como a postura dos ovos. O *A. aegypti* é holometabólico, passando por uma fase aquática que compreende os estágios de ovo, larva (quatro estádios) (figura 3), pupa e fase terrestre corresponde ao adulto alado (FORATTINI, 2002). A postura de seus ovos é feita próximo à superfície, em locais úmidos e escuros, ficando aderidos às paredes dos recipientes (CHUA et al., 2004; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Uma fêmea, em condições ideais, pode chegar a pôr até cerca de 270 ovos (BESERRA et al, 2006).

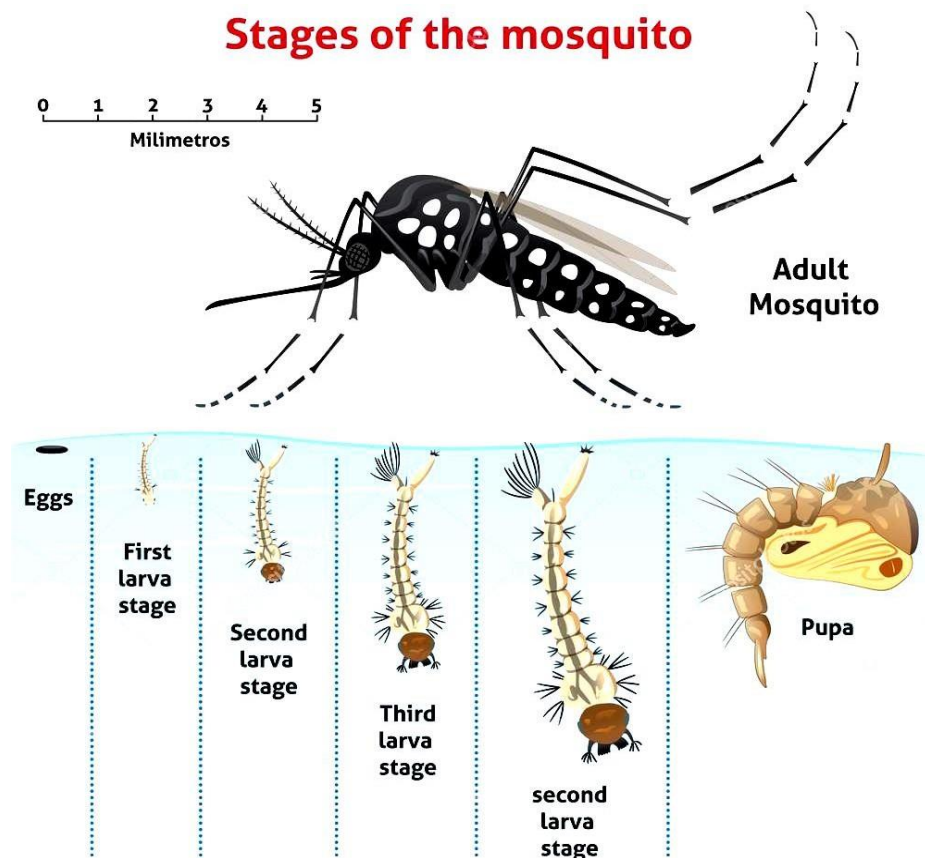


Figura 3. Representação do das fases do ciclo de vida de *Aedes aegypti* . Fonte: COSMO, 2016

Os ovos são elípticos, de contorno fusiforme, medindo cerca de um milímetro e, imediatamente após oviposição apresentam coloração esbranquiçada e logo depois enegrecem. A postura de cada ovo é realizada individualmente pelas fêmeas que são capazes de ovipor suas coleções em mais de um ponto (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). Após a postura, o desenvolvimento embrionário pode ocorrer em até 48 horas, o pós-embrionário pode variar de seis a onze dias. Os ovos podem permanecer em quiescência durante meses ou até mais de ano. Esta adaptação é uma barreira no controle do vetor, uma vez que, encontrando condições após uma estação seca, por exemplo, esses ovos podem eclodir; esse é um mecanismo favorável à dispersão e permanência do vetor (SILVA; SILVA, 1999; SILVA; SILVA, 2000).

Após eclosão, as larvas, como as de outros mosquitos, passam por quatro estádios: L1, L2, L3 e L4. O próximo estágio é o de pupa, que não se alimentam e a respiração ocorre por trompetas. (FORATTINI, 2002).

Quanto a sua morfologia é um mosquito de cor escura com escamas branco-prateadas distribuídas pelo seu corpo, formando listras. Sua característica marcante é a presença de um padrão de listras em seu mesonoto em forma de lira. As pernas são escuras com manchas claras em suas articulações. Pode-se observar também anéis de escamas claras nas extremidades basais dos artículos tarsais. Observa-se também o dimorfismo sexual, o macho possui antenas plumosas e as fêmeas, antenas pilosas (Figura 4). As larvas apresentam sifão respiratório curto, levemente enegrecido, espículas latero-torácicas quitinizadas e bastante desenvolvidas, escamas do segmento VIII com espinhos laterais e um central (figura 5). (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 1962; MARTINS et al, 2003).



Figura 4. Representação do Dimorfismo sexual de *Aedes aegypti* . Da esquerda para a direita: Macho, fêmea.



Figura 5. A: Espículas latero-torácicas quitinizadas; sifão respiratório; **B:** escamas (Pecten) do segmento VIII com espinhos laterais e um central de *Aedes aegypti*.

2.3 Controle de *Aedes aegypti*

Os métodos de controle de insetos são antigos e se constituíam principalmente em técnicas de controle biológico relacionados à prática agrícola. O método de maior impacto, como o uso de inseticidas químicos, teve destaque logo após a Segunda Guerra Mundial com o desenvolvimento do DDT, cuja atividade de uma aplicação perdurava por meses; diferentemente das técnicas antigas que dispunham de uma ação imediata e de curta duração (BRAGA; VALLE, 2007).

Ao final do século XIX, a transmissão de muitas doenças foi associada a insetos como mosquitos e outros artrópodes e, para algumas destas doenças como a febre amarela, o combate esteve aliado ao uso de vacinas, e a outras, como Dengue, o combate esteve diretamente relacionado ao controle do vetor (BRAGA; VALLE, 2007).

Nesse sentido, o controle de vetores deve partir de um conjunto de práticas aplicáveis em um determinado ambiente e que possam atuar de forma integrada ou seletiva. Os programas de controle são direcionados de acordo com as condições ambientais e dinâmica populacional do vetor, de modo a não causar impactos à saúde humana. É importante destacar que o manejo de vetores inclui manejo ambiental, controle biológico, controle químico e manejo da resistência aos inseticidas (WHO, 1995).

Este controle pode ser realizado por meio de métodos mecânicos, físicos, biológicos ou químicos. O mecânico consiste em adoção de medidas capazes de eliminar os criadouros e impedir a dispersão do mosquito (WHO, 2009). Para controle biológico, destacam-se o uso de predadores naturais, uso de insetos transgênicos e também o uso de inseticidas biológicos, como é o caso do Bti, oriundo de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*, bactéria capaz de produzir endotoxina que possui ação tóxica contra larvas de *A. aegypti* (CAVALCANTI et al, 2007; WHO, 2009).

Na Saúde Pública, o uso de inseticidas químicos é o método mais utilizado. As principais classes de inseticidas utilizados são os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (BRAGA; VALLE, 2007).

Carbamatos são substâncias derivadas do ácido carbâmico. Inseticidas deste grupo, como o propoxur, comercialmente conhecido como Baygon®, possuem alta atividade e baixa ação residual devido sua instabilidade química e baixa toxicidade em longo prazo; após absorção são amplamente distribuídos para tecidos e órgãos, e são de fácil eliminação; atuam como inibidores direto da acetilcolinesterase (BARON 1991; MÍDIO; SILVA, 1995).

O uso de substâncias químicas no combate ao *A. aegypti* é uma prática convencional, tendo como alvo as larvas a partir do uso de larvicidas como temephos, *Bacillus thuringiensis*

var israeliensis (*Bti*), em locais de reprodução natural. Os adultos são combatidos em situações de surto ou quando a densidade populacional dos mosquitos não é reduzida somente por meio de larvicidas, para estes casos dispõem-se da técnica de pulverização espacial com o uso de piretróides e organofosforados (WHO, 1997).

Estes últimos vieram substituir os organoclorados, cuja formulação contém hidrocarbonetos e cloro, com destaque para o dicloro-difenil-tricloroetano, o DDT, com alta capacidade residual, deixando de ser utilizado devido aos danos gerados ao meio ambiente. Os organofosforados, apesar de serem biodegradáveis e se acumularem mais dificilmente nos tecidos, apresentaram desvantagens relacionadas à sua alta toxicidade em vertebrados e à sua instabilidade química, necessitando de aplicações periódicas, com efeitos tóxicos de curto prazo (NDUMU, 1999; CHEN; ROGAN, 2003; BRAGA; VALLE, 2007).

Tanto os organoclorados quanto os organofosforados atuam no sistema nervoso, o primeiro nos canais de sódio, impedindo a transmissão de impulso nervoso, ou impedindo a entrada de cloreto por meio da inibição do receptor de ácido gama - aminobutírico. Os organofosforados atuam semelhante aos carbamatos, inibindo a acetil - colinesterase, aumentando a quantidade de acetilcolina disponível nas junções nervosas e impedindo a transmissão dos impulsos nervosos (WALISZEWSKI et al, 2003; BRAGA; VALLE, 2007; WHO, 2009). Quando o inseto é suscetível a esse mecanismo de ação, a hidrólise da acetilcolina não acontece e esta se acumula na fenda sináptica, gerando impulso nervoso constante, o que leva à excitações, tremores e parasília, levando à morte. São organofosforados o fenitrothion, temephos, malation (ELDEFRAWI et al., 1985).

No ano de 2014, o Temephos, larvicida de escolha e recomendado pela Organização Mundial de Saúde para uso em água potável, foi substituído no Brasil pelo pyriproxyfen devido à alta resistência que as larvas passaram a apresentar (BRASIL, 2014). O pyriproxyfen é recomendado pela Organização Mundial de Saúde para uso autorizado em água potável; é um análogo de hormônio juvenil, atuando como inibidor do desenvolvimento do inseto.

As formulações larvicidas a base de hormônio de crescimento como o pyriproxifen (2-[1-metil-2-(4-fenoxifenoxi) etoxi] piridina) (PPF), methoprene, triflumuron, vêm sendo bastante utilizadas como alternativa no controle de *A. aegypti*. Estas atuam inibindo o desenvolvimento e causando danos ao tecido de modo a impedir o desenvolvimento de características adultas (MARTINS; SILVA, 2004; BRASIL, 2014). O pyriproxifen, utilizado atualmente no Brasil é um análogo do hormônio juvenil, capaz de inibir a metamorfose do mosquito.

O uso do PPF teve início com aplicações domésticas e agrícolas no controle de espécies de insetos, como a mosca branca, no qual age inibindo o processo de embriogênese, é amplamente utilizada também para conter pulgões e minhocas (GINJUPALLI; BALDWIN, 2013; WHO, 2008). É um composto aromático considerado estável com meia-vida entre 16 e 21 dias, sob orinetação para ingestão diária aceitável de 100 mg/kg de peso corporal por dia, para toda a vida. Para água potável, é permitido a concentração final de 0,01 mg/L (WHO, 2007; WHO, 2008; DZIECIOLOWSKA et al., 2017).

Estudos sobre a toxicidade do composto mostram que o PPF pode ser tóxico ou letal para organismos não-alvo como invertebrados e peixes de pequeno porte, nos níveis utilizados para o controle de mosquitos, por isso seu uso em águas superficiais não é recomendado (LAWLER, 2017; SULLIVAN; GOH, 2008).

2.4 Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OE) são metabólitos secundários de vegetais voláteis, tendo como característica marcante, o aroma. São misturas naturais complexas, contendo de 20 a 60, ou mais, componentes que compreendem as classes dos terpenos, como sesquiterpenos, triterpenos e fenilpropanóides, podendo compor moleculares menores como alcoóis, aldeídos, cetonas. São caracterizados por apresentarem dois ou três compostos em maior concentração, conhecidos como compostos majoritários, os quais costumam estar relacionados às atividades biológicas (BAKKALI et al., 2008).

Os OE não estão relacionados ao crescimento, desenvolvimento ou funções básicas para sobrevivência da planta tais como os produtos do metabolismo primário, e por isso, durante muito tempo acreditava-se que eram um desperdício fisiológico ou apenas produtos de desintoxicação (MOTHES, 1980; KNOBLOCH et al., 1986). Entretanto garantem vantagens adaptativas, sendo importantes na defesa contra microorganismos e predadores reduzindo o apetite por estas, e ainda como inibidores de germinação, atração a polinizadores e proteção contra perda de água e aumento de temperatura (BRUNETON, 1991; SIMÕES, 2000; OUSSALAH et al., 2007; BAKKALI et al., 2008). Além disso, a sua biossíntese é derivada dos processos de fotossíntese, glicólise, Ciclo de Krebs. Se encontram armazenados em estruturas especializadas como células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos, tricomas glandulares, bolsas lisígenas ou esquizolisígenas, podem estar estocados em diferentes órgãos das plantas como folhas, flores, cascas de caule, rizomas, frutos e sementes (SIMÕES et al., 2016).

É importante destacar que o óleo essencial extraído de órgãos diferentes da mesma

planta podem apresentar composição e características organolépticas diferentes (SIMÕES et al., 2016). Além disso, vale ressaltar que a composição e a quantidade dos óleos essenciais podem variar de acordo com as características ambientais, sendo o óleo essencial um resultado da relação entre planta e ambiente. Estudos relatam que os tipos e características do solo, como composição, disponibilidade de nutrientes, além de intensidade luminosa, clima, estação do ano, herbivoria, fatores genéticos (SIMÕES, 2016; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; MASSOTI et al., 2003).

A técnica utilizada para a extração do óleo essencial também interfere no seu conteúdo, técnicas de hidrodestilação e extração por arraste de vapor fazem uso de calor e, as vezes, a temperatura necessária para extrair substâncias é suficiente para degradar algumas substâncias e formar novos compostos. Além disso, o tempo de destilação pode ser determinante na composição e, compostos com menor pressão de vapor são destilados mais lentamente por serem menos voláteis e terem maior peso molecular. Processos que não envolvem calor, como extração por fluido supercrítico podem apresentar uma composição e quantidade diferenciada das anteriormente citadas (SIMÕES, 2016; CANNON et al., 2013). O estágio de desenvolvimento em que se encontra a planta também pode interferir na composição e quantidade de óleo essencial, fato que pode ser justificado pela necessidade que o vegetal tem de se adequar às suas necessidades (OLIVEIRA et al., 2005).

Os óleos voláteis são amplamente explorados na perfumaria, na indústria de cosméticos e medicamentos como adjuvantes, alimentos, ou comercializados de forma bruta, tem sido utilizados, por suas propriedades fungicidas, bactericidas, inseticida, como uma alternativa para produtos sintéticos biodegradáveis. São encontrados em várias plantas e possuem aroma e sabor característico, insolúveis em água e solventes orgânicos (SILVA-SANTOS et al., 2006).

Os OE têm sido alvo de diversos estudos devido à riqueza de sua composição, tendo apresentado ação anti-mutagênica relacionada a uma capacidade anticancerígena (MANOSROI et al, 2006); antioxidante (AESCHBACH et al, 1994; ALMA, 2003); antimicrobiana (ALMA, 2003; MARTINEZ et al., 1996; SCHMOURLO et al., 2005); antiinflamatória (GAZZANEO et al., 2005), larvicida (DIAS et al, 2015).

Os mecanismos sobre os quais os óleos essenciais executam suas atividades biológicas ainda não foram bem elucidados, principalmente pela composição diversa que pode atuar em conjunto. Ríos et al. (2017), em estudo com óleos essenciais e suas misturas evidenciou atividade larvicida de todos os óleos essenciais testados frente *A. aegypti*, com destaque para a mistura dos óleos *Lippia origanoides* e *Salvia glutinosa* cuja CL₅₀ foi equivalente a 38,40

mg/L, e individualmente apresentaram CL's equivalentes a 53,37 e 65,71 mg/L respectivamente; foi apontada o possível sinergismo entre as substâncias como o causador da atividade.

Outras vertentes buscam a relação entre a estrutura das moléculas e seu alvo. Estudos sobre atividade larvicida de óleos essenciais relatam que a lipofilicidade dos seus constituintes podem estar relacionados à modulação da atividade, considerando que a interação pode levar à inibição ou desativação de proteínas e enzimas (RYAN; BYRNE, 1988; SANTOS et al., 2010).

Quanto à sua composição química, os OE compõem duas classes de origem biossintética distinta, um grupo que compreende terpenos e terpenóides e o outro que abrange os constituintes aromáticos e alifáticos de baixo peso molecular (BETTS, 2001; PICHERSKY et al., 2006). Os fenilpropanóides são compostos aromáticos que contem uma cadeia lateral de três átomos de carbono ligada ao anel aromático, são formados a partir do ácido chiquímico. Já os terpenos tem origem na via xilulose-5-p e da via mevalonato. Apesar de serem produzidos por vias diferenciadas, os precursores dos metabólitos secundários são originados do metabolismo primário vegetal, fotossíntese, glicólise, ciclo de Krebs (Figura 6).

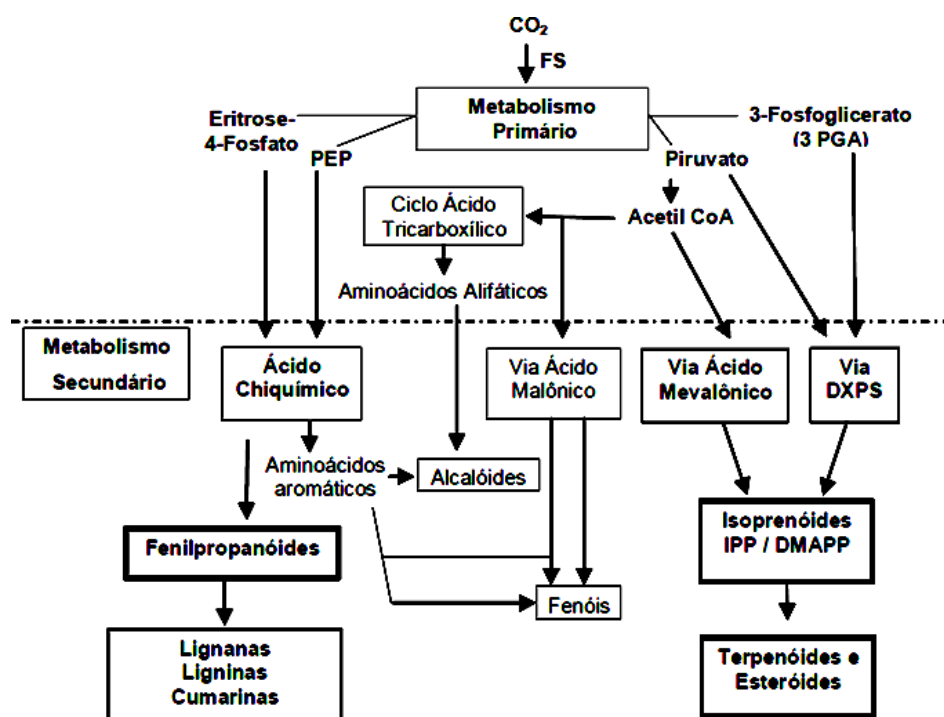


Figura 6. Esquema representativo da biossíntese dos metabólitos secundários. Fonte: DESCHAMPS, 2005. Adaptado por CASTRO, 2006.

Os terpenos são os compostos mais abundantes formados por unidades de isoprenos (C5), contendo cinco carbonos na sua cadeia principal. Podem ser do tipo monoterpreno, sesquiterpenos, triterpeno. Os monoterprenos (Figura 7) são compostos por duas unidades de isoprenos (C10), podendo ser acíclico, monocíclico ou bicíclico, assumem forma molecular $C_{10}H_{16}$. Após a formação, podem sofrer ciclização, oxidação, hidratação que darão origem a diversos compostos.

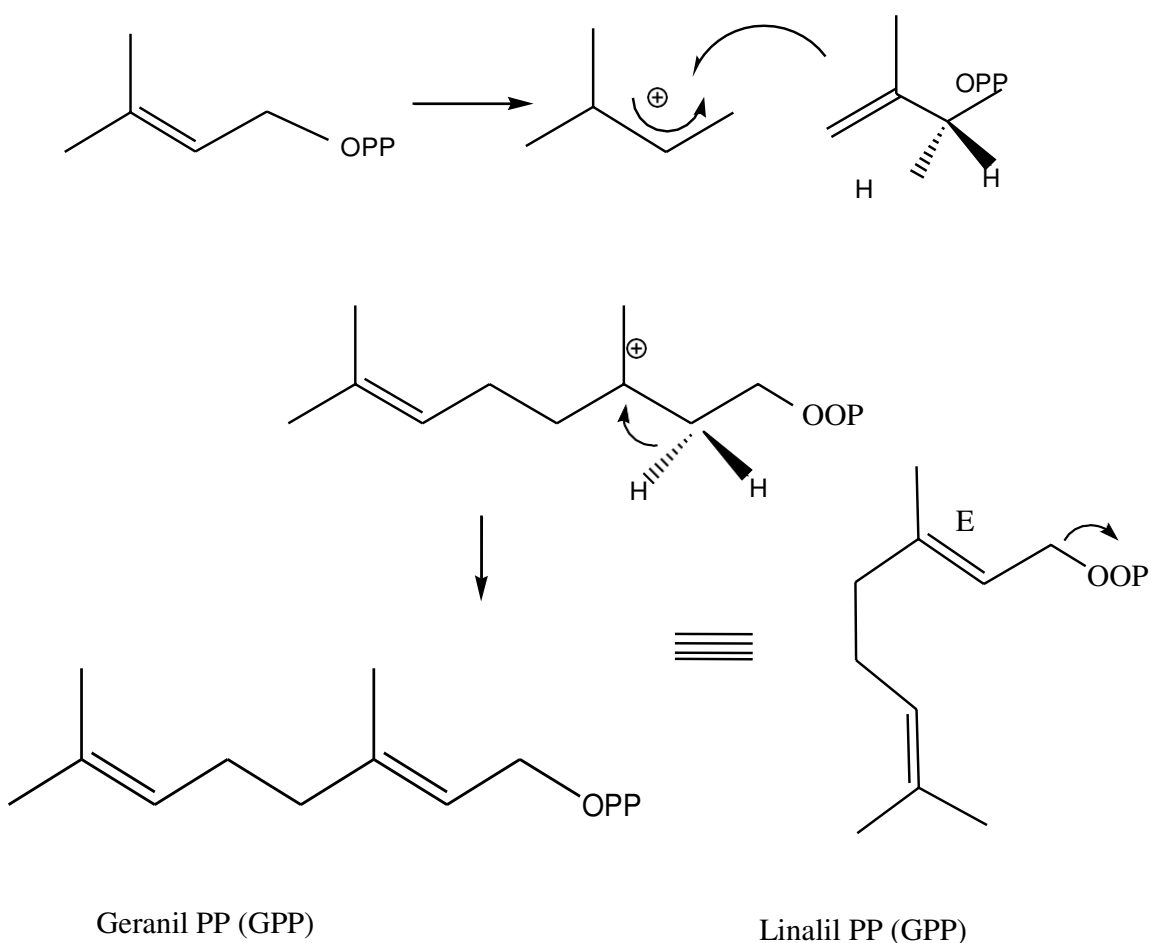


Figura 7. Esquema da biossíntese de monoterprenos a partir de DMAPP E IPP. Fonte: SILVA, 2006.

Os sesquiterpenos (Figura 8) são formados por três unidades isoprênicas (C15), apresentam fórmula molecular $C_{15}H_{24}$, neste caso ocorre a adição de uma molécula de isopentil pirofosfato ao geranilpirofosfato, esta reação dará origem a sesquiterpenos de cadeia aberta e sesquiterpenos cíclicos.

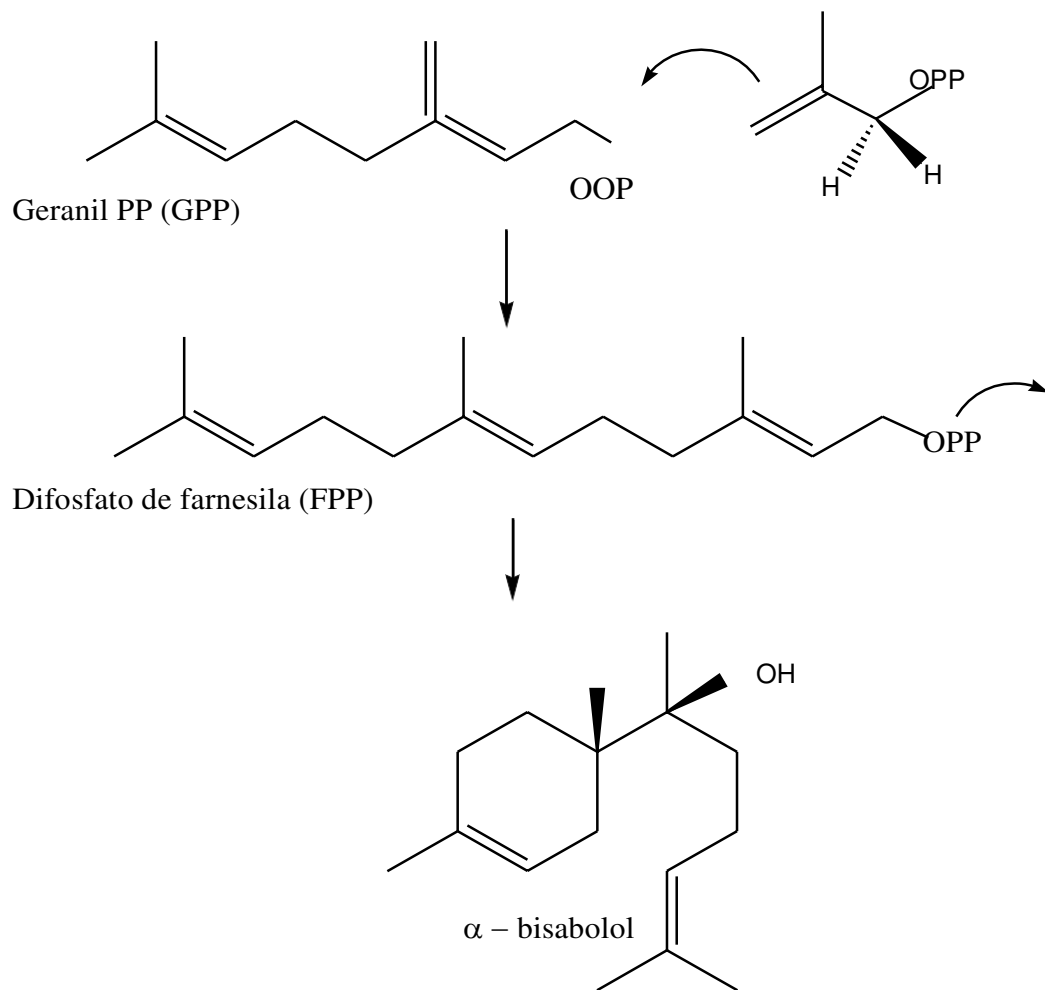


Figura 8. Esquema da biossíntese de sesquiterpenos (C15). Fonte: SILVA, 2006

Os triterpenos são formados por seis unidades isoprênicas e se origina a partir da adição eletrofílica do C1 de uma molécula de difosfato de farnesila (FPP) ao C2 de outra. A partir de então, surge um precursor do esqualeno, o presqualeno (PP), que por sua vez perde a molécula de difosfato e sofre rearranjo produzindo um ciclopropano. Ocorre quebra entre os carbonos 1 e 2 da molécula e a entrada de um hidreto, levando à formação do esqualeno e pass por ciclizações, formando, nas plantas, o cicloartenol, precursor direto dos triterpenos (Figura 9).

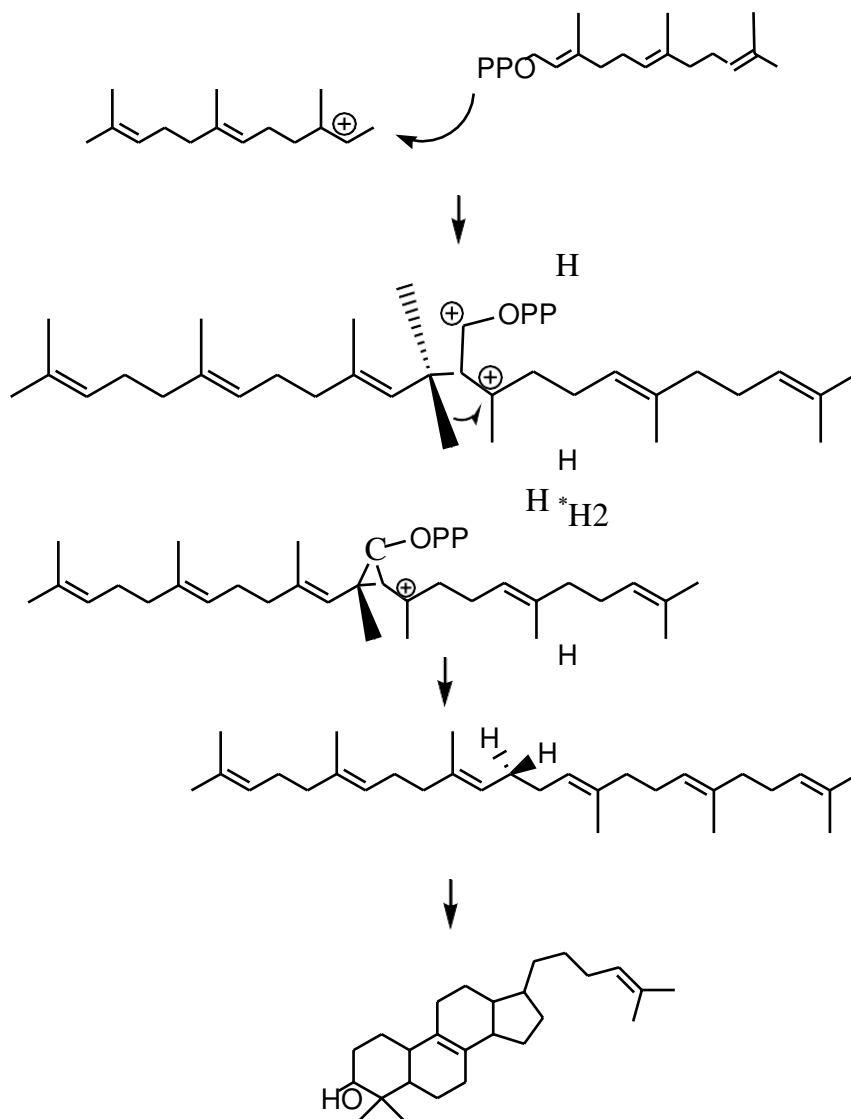


Figura 9. Esquema da biossíntese Triterpenos). Fonte: SILVA, 2006

As técnicas de extração desses óleos podem variar de acordo com a localização dos óleos na planta e com a proposta de uso, sendo os principais métodos:

a) enfloração: método antigo e bastante empregado em indústrias de perfumaria para casos de plantas com alto teor de óleo e com alto valor comercial. É utilizado para extração em pétalas de flores, as quais são depositadas sobre uma camada de gordura, à temperatura ambiente, sob determinado tempo, em seguida a gordura é tratada com álcool que, por sua vez, é destilado à baixas temperaturas restando o insumo de interesse (óleo essencial);

b) destilação: técnica convencional para a extração de óleos voláteis. Pode ser do tipo hidrodestilação quando as partes vegetais são imersas em água no balão do sistema de

destilação, e por arraste por vapor d' água, a qual o material vegetal fica acima da água em ebulição, entrando em contato apenas com o vapor, responsável pela retirada do óleo volátil;

c) **prensagem a frio espremedura:** processo pelo qual ocorre a ruptura das glândulas de óleo por meio de prensagem ou abrasão, o óleo é removido com um jato de água e separado da emulsão por meio de técnicas como decantação, destilação, centrifugação;

d) **extração por solventes:** os óleos podem ser extraídos por solventes orgânicos graças a sua baixa polaridade e seu caráter lipofílico, podendo ser utilizados hexano, éter etílico, diclorometano e outros, a separação se dá com as diferenças de temperatura de ebulição do solvente e o óleo. Dentre as desvantagens da técnica, destacam-se o risco de permanência de resíduos de solvente no óleo e consequentemente, riscos toxicológicos;

e) **extração por fluido supercrítico:** é o método de escolha por indústrias, permite uma extração de maior eficiência e sem interferentes que os solventes ou as altas temperaturas dos outros métodos ocasionam. Neste sistema o CO₂ é inicialmente liquefeito por compressão e em seguida aquecido a uma temperatura de 31° C. A essa temperatura o CO₂ apresenta viscosidade análoga de um gás e alta dissolução como um líquido, o que faz com que a extração aconteça. Após essa etapa o CO₂ é resfriado e se torna, completamente, gás; deixando a amostra sem resíduos. A desvantagem está relacionada a alta periculosidade inerente às altas pressões (SIMÕES, 2016).

2.5 *Baccharis trimera* Less D.C.

A *Baccharis trimera* é uma espécie pertencente à família Asteracea (figura 10). Sendo esta uma das famílias com maior destaque na produção de compostos de defesa, são capazes de sintetizar substâncias de todas as classes de metabólitos secundários, sendo muito comum os terpenóides, além de flavanóides, cumarinas e taninos (TANG et al., 2000). São cerca de 1500 gêneros e aproximadamente 23 mil espécies, compostas por plantas de pequeno porte como ervas ou arbustos e raramente árvores (ALMEIDA - CORTEZ, 2004). Popularmente conhecida como carqueja, carqueja amarga, carquejinha, é um arbusto nativo do sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina (ABAD; BERMEJO, 2007).

A



B



Figura 10. **A.** Arbusto de *Baccharis trimera* com inflorescências dispostas lateralmente nos ramos. Fonte: Heiden, 2015. Flora do Brasil. **B.** Partes aéreas de *Baccharis trimera*. Fonte: autor.

O gênero *Baccharis* é o maior em número de espécies da família Asteracea podem ser encontradas em toda a América do Sul e algumas regiões da América do Norte (ARIZA ESPINAR, 1973; FIELDING, 2001; VERDI, 2005), é bastante utilizada na medicina tradicional e produção de medicamentos fitoterápicos, por suas propriedades digestivas e hepatoprotetoras (BORELLA et al., 2006; MARTINS-RAMOS et al., 2010).

Cientificamente, possui diferentes denominações, as quais muitas destas já foram anteriormente consideradas espécies diferentes: *Baccharis genistelloides* var *crispa* (Spreng.) Backer; *Molina crispa* (Spreng.) Less; *Pingraeae crispa* (Spreng.) F.H. Hellw.; *Baccharis subcrispa* Malag.; *Baccharis crispa* Spreng.; *Baccharis trimera* var *carqueja* D.C.; *Baccharis*

cripta Mart.; *Molina trimera* Less; *Baccharis genistelloides subsp. crispa* (Spreng.) Joch Mull (HEIDEN, 2015).

B. trimera se caracteriza como arbusto ereto, ramoso e glabro, atinge de 0,5 a 4,0 metros, sendo bastante ramificada, apresenta estrutura caulinar triada, conhecida como cladódios, é uma característica marcante nas carquejas (figura 9). Possuem inflorescências esbranquiçadas do tipo capítulo que se dispõem lateralmente nos ramos (BARROSO, 1976; LORENZI; MATOS, 2002).

Na medicina tradicional costuma ser utilizada na forma de infusão, principalmente no tratamento de distúrbios gastrointestinais e hepáticos, além do uso para tratamento da diabetes, hipertensão, processos inflamatórios, dores de cabeça (VERDI, 2005; KORBES, 1995; OLIVEIRA, 2005; GRANCE, 2008;). Utilizada, ainda, no tratamento de reumatismo, anemia, obesidade e gota (NAKASUGI; KOMAI, 1998; DI STASI et al.,2002; LADEIRA, 2002).

Gamberini et al. (1991) apresentou a atividade antissecretora do estômago e redução nas lesões gástricas induzidas por estresse. Oliveira (2005) demonstrou o potencial anti-diabético da espécie em doses altas. Em estudos de atividade antimicrobiana, Avancini et al. (2000) destacou a atividade antimicrobiana seletiva para bactérias gram-positivas do decocto obtido a partir de folhas de *Baccharis trimera*. Seu extrato bruto foi capaz, também, de reduzir área total de lesão ulcerativa induzida em cerca de 90% (DIAS et al, 2009).

Quanto à sua composição química, encontra-se predominantemente flavanóides como eupatorina, hispidulina, rutina, quercetina e outros; diterpenos como a bacrispina; lactonas, estigmasterol, saponinas. Em seu óleo essencial, é comum observar a presença de compostos como canfeno, alfa-pineno, limoneno, acetato de carquejilo, carquejol, ledol (ALONSO; DESMARCHELIER, 2006; MORAIS; CASTANHA, 2011).

3. OBJETIVOS:

3.1 Geral:

Avaliar a composição química e a toxicidade do óleo essencial das partes aéreas de *Baccharis trimera* (Less) DC frente larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

3.2 Específicos:

Obter a identificação da espécie vegetal a ser trabalhada;

Determinar os compostos químicos presentes no óleo essencial das folhas de *Baccharis trimera*;

Avaliar a atividade larvicida do óleo essencial frente a larvas de *Aedes aegypti*, para a obtenção de novos produtos naturais que possam ser utilizados no controle da transmissão da dengue, febre Chikungunha e Zika;

Analisar o potencial frente os diferentes estágios larvais da larva de *Aedes aegypti*;

Verificar a toxicidade do óleo essencial com ensaios in vitro frente *Artemia salina*;

Avaliar a ecotoxicidade aguda do óleo essencial de *Bacharis trimera* frente vertebrado *Danio rerio*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do material vegetal e Identificação Botânica

O material vegetal de interesse foi obtido comercialmente pela CPQBA-UNICAMP. A identificação botânica foi realizada pelo Herbário PCMA do CPQBA da UNICAMP, sob número de exsicata 1286. Uma amostra também fora encaminhada para o Herbário do Maranhão (MAR) - UFMA e encontra-se depositada sob número 9.013.

4.2 Obtenção e análise química do óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizado com as partes aéreas de *B. trimera* secas e trituradas, por meio do método de hidrodestilação, empregando o aparelho de Clevenger (BRASIL, 2010).

Após a etapa de extração, o óleo foi centrifugado e seco com sulfato de sódio anidro, com auxílio de pipeta Pasteur de vidro foi separado e armazenado em ampola de vidro do tipo âmbar, hermeticamente fechada e posteriormente conservados em ambiente refrigerado, entre 5-10°C (COUTINHO, 2006).

O rendimento do óleo essencial foi calculado baseado na relação massa/massa, obtida por meio do calculo de densidade a partir do volume de cada óleo obtido por massa (g) da planta em estudo utilizada na extração, conforme fórmula a seguir (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 1996).

Considerando:

Cálculo de rendimento do óleo:

$$\%R_{\text{end}} = \frac{V_{\text{óleo}} \cdot \rho_{\text{óleo}}}{m_{\text{planta}}} \cdot 100$$

$\rho_{\text{óleo}}$ = Densidade do Óleo (g/mL)

$V_{\text{óleo}}$ = Volume de óleo extraído (mL)

m_{planta} = Massa da planta utilizada para a extração, livre de umidade (g)

R_{end} = Rendimento (%)

A identificação química dos compostos dos óleos foi realizada por Cromatografia de fase gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) com a injeção de 1 mL (Auto injetor AOC-20i) em sistema Shimadzu QP 2010 ultra equipado com coluna capilar de sílica Rtx-5 MS (Restek, EUA) de 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno revestido com 5%-difênil/95%-dimetil- polisiloxano (0,25 µm de espessura do filme). A temperatura do forno do CG foi programa de 60°C a 240°C (10 min.) a 3°C/min., as temperaturas do injetor (split 1:20), linha de transferência e câmara de ionização foram de 250 e 200°C, respectivamente. Hélio foi usado como gás de arraste a uma velocidade de 1 mL/min.

Os espectros de massas foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV com scans automáticos na faixa massas de 35 a 400 m/z a 0,30 scans/s.

A quantificação dos componentes foi obtida por normalização da área do pico, utilizando o sistema FOCUS GC/FID, com temperatura da fonte de íons de 200° C utilizando nitrogênio como gás de arraste. O índice de retenção linear foi calculado para todos os compostos utilizando a série de n-alcenos (C8-C32, Sigma-Aldrich). Foi utilizada para a identificação a interpretação e comparação dos espectros de massas obtidos com as bibliotecas do CG, Adams 2006, Nist 2011 e FFNSC 2 (ADAMS, 2006). As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais da Universidade Federal do Pará.

4.3 Atividades biológicas

4.3.1 Ensaio de toxicidade frente larvas de *Aedes aegypti*

4.3.1.1 Obtenção das larvas de *Aedes aegypti*

A coleta dos ovos aconteceu com uso de armadilhas do tipo ovitrampa, utilizando paletas de Eucatex de tamanho 15 x 4 cm e vasos plásticos pretos de 15 cm de diâmetro por 15 cm de profundidade. As armadilhas foram instaladas em ambientes peridomiciliares. As paletas contendo os ovos foram imersas em água mineral em uma bandeja apropriada para que ocorresse a eclosão destes, o material esteve devidamente coberto com uma tela mosquiteiro para garantir o isolamento e a segurança em laboratório.

Após a eclosão, as larvas foram alimentadas com uma solução de ração de gato triturada, dissolvida e filtrada em água mineral, e então redissolvida no próprio recipiente onde ocorreu a eclosão.

4.3.1.2 Bioensaio larvicida contra *Aedes aegypti*

O ensaio larvicida foi realizado com larvas dos quatro estádios larvais, de acordo com a metodologia proposta pela Organização Mundial de Saúde com adaptações (KAMATCHI et al., 2016).

Cerca de 10 larvas foram colocadas em cada frasco contendo as soluções testes com auxílio de pipeta Pasteur. Para a realização dos bioensaios, uma solução estoque foi preparada com o óleo essencial, água mineral e solução de DMSO (Dimetilsulfóxido) a 0,1% (v/v) na concentração de 1000 µg/mL. Foram utilizadas seis concentrações (25, 50, 75, 100, 200, 250 µg/mL), as quais foram realizadas em triplicata.

A verificação de mortalidade foi realizada em 24 horas após o início do teste. O controle negativo consistiu em solução de água mineral e DMSO a 0,1% (v/v) e o controle positivo em solução de Sulfato de Dicromato de potássio (10 µg/mL). Foram calculadas as CL₅₀ e CL₉₀.

O delineamento experimental foi casualizado, seguindo o esquema fatorial 6 x 4 (concentrações x estádios larvais), sendo três repetições para cada concentração, totalizando 24 tratamentos.

4.3.2 Ensaio de toxicidade ambiental com *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade frente *A. salina* seguiu metodologia descrita por Meyer et al. (1982) e adaptada por Ruiz et al., (2005) e ABNT NBR16530 (2016) com adaptações.

4.3.2.1 Cultura de *Artemia salina*

Em um aquário contendo 1L de solução salina sintética (60 g de sal marinho/litro água mineral) foram adicionado aproximadamente 100 mg de cistos de *A. salina* obtidos comercialmente, mantendo-se esse sistema saturado com gás oxigênio por meio de auxílio de bomba de ar e temperatura controlada de 25°C, além de iluminação lateral e artificial, feita com uma lâmpada de 100 W. Em 48 h houve a eclosão dos ovos e larvas (náuplios) que migraram em direção a parte mais iluminada do aquário, por apresentarem fototropismo positivo. Estas larvas foram transferidas para um aquário contendo a solução salina sintética e mantidas em incubação por mais 24 h, sob as mesmas condições de iluminação e oxigenação, para que, 72 horas após a eclosão, as larvas se desenvolvessem para o estágio de metanúplio (CARVALHO et al., 2009; ABNT, 2017).

4.3.2.2 Bioensaio

Para a avaliação da letalidade de *A. salina*, partiu-se de uma solução estoque com a salina de 10000 µg/mL, óleo e DMSO (0,1% v/v) de onde foram retiradas alíquotas para a preparação de soluções de 10 mL em cinco concentrações 10 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL.

Dez larvas na fase metanáuplio foram transferidas para cada um dos frascos com suas respectivas concentrações. O controle negativo consistiu em salina sintética e DMSO (0,1%), já o controle positivo foi realizado com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). Após 24 horas de incubação foi realizada a contagem das larvas vivas, considerando mortos aqueles microcrustáceos que não se movimentaram durante a observação e nem com a leve agitação do frasco. Realizaram-se os testes em triplicata. A CL_{50} foi calculada por regressão linear, com índice de confiança de 95%, obtida da correlação entre a porcentagem de indivíduos mortos e a concentração do óleo (CARVALHO et al., 2005).

4.3.3 Ensaio de ecotoxicidade frente *Danio rerio*

Foi avaliada a atividade toxicológica diante de peixes *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae), também conhecida como zebrafish, comumente utilizada como em ensaios de ecotoxicidade. O peixes foram obtidos comercialmente, aclimatados e acondicionados em condições controladas de temperatura, oxigênio dissolvido, pH, condutividade. O ambiente esteve submetido à aeração constante, filtração e troca parcial da água a cada 72h (ABNT NBR 15088, 2016).

A toxicidade foi obtida de acordo com a norma padronizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas, por meio do método estático, sem reposição de água (ABNT NBR 15088, 2016), utilizando peixes adultos medindo de 2 a 4,0 cm.

Os testes foram realizados em triplicata, com concentrações variando entre 5 µg/mL e 25µg/mL. As soluções testes continham o óleo dissolvido em água e DMSO 0,1%, onde quatro peixes eram expostos em cada aquário (1,5L) e mantidos sob constante aeração. O ensaio foi composto por concentrações-teste e controles, positivo com sulfato de cobre (10 µg/mL) e negativo com água e DMSO 0,1% (v/v). Os experimentos tiveram duração de 48 h e foram calculadas as CL_{50} e 90 para s peixes. O bioensaio foi realizado com base na aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animal da Universidade Federal do Maranhão (nº23115009327/2017-10).

5. RESULTADOS

5.1 Composição química do óleo essencial de *Baccharis trimera*

O óleo essencial obtido das partes aéreas de *B. trimera* apresentou rendimento de 0,7%.

Em análise química foi possível identificar 74 constituintes correspondendo a 90% das substâncias do óleo essencial de *B. trimera* (Tabela 1).

Os sesquiterpenos Espatulanol (18,45%), Óxido de Cariofileno (15,24%) e E-Cariofileno (9,18%) foram os principais compostos identificados (Figura 11).

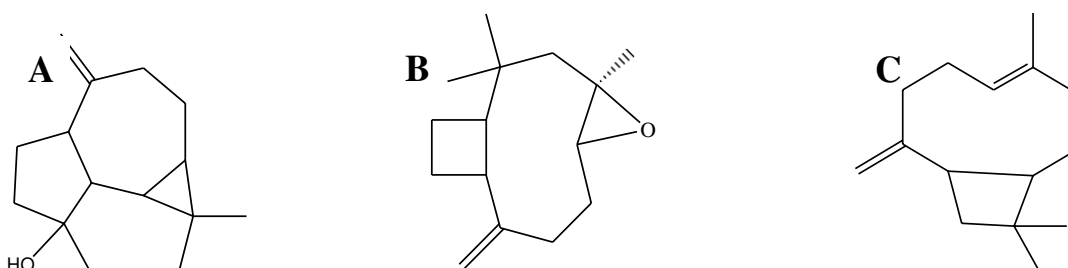


Figura 11. Representação estrutural dos componentes majoritários presentes no óleo essencial de partes aéreas de *Baccharis trimera*. A- Espatulanol; B- Óxido de cariofileno; C- (E)- cariofileno.

Tabela 1. Principais constituintes identificados no óleo essencial das partes aéreas de *Baccharis trimera*

Principais Constituintes	Teor (%) ^a	Índice de Retenção
Hexanal	0,05	801
(z) – 3 – hexenol	0,02	852
n – hexanol	0,07	864
α – pinene	0,39	934
thuja-2,4(10)-diene	0,02	954
β – pinene	2,85	978
Myrcene	0,31	991
p – cymene	0,03	1024
Limonene	0,12	1029
β – ocimene	0,09	1047
Terpinolene	0,06	1089
Linalool	0,89	1100
n – nonanal	0,03	1105
trans – pinocarveol	0,37	1139
Pinocarvone	0,30	1163
α – terpineol	0,26	1191
Myrtenal	0,61	1197
β – cyclocitral	0,04	1222
Geraniol	0,07	1255
δ – elemene	0,15	1339
α – cubebene	0,13	1351
Eugenol	0,30	1358
Isodene	0,09	1375
α – copaene	0,73	1378
β – damascenone	0,40	1386
β – cubebene	0,12	1392
β – elemene	0,88	1394
α – gurjunene	0,25	1412
caryophyllene (e-)	9,18	1422
β – copaene	0,27	1431
α - maaliene	0,22	1437
α – guaiene	2,14	1441
myltayl-4(12)-ene	0,13	1445
α – humulene	1,64	1456

Principais Constituintes	Teor (%)^a	Índice de Retenção
allo – aromadendrene	0,60	1461
9 – epi – caryophyllene	0,26	1463
cadina - 1, 4 – diene	0,05	1465
trans - cadina-1(6),4-diene	0,38	1476
γ – muurolene	1,21	1479
γ – muurolene	2,84	1483
β – selineno	0,57	1488
trans - muurola-4(14),5-diene	0,30	1493
Bicyclogermacrene	4,36	1499
α – muurolene	0,80	1502
α – bulnesene	0,76	1509
γ – cadinene	0,52	1516
(+) - cycloisolongifol-5-ol	0,09	1521
δ – cadinene	3,94	1526
trans - cadina-1,(2), 4 – diene	0,14	1534
α – cadinene	0,16	1540
α – calacorene	0,71	1545
Italiceneepoxide	1,42	1555
germacrene b	0,28	1559
β – calacorene	0,17	1566
Spathulenol	18,45	1582
caryophyllene oxide	15,24	1587
Viridiflorol	1,65	1594
cubeban-11-ol	0,63	1596
Rosifoliol	1,36	1604
humulene epoxide ii	1,27	1612
Junenol	0,38	1621
1 – epi – cubenol	0,79	1631
caryophylla-4(12),8(13)-dien-5- alpha-ol	0,53	1639
10 – epi - α – muurolol	1,46	1645
α – muurolol	0,57	1649
guaia-3,9-dien-11-ol<cis->	0,51	1652
α – cadinol	1,77	1657
14-hydroxy-9-epi-(e)- caryophyllene	1,37	1673
Cadalene	0,41	1676
germacra-4(15),5,10(14)-trien- 1-alpha-ol	0,35	1688

Principais Constituintes	Teor (%) ^a	Índice de Retenção ^b
eudesma-4(15),7-dien-1-beta-ol	0,33	1694
β – costol	0,06	1767
Neophytadiene	0,31	1841
Phytone	0,04	1846
Geranyllinalool	0,03	2029

a Calculado a partir da integração das áreas relativas dos picos nos cromatogramas

b Índice de retenção calculado durante a corrida em uma coluna capilar de sílica fundida, RTx 5/30m

Dos compostos identificados, cerca de 45% corresponde a sesquiterpenos hidrocarbonetos, 24% de sesquiterpenos oxigenados, dos quais dois são os majoritários; 14% de monoterpenos oxigenados, 7% de monoterpenos hidrocarbonetos, além de 10% de terpenos, alcoóis, cetonas, aldeídos e ésteres (Figura 12).

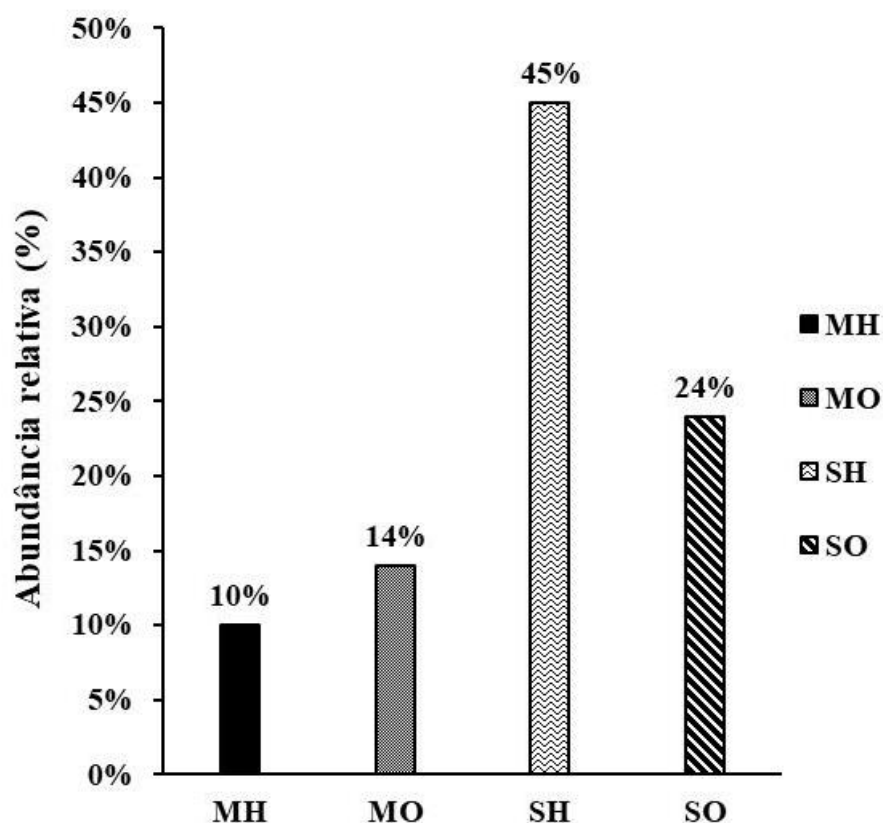


Figura 12. Porcentagem de monoterpenos hidrocarbonetos (MH), monoterpenos oxigenados (MO), sesquiterpenos hidrocarbonetos (SH) e sesquiterpenos oxigenados (SO) identificados no óleo essencial de *Baccharis trimera*.

5.2 Ensaio de toxicidade frente larvas de *Aedes aegypti*

Observou-se que o óleo essencial de partes aéreas de *B. trimera* se mostrou ativo e moderadamente ativo contra larvas de *A. aegypti* nos quatro estágios (L1, L2, L3, L4) (KOMALAMISRA et al., 2005). Apresentando toxicidade dependente de dose e do estágio larval. Quanto maior o estágio larval, maior foi a concentração necessária para a mortalidade de 50% das larvas (Figura 13).

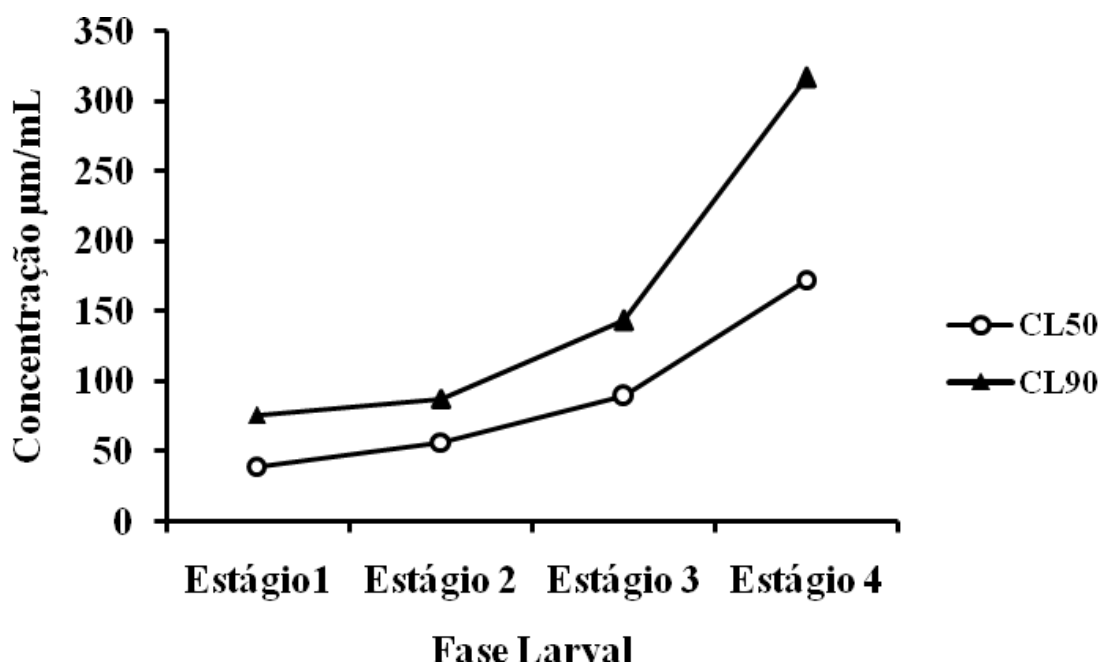


Figura 13. Gráfico das concentrações (CL₅₀ e CL₉₀) do óleo essencial de *Baccharis trimera* para os diferentes estágios larvais de *Aedes aegypti*.

Assim, o óleo essencial frente larvas do primeiro estágio apresentou CL₅₀ e CL₉₀ com valores de 38,8 e 76,3 µg/mL, respectivamente; com aumento de concentrações nos estágios seguintes, chegando a apresentar no último estágio CL₅₀ 171,8 e CL₉₀ 316,7 para o quarto estágio. Os dados de mortalidade e CL₅₀ e ₉₀ estão representados na tabela 2.

Tabela 2. Avaliação do óleo essencial *Baccharis trimera* sobre *Aedes aegypti* em diferentes estágios larvais.

Concentrações letais ($\mu\text{g/mL}$)*	ESTÁGIOS LARVAIS DE <i>Aedes aegypti</i>			
	1º estágio	2º estágio	3º estágio	4º estágio
CL ₅₀	38,8	55,8	89,7	171,8
CL ₉₀	76,3	87,7	143,1	316,7

*Análise realizada 24h após exposição. Não foi observado mortalidade de larvas expostas no controle negativo, solução de DMSO a 0,1%.

É importante destacar que mesmo as larvas que permaneceram vivas após 24 horas de tratamento, apresentaram diferenças no comportamento, se mostrando menos ativas e com movimentos mais lentos quando expostas à luz do estêreo, diferente das larvas do controle negativo que após 24 horas ainda estavam bastante ativas e ágeis.

5.2.1 Alterações morfológicas causadas nas larvas de *A. aegypti* pelo óleo essencial de *Baccharis trimera*

Neste estudo, o grupo controle, contendo água e DMSO, apresentou larvas ativas e com um aspecto vermiforme definido bastante característico para a larva. As regiões da cabeça, torax e abdômen estavam bem definidos, com espículas laterais, acúleos, sifão respiratório íntegro, corpo transparente e segmentos visíveis (Figura 13:A).

Nos grupos testes, os quais as larvas estiveram em contato com o óleo essencial dissolvido, foi possível observar modificações morfológicas como o deslocamento da cabeça (Figura 13:B, F), escurecimento do corpo (Figura 13: D), saída da matriz periotrófica (MP) pelo ânus (Figura 13: E), escurecimento do sifão respiratório (Figura 13: H), perda dos acúleos ou cerdas (Figura 13: C, H), partes importantes na respiração. Algumas apresentaram espessamento ou entumescimento no corpo larval (Figura 13: G, E), outras, aspecto mais delgado ou de estiramento do corpo da larva (Figura 13: F).

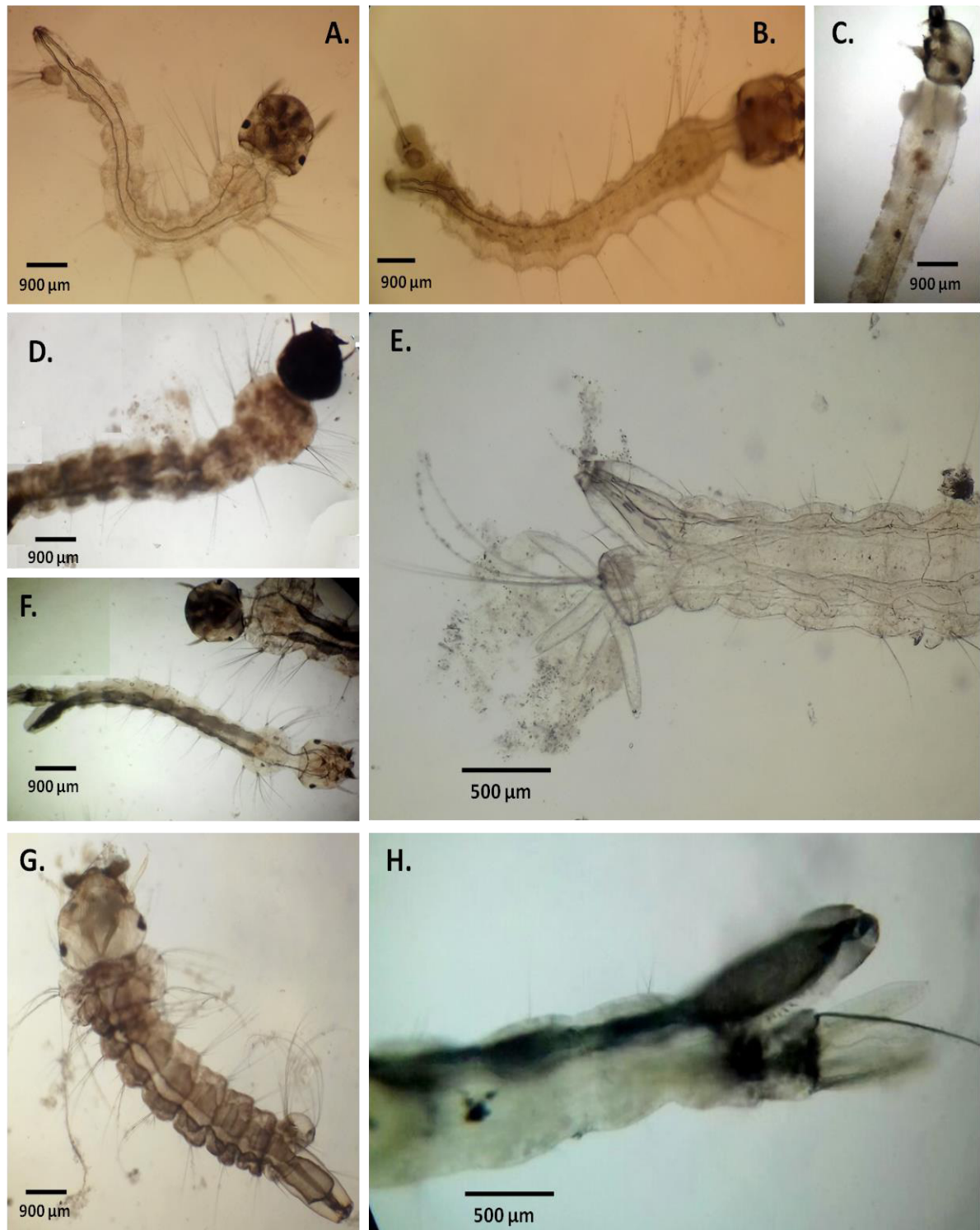


Figura 14. Morfologia das larvas de *Aedes aegypti* após 24 horas de tratamentos nas diferentes concentrações do óleo essencial de *Baccharis trimera*. **A:** Larvas do Controle negativo; **B:** Larva com segmentação pouco delimitada, espalhamento interno da MP, espessamento do ânus; **C:** Perda da segmentação, perda das cerdas, deformidade; **D:** deformidade e escurecimento da cabeça; **E:** Larvas apresentando saída da MP pelo ânus; **F:** Larvas apresentando alongamento ou estiramento do corpo; **G:** Larva apresentando entumescimento do corpo; **H:** Sifão respiratório com espessamento e enegrecido.

5.3 Toxicidade frente *Artemia salina* Leach.

Os testes de toxicidade com *A. salina* realizados neste trabalho com óleo essencial de *B. trimera* apontaram baixa toxicidade, com CL₅₀ de 264,59 µg/mL. Os dados de mortalidade e CL₅₀ estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Taxa de mortalidade e CL₅₀ em ensaio de toxicidade do óleo essencial de *Baccharis trimera* frente *Artemia salina*.

Óleo Essencial	TOXICIDADE EM <i>Artemia salina</i>		
	Concentrações (µg/mL)	Mortalidade (%)	CL ₅₀ (µg/mL)
<i>Baccharis trimera</i>	10	0	264.59
	100	5	
	250	40	
	500	55	
	1000	100	

5.3 Toxicidade frente *Danio rerio*

Em relação à toxicidade aguda para peixes, o óleo essencial pode ser considerado tóxico, uma vez que sua CL_{50} para o peixe foi inferior à CL_{50} apresentada para *A. aegypti* (Tabela 4). As variáveis, temperatura, oxigênio dissolvido e pH apresentaram-se constantes, assumindo valores em média de 24.2°C para temperatura; 8,4 mg.L⁻¹ O. D.; e pH de 8,4. Os valores não interferem na sobrevivência dos peixes (ABNT NBR 15088:2016).

Tabela 4: Taxa de mortalidade e CL_{50} em ensaio de toxicidade do óleo essencial de *B. trimera* frente *Danio rerio*.

Óleo Essencial	TOXICIDADE Aguda em <i>Danio rerio</i>		
	Concentrações (µg/mL)	Mortalidade (%)	CL_{50} (µg/mL)
<i>Baccharis trimera</i>	5	0	12,68
	10	75	
	25	87,5	

6. DISCUSSÃO

Em estudo de análise química do óleo essencial realizado por Moraes e Castanha (2011) para amostras comerciais de *B. trimera*, o composto majoritário foi o E-cariofileno (22%), seguido do espatulenol (20%) e do óxido de cariofileno (12%), os mesmos majoritários encontrados neste trabalho, o que sugere que se trata do mesmo quimiotipo (SIMÕES, 1999).

O espatulenol (Figura 10), sesquiterpeno classificado como constituinte majoritário da espécie *B. trimera*, é apontado como responsável por propriedades antibacterianas e moderada citotoxicidade (CHINOU, 1996). Esse composto também esteve entre os majoritários no óleo essencial em outras espécies do mesmo gênero, como *Baccharis dracunculifolia*, sendo o composto que se apresentou (MORAIS; CASTANHA, 2011; PALÁCIO et al., 2007).

O óxido de cariofileno é outro sesquiterpeno, assim como o E - cariofileno, já identificados em espécies do gênero *Baccharis* (SANTOS et al., 2012; MORAIS; CASTANHA, 2011), sendo reconhecido pela sua propriedade anticarcinogênica (ZHENG et al., 1992).

Suzuki et al. (2016), em caracterização química do óleo essencial de *Baccharis trimera*, destacou como compostos majoritários β – pineno (23,4%) e acetato de carquejila (19%), o espatulenol esteve em baixo teor. Silva et al. (2007), identificou o germacreno D (26%) e o β – cariofileno (17%) como majoritários. As diferenças encontradas na composição química dos óleos essenciais da mesma espécie podem estar relacionadas ao método de extração; o processo de hidrodestilação, por exemplo, pode levar a rearranjos, hidrólise de ésteres, oxidações; essa variação também pode ocorrer por fatores ambientais, composição do solo ou por existência de quimiotipos, no qual a mesma espécie botânica pode apresentar diferença significativa na composição química (SIMÕES, 1999). Além disso, devemos levar em consideração também outros fatores ambientais, bióticos e abióticos, fatores genéticos e fisiopatológicos, que podem interferir no metabolismo vegetal (GLOBBO-NETO; LOPES, 2007; PAVARINI et al., 2012).

Estes fatores podem justificar a ausência de acetato de carquejila e carquejol, considerados marcadores químicos do óleo essencial de *Baccharis trimera* (SIQUEIRA et al., 1985; SOUSA et al., 2004).

Quanto à atividade larvicida, Furtado et al. (2005) em estudo com óleo essencial de dez espécies de plantas aromáticas de diferentes gêneros (*Ageratum*, *Citrus*, *Lippia*, *Ocimum*, *Vanillosmopsis*, *Tagetes*), obteve a menor CL₅₀ para larvas de *A. aegypti* equivalente a 15,91

mg/mL (15910 µg/mL), valor superior ao encontrado no presente trabalho; este óleo teve como composto majoritário o sesquiterpeno oxigenado α - bisabolol. Cheng et al. (2003) considerou como óleos essenciais ativos ou com potencial para uso larvicida aqueles cujas CL₅₀ fossem iguais ou inferiores a 100 µg/mL. Por outro lado, Komalamisra et al. (2005) considerou como sendo efetivos os seus produtos que tiveram atividade em concentração abaixo de 750 mg/L (µg/mL) e acima de 750 µg/mL, inativos; sendo ativos todos com CL₅₀ menor que 50 µg/mL e moderadamente ativos, os que possuem CL₅₀ entre 50 e 100 µg/mL. Dentro desta classificação, podemos considerar o óleo essencial de *Baccharis trimera*, moderadamente ativo. Entretanto não há nenhuma consideração a esse respeito pela Organização Mundial de Saúde.

Sesquiterpenos e monoterpenos tiveram destaque em óleos essenciais de duas plantas da família Boraginaceae, *Cordia curassavica* e *Cordia leucomalloides*, que se apresentaram ativos contra larvas de *A. aegypti*. A espécie *C. curassavica* apresentou atividade larvicida com CL₅₀ de 97,7 µg/mL relacionada aos monoterpenos majoritários α -pineno (20,5%) e β -pineno (13,1%) que, no presente trabalho, apresentaram teor de 0,39 e 2,85%, respectivamente. O sesquiterpeno E- cariophylleno foi o quarto composto em maior teor no óleo de *C. curassavica* (12,4%), terpenóide também encontrado no óleo de *B. trimera*. Em relação ao óleo essencial da espécie *C. leucomalloides* da família Boraginaceae, espécie que apresentou melhor atividade com CL₅₀ de 63,1 µg/mL, teve como componentes majoritários os sesquiterpenos α – cadineno (17,4%), E- cariophylleno (15,7%) bicyclogermacrene (12,5%) (SANTOS et al., 2006).

Gomes et al. (2016) demonstrou que o óleo essencial de *Zingiber officinale* foi ativo contra larvas de *A. aegypti* do terceiro estágio, apresentando CL₅₀ 76,07 µg/mL e teve como composto majoritário um sesquiterpeno (α -zingibereno), classe de terpenos também detectada nos componentes majoritários deste trabalho.

Mar et al. (2018) demonstrou que, após 24 horas, o óleo essencial de *Lippia origanoides* apresentou atividade larvicida frente *A. aegypti* com DL₅₀ equivalente a 187,3 µg/mL, valor superior ao encontrado no presente trabalho. Quanto à composição do óleo de *Lippia origanoides*, compostos identificados em maior quantidade pertenciam à classe dos monoterpenos oxigenados, totalizando aproximadamente 61,45% seguidos dos monoterpenos hidrocarbonetos, 16,29% e, sesquiterpenos hidrocarbonetos (8,76%) e oxigenados (0,73%); diferentemente dos dados deste estudo, o qual apresentou maior percentual de sesquiterpenos hidrocarbonetos e melhor atividade larvicida.

O óleo essencial de *B. trimera* analisado neste trabalho se apresenta como efetivo ou moderadamente ativo na atividade larvicida contra *A. aegypti*. Tem como componentes majoritários sesquiterpenos e contém alto teor destes, o que pode sugerir que a atividade biológica do composto esteja relacionada à lipoficidade dos compostos encontrados neste óleo. A presença da dupla ligação exocíclica, presente no espatulenol, no óxido de cariofileno e no E- caripfileno, por exemplo, já foi apontada como importante fator para garantir a lipofilicidade, uma vez que diminui o número de hidrogenações, e assim facilita a penetração da substância através da cutícula da larva (LOMONACO et al., 2009).

Pode-se perceber também que quanto maior o estágio larval, maior foi a CL₅₀; este fato também foi evidenciado por Kamatchi et al. (2016) com extrato aquoso de *Lantana camara* e extrato aquoso de *Catharanthus roseus* e por Waliwitiya et al. (2008) com compostos do óleo essencial de *Rosemarinus officinalis*, pôde chegar a mesma conclusão. Assim, o estágio larval ou grau de desenvolvimento, pode comprometer a atividade de um composto ou de uma mistura, o que pode estar associado à maior capacidade de desintoxicação das larvas em maior estágio de desenvolvimento, bem como a alteração na espessura da cutícula (DIAS et al., 2014).

Em relação às modificações morfológicas, Fujiwara et al. (2017) mostraram alterações como saída do material da matriz peritrófica, também observado no presente estudo, assim como o escurecimento do abdômen. A saída da matriz peritrófica também pôde ser observado por Valotto et al. (2010), e esse efeito pode ser associado à necessidade de expulsar a substância tóxica de seu interior.

Os efeitos letárgicos causados pelos óleos essenciais podem estar relacionados à ação deste no sistema nervoso, o que a deixa impossibilitada de mover-se normalmente, do mesmo modo o excesso de contrações musculares pode causar o alongamento ou o encurtamento do corpo (ACIOLE, 2009).

A perda de pilosidade lateral, o escurecimento do corpo de algumas larvas também foi observada no trabalho de Abinaya (2018) com atividade larvicida de nanopartícula. Estudos apontam que as principais alterações relacionadas à toxicidade em larvas de mosquito ocorrem no intestino médio e nos músculos (VIJAYAKUMAR et al., 2015).

Esmeraldo (2016) também constatou a perda de cerdas, diminuição da espessura no citoesqueleto para um de seus bioprodutos, destruição corporal interna para larvas expostas a três tipos de bioprodutos diferentes, e o inchado ou entumescimento do tórax também foi observado. De modo geral, os dados de ação tóxica observada morfolologicamente frente as larvas de *A. aegypti*, convergem com as alterações observadas no presente estudo.

Não foram encontrados estudos que relatem da toxicidade do óleo essencial de *B. trimera* frente *A. salina*. De acordo com Dolabella (1997), os produtos testados são classificados com base nos níveis de CL_{50} frente *A. salina*. Assim, os extratos vegetais ou óleos essenciais com $CL_{50} < 80 \mu\text{g/mL}$ são considerados altamente tóxicos, os que apresentam CL_{50} entre $80 \mu\text{g/mL}$ e $250 \mu\text{g/mL}$ são moderadamente tóxicos e os óleos com $CL_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$ possuem baixa toxicidade ou são atóxicos.

Outros estudos realizados com objetivo de determinar a toxicidade de extrato mostraram que *B. trimera* apresentou ação abortiva comprovada (GUPTA, 1995; ALONSO, 1998); redução do ciclo mitótico em meristemas radiculares de *Allium cepa* e surgimentos de anormalidades cromossômicas em altas concentrações (SOUZA; ROCHA, 2005). Também não foi relatado na literatura teste de toxicidade frente *Danio rerio* para óleo essencial desta espécie. Ribeiro (2016), em estudo de toxicidade de óleos essenciais de plantas da Amazônia, relatou seus óleos em estudo sendo tóxicos frente zebra-fish em relação a seus organismos-alvos, tendo o seu óleo menos tóxico, apresentado CL_{50} de 6,78 e o mais tóxico, CL_{50} 5,2 $\mu\text{g/mL}$. O óleo essencial deste estudo também pode ser considerado tóxico frente *Danio rerio*, uma vez que a CL_{50} para o peixe foi inferior à CL_{50} para larvas de *Aedes aegypti*. Entretanto, a CL_{50} para o zebra-fish foi 12,68 $\mu\text{g/mL}$.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo relatou a atividade larvícida do óleo essencial de *B.trimera*, que se mostrou ativo do primeiro ao quarto estágio larval, demonstrando que quando maior é o estágio larval, maiores são as concentrações necessárias para a letalidade das larvas.

Em comparação com as atividades relatadas em outros trabalhos, verifica-se que a atividade relatada no óleo estudado, provavelmente está relacionada à estrutura dos compostos encontrados na maior fração do óleo essencial (sesquiterpenos hidrocarbonetos), necessitando ainda de testes com compostos isolados, para melhor elucidação.

Além disso, foi possível avaliar a composição química e obter os constituintes em cerca de 90%. No estudo da literatura, observaram-se as diferenças tanto relacionadas à composição quanto às concentrações dos constituintes nos óleos da mesma espécie botânica, enfatizando a variabilidade que ocorre nos óleos essenciais; essa variabilidade permite também que em uma mesma espécie de diferentes cultivos sejam detectados diferentes compostos em diferentes concentrações, o que instiga à constante pesquisa e não limita o estudo do óleo de uma espécie vegetal uma única vez para o mesmo objetivo.

Constatou-se também que as alterações morfológicas encontradas no atual trabalho já foram evidenciadas em outros estudos de atividade biológica de diferentes produtos, o que leva a inferir que os mecanismos de ação envolvidos são similares. Os dados apresentados são relevantes na elucidação das possíveis vias de mecanismos de ação e, consequentemente na possível formulação de novos produtos larvicidas.

O OE de *B. trimera* se mostrou atóxico frente microcrustáceo *A. salina*. Entretanto, o teste de toxicidade com vertebrado *Danio rerio* mostrou que o OE foi tóxico se compararmos a CL₅₀ do óleo para peixe e para as larvas de *A. aegypti*. Este fato não inviabiliza a pesquisa e busca de produtos com origem nos resultados apresentados no presente trabalho, apenas sugere atenção ao descarte de possíveis produtos oriundos deste óleo essencial ou de seus compostos isolados ou, ainda, de produtos sintetizados com base nas moléculas aqui identificadas.

REFERÊNCIAS

- ABAD M J, BERMEJO P, Baccharis (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 7: 76 – 96; 2007.
- ABINAYA M, VASEEHARANA B, DIVYAA M, SHARMILIB A, GOVINDARAJANC M, ALHARBID N S, KADAIKUNNAND S, KHALEDD JM. Bacterial exopolysaccharide (EPS)-coated ZnO nanoparticles showed high antibiofilm activity and larvicidal toxicity against malaria and Zika virus vectors. *Journal of Trace Elements in Medicine Biology*, 45:93-103; 2018.
- ABNT NBR 15088. Ecotoxicologia Aquatica – Toxicidade Aguda – Método De Ensaio Com Peixes (*Cyprinidae*) 2016.
- ABNT NBR 16530. Ecotoxicologia Aquatica – Toxicidade Aguda – Método De Ensaio Com *Artemia SP* (Crustácea Brachiopoda) 2016.
- ACIOLE SDG. 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, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Lisboa, 56;2005.
- AESCHBACH R, LÖLIGER J, SCOTT BC, MURCIA A, BUTLER J, HALLIWELL B, ARUOMA OI. Antioxidant action of thymol, carvacrol, 6- gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 32: 31-36; 1994.
- ALENCAR CHM. Infestação pelo *Aedes albopictus* (Skuse), em criadouros naturais e artificiais encontrados em áreas verdes na cidade de Fortaleza-Ceará. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública / Saúde Coletiva do Departamento de Saúde Comunitária da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza 2008.
- ALMA MH, MAVI A, YILDIRIM A, DIGRAK M, HIRATA T. Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 26(12):1725-9; 2003.
- ALMEIDA-CORTEZ JS, SHIPLEY B, ARNASON JT. Do plant species with high relative growth rates have poorer chemical defences? *Functional Ecology*, 13: 819- 827; 1999.
- ALONSO JR. Tratado de Fitomedicina - bases clínicas y farmacológicas. ISIS Ediciones S. R. L., Buenos Aires, Argentina, 1998.
- ALONSO J, DESMARCHELIER C. Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud. Buenos Aires Lola, 2006.
- ARIZA ESPINAR L. Las especies de *Baccharis* (Compositae) de Argentina Central. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias en Córdoba*, 50: 176-305; 1973.
- AVANCINI CAM, WIEST JM, MUNDSTOCK E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 52(3): 230-234; 2000.
- BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D, IDAOMAR M. Biological effects of essential

oils-a review. Food and Chemical Toxicology, 46(2): 446–475; 2008.

BARROSO GM. Compositae – Subtribo Baccharidinae Hoffmann – Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. Rodriguésia, 28(40): 3-273; 1976.

BECKHAM JD, TYLER KL. Arbovirus Infections. Continuum (Minneapolis, Minn), 21(6 Neuroinfectious Disease):1599-611; 2015.

BESERRA EB, CASTRO JFP, SANTOS JW, SANTOS TS, FERNANDES CRM. Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. Neotropical Entomology, 35(3): 853-860; 2006.

BETTS TJ. Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. Journal of Chromatography A, 936: 33–46; 2001.

BHATT S, GETHING PW, BRADY OJ, MESSINA JP, FARLOW AW, MOYES CL, DRAKE JM, BROWNSTEIN JS, HOEN AG, SANKOH O, MYERS MF, GEORGE DB, JAENISCH T, WINT GR, SIMMONS CP, SCOTT TW, FARRAR JJ, HAY SI. The global distribution and burden of dengue. Nature, 496(7446): 504-7; 2013.

BIESKI IGC. Plantas medicinais e aromáticas no sistema único de saúde da região sul de Cuiabá-MT. 92 f. Trabalho de conclusão de Curso (Especialização). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

BLACK WC, BENNETT KE, GORROCHÓTEGUI-ESCALANTE N, BARILLAS-MURY CV, FERNÁNDEZ-SALAS I, LOURDES MM, FARFÁN-ALÉ JA, OLSON KE, BEATY BJ. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. Archives of medical research, 33(4): 379-88; 2002.

BORELLA JC, DONATA PD, NOVARETTI AAG, MENEZES JUNIOR A, FRANÇA SC, RUFALO CB, SANTOS PAS, VENEZIANI RCS, LOPES NP. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. Revista Brasileira de Farmacognosia, 16(4): 557-61; 2006.

BOUQUILLARD E, FIANU A, BANGIL M, CHARLETTE N, RIBÉRA A, MICHAULT A, FAVIER F, SIMON F, FLIPO R. Rheumatic manifestations associated with Chikungunya virus infection: A study of 307 patients with 32-month follow-up (RHUMATOCHIK study). Joint Bone Spine, 85(2): 207-210; 2018.

BRADY OJ, GETHING PW, BHATT S, MESSINA J P, BROWNSTEIN JS, HOEN AG, MOYES CL, FARLOW AW, SCOTT TW, SIMON, I. HAY Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. Reithinger R, ed. PLoS Neglected Tropical Diseases, 6(8):1760; 2012.

BRAGA IA. Valle, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiologia e Serviços de Saúde, 5(2):391-404; 2007.

BRASIL. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica 10, 2018. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, 48(27); 2018.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira 5ª ed., volume 1, 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2: 546; 2010.

BRASIL. Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela 2004 Disponível em: bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_epid_febre_amarela.pdf.

BRASIL. Ministério da Saúde. Orientações para o uso do pyriproxifen. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/15/Instrucoes-para-uso-de-pyriproxifen-maio-2014.pdf>. 2014

BRASIL. Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolo de atenção à saúde e resposta à ocorrência de microcefalia. Ministério da Saúde, Brasília, 6-45; 2016.

BRASIL. SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA. Febre amarela - informativo para profissionais de saúde 2017 Disponível em: https://www.infectologia.or.br/admin/zcloud/125/2017/02/FA_-_Profissionais_13fev.pdf

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopéia Brasileira.. Brasília-DF. 2:744; 2010.

BRAZ FILHO R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. Química Nova, 33(1); 2010.

BRIGHENTE IMC, PIZZOLATTI MG. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudo tenuifolia* – Bioatividade sobre *Artemia salina*. Química Nova, 26(3): 309-11; 2003.

BRUNETON J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991.

BUDEL JM, DUARTE, MR. Análise morfoanatômica comparativa de duas espécies de carqueja: *Baccharis microcephala* DC. e *B. trimera* (Less.) DC., Asteraceae. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 45(1): 75- 85; 2009.

BURT FJ, ROLPH MS, RULLI NE, MAHALINGAM S, HEISE MT. Chikungunya: a re-emerging virus. Lancet, 379 (9816): 662-71; 2012.

CAMPOS ACT, RADUNZ LL, RADÜNZ AL, MOSSI AJ, DIONELLO RG, ECKER SL. Atividade repelente e inseticida do óleo essencial de carqueja doce sobre o caruncho do feijão. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 18(8):861–86; 2014.

CANNON JB, CANTRELL L, ASTATKIE T, ZHELJAZKOV VD. Modification of yield and composition of essential oils by distillation time. Industrial Crops and Products, 41: 214-220; 2013.

CAO-LORMEAU VM, BLAKE A, MONS S, LASTÈRE S, ROCHE C, VANHOMWEGEN J, DUB T, BAUDOUIN L, TEISSIER A, LARRE P, VIAL AL, DECAM C, CHOUMET V, HALSTEAD SK, WILLISON HJ, MUSSET L, MANUGUERRA JC, DESPRES P, FOURNIER E, MALLET HP, MUSSO D, FONTANET A, NEIL J, GHAWCHÉ F. Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. Lancet, 387(10027): 1531–1539, 2016.

CARVALHO CA, MATTA SLP, MELO FCSA, ANDRADE DCF, CARVALHO LM, NASCIMENTO PC, SILVA MB, ROSA MB. Cipó-cravo (*tynnanthus fasciculatus* miers – bignoniaceae): estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *artemia salina*. Revista

Eletrônica de Farmácia, 1:51-57; 2009.

CASTRO, N. E. A. DE. Caracterização Fitoquímica de Óleo essencial de eucalipto e seu efeito sobre protozoário tripanosomatídeo *Herpetomonas samuelpessoai*. Tese apresentada à universidade federal de lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em agronomia, area de concentração fitotecnia, para obtenção do título de doutor. Lavras, UFLA 2006.

CHENG SS, CHANG HT, CHANG ST, TSAI KH, CHEN WJ. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technology*, 89:99–102; 2003.

CHINOU IB, ROUSSIS V, PERDETZOGLU D, LOUKIS A. Chemical and biological studies on two elichrysum species of Greek origin. *Planta Medica*, 62(4): 377-379; 1996.

CHUA KB, CHUA IL, CHUA IE, CHUA KH. Differential preferences of oviposition by *Aedes* mosquitoes in man-made containers under field conditions. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 35: 599-607; 2004.

CONSOLI RAGB, OLIVEIRA RL. Principais mosquitos de importânciasanitária no Brasil. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 228; 1994.

COSMO L. Nature, growth-stage stilt *Aedes aegypti*. Ideal for informational and institutional related sanitation and care. Disponível em: https://br.123rf.com/photo_52127997_nature-growth-stage-stilt-aedes-aegypti-ideal-for-informational-and-institutional-related-sanitation.html?fromid=NjZwVFlyd2dKNFA2R2wwYkxsM2d4UT09. Acesso em: 16/02/2018.

COUTINHO DF. Revisão de terpenóides de Lauraceae e estudo farmacobotânico e de óleos essenciais de espécies do gênero *Ocotea* Aubl. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006. DI STASI, L.C. (Org.). Plantas medicinais: arte e ciência, um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Fundação Editora Unesp, 169-89; 1996.

DIAS CN, MORAES DFC. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. *Parasitology Research*, 113(2):565-92; 2014.

DIAS LFT, MELO ES, HERNADES LS, BACCHI EM. Atividades antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less.) DC. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(1); 2009.

DICK OB, MARTÍN JLS, MONTOYA RH, DIEGO JD, ZAMBRANO B, DAYAN GH. The history of dengue outbreaks in the Americas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87 (4): 584–593; 2012.

DOLABELLA M. Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti-Tripanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 128; 1997.

DREZETT J, GOLLOP TR. O vírus Zika: uma nova e grave ameaça para a saúde reprodutiva das mulheres. *Reprodução & Climatério. Reprodclim*, 31(1):1–4; 2016.

DZIECIOLOWSKA S, LARROQUE AL, KRANJEC EA, DRAPEAU P, SAMARUT E. The larvicide pyriproxyfen blamed during the Zika virus outbreak does not cause microcephaly in zebrafish embryos. *Scientific Reports*, 7: 40067; 2017.

ELDEFRAWME, SHERBY SM, ABALIS IM. Interactions of pyrethroid and cyclodiene insecticides with nicotinic acetylcholine and GABA receptors. *Neurotoxicology*, Amsterdam, 6(2): 47- 62; 1986.

ESMERALDO MA. Bioprodutos derivados de biomassa vegetal no combate ao mosquito transmissor da dengue - *Aedes aegypti*. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENOBIO) da Universidade Federal do Ceará Área de concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais, 2016.

FARMACOPEIA BRASILEIRA IV-PARTE 1. 4a Ed. São Paulo: Atheneu, 1320, 1996.

FERGUSON BNM, RODRÍGUEZ-BARRAQUER I, DORIGATTI I, MIER-Y-TERAN-ROMERO L, LAYDON DJ, CUMMINGS DAT. Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur dengue vaccine: Modeling optimal deployment. *Science* 02, 1033-1036; 2016.

FIELDING RR. *Baccharis*: a genus of the Asteraceae new to Canada. *Proceedings of the Nova Scotian Institute of Science*, 41: 214-215; 2001.

FORATTINI OP. *Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia*. São Paulo: EDUSP, 2; 2002.

FORATTINI O9P. *Entomologia médica*. São Paulo, Editora da USP 1962.

FUJIWARA GM, ANNIESB V, OLIVEIRA CFD, LARA RA, GABRIEL MM.; BETIMA FCM, NADALC JM, FARAGOC PV, DIASA JFG, MIGUELA OG, MIGUELA MD, MARQUESB FA, ZANINA SMW. Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methylcinnamate and methyl cinnamate/linalool in combination against *Aedes aegypti*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 139: 238–244; 2017.

FURTADO RF, LIMA MGA, NETO MAD, BEZERRA JNS, SILVA MGDV. Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*, 34(5): 843-847; 2005.

GAMBERINI MT. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis trimera* Mart. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86: 137-139; 1991.

GAZZANEO, LUCENA RFP, ALBUQUERQUE UP. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in an region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 1: 9; 2005.

GHOSH V, MUKHERJEE A, CHANDRASEKARAN N. Formulation and characterization of plat essential oil based nanoemulsion: evaluation of its larvicidal activity *Aedes aegypti*. *Asian Journal of Chemistry*, 25: 321-323; 2013.

GHRAMH HÁ, AL-GHAMDI KM, MAHYOUB JA, IBRAHIM EH. Chrysanthemum extract and extract prepared silver nanoparticles as biocides to control *Aedes aegypti* (L.), the vector of dengue fever. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21: 205–210; 2018.

GINJUPALLI GK, BALDWIN WS. The time- and age- dependent effects of the juvenile hormone analog pesticide, pyriproxyfen on *Daphnia magna* reproduction. *Chemosphere*, 92:1260-1266; 2012.

GOBBO-NETO L, LOPES NP. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. *Química Nova*, 30(2): 374-381; 2007.

GOMES PRB, SILVA ALS, PINHEIRO HA, CARVALHO LL, LIMA HS, SILVA EF, SILVA RP, LOUZEIRO CH, OLIVEIRA MB, FILHO VEM. Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial do *Zingiber officinale* Roscoe (gingibre) frente ao mosquito *Aedes aegypti*. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 18(2): 597-604; 2016.

GOVINDARAJAN M, RAJESWARY M, BENELLI G. Chemical composition, toxicity and non-target effects of *Pinus kesiyi* essential oil: An eco-friendly and novel larvicide against malaria, dengue and lymphatic filariasis mosquito vectors. Ecotoxicol Environmental Safety, 129:85-90; 2016.

GRANCE SEM, TEIXEIRA MA, LEITE RS, GUIMARÃES EB, SIQUEIRA JM, OLIVEIRA FWF, SOUZA VSB, CARMO VM. *Baccharis trimera*: effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. Journal of Ethnopharmacology, 117(1): 28-33; 2008.

GUBLER DJ. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. Tropical Medicine and Health, 39 (4): 3-11; 2011.

GUPTA MP. 270 Plantas medicinales Iberoamericanas. Editorial Presencia Ltda, Santafé de Bogotá, Colombia. 1ª edición 1995.

KAMATCHI PAC, MAHESWARAN R, IGNACIMUTHU S. Evaluation of Larval Toxicity of *Lantana camara* L. and *Catharanthus roseus* L. against *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* L. Entomology, Ornithology & Herpetology, 5 (1); 2016.

KEAN J, RAINEY SM, FARLANE MC, DONALD CL, SCHNETTLER E, KOHL A, PONDEVILLE E. Fighting Arbovirus Transmission: Natural and Engineered Control of Vector Competence in *Aedes* Mosquitoes. Insects, 6: 236-278; 2015.

KNOBLOCH K, WEIGAND H, WEIS N, SCHWARM M, VIGENSCHOW H. Action of terpenoids on energy metabolism. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da Planta ao medicamento. 2ª Edição. Editora da UFRGS 1999.

KOMALAMISRA N, TRONGTOKIT Y, RONGSRIYAM Y, APIWATHNASORN C. Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. Send to Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 36(6):1412-22; 2005.

KORBES CV. Manual de plantas medicinais. Grafit: Francisco Beltrão. 48ª ed. 1995.

KRAEMER MUG, SINKA ME, DUDA KA, MYLNE A, SHEARER FM, BRADY OJ, MESSINA JP, BARKER CM, MOORE CG, CARVALHO RG, COELHO GE, VAN BORTEL W, HENDRICKX G, SCHAFFNER F, WINT GRW, ELYAZAR IRF, TENG HJ, HAY SI. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* occurrence. Sci Data, 2:150035; 2015.

KRAEMER UM, SINKA ME, DUDA KA, MYLNE AQN, SHEARER FM, BARKER CM, MOORE CG, CARVALHO RG, COELHO GE, BORTEL WV, HENDRICKX G, SCHAFFNER F, ELYAZAR IRF, TENG H, BRADY OJ, MESSINA J, PIGOTT DM, SCOTT TW, SMITH DL, WINT WGR, GOLDING N, HAY SI. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Elife, Cambridge, 4:8347; 2015.

KRAUS JE, ARDUIN M. Manual básico de métodos de morfologia vegetal. Rio de Janeiro: EDUR 1997.

LADEIRA AM. Plantas medicinais com óleos essenciais. Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Estado do Meio Ambiente, Instituto de Botânica 2002.

LAWLER SP. Environmental safety review of methoprene and bacterially-derived pesticides commonly used for sustained mosquito control. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 139: 335-343; 2017.

LEBRUN G, CHADDA K, REBOUX AH, MARTINET O, GAÛZÈRE BA. Síndrome de Guillain-Barré após infecção por chikungunya. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 15(3):495-6; 2009.

LEROY A, POTTER E, WOO H, HERBER D, HIRSCH AM. Characterization and identification of alfalfa and red clover dietary supplements using PCR-based method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5063-5069; 2002.

LOMONACO D, SANTIAGO GMP, FERREIRA YS, ARRIAGA AMC, MAZZETTO SE, MELEC G, VASAPOLLO G. Study of technical CNSL and its main components as new green larvicides. *Green Chemistry*, 11(1): 31-3; 2009.

LORENZI H, MATOS FJA. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. 1. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, Nova Odessa, 512; 2002.

MAIA JGS, ZOGHBI MGB, ANDRADE EHA. Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 173; 2001.

MANOSROI J, DHUMTANOM P, MANOSROI A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Letters*, 235(1):114-20; 2006.

MAPLESTONE RA, STONE MJ, WILLIAMS DH. The evolutionary role of secondary metabolites—A review. *Gene*, 15:115; 1992.

MAR JM, SILVA LS, AZEVEDO SG, FRANÇA LP, VAI AFF, SANTOS AL, BEZERRA JDA, NUNOMURA RDCS, MACHADO MB, SANCHES EA. *Lippia origanoides* essential oil: An efficient alternative to control *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. *Industrial Crops and Products*, 111:292-297; 2018.

MARCOS E, LAZO L, IZQUIERDO A, SUZARTE E, VALDÉS I, BLANCO A, ANCIZAR J, ALBA JS, PÉREZ YC, COBAS K, ROMERO Y, GUILLÉN G, GUZMÁN MG, HERMIDA L. Dengue encephalitis-associated immunopathology in the mouse model: implications for vaccine developers and antigens inducer of cellular immune response. *Immunol Letters*, 176:51-6; 2016.

MARTINEZ MJ, Betancourt J, Alonso-González N, Jauregui A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 52:171-174; 1996.

MARTINS F, SILVA IG. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37: 135-138; 2004.

MARTINS VP, SILVEIRA DA, RAMALHO IL. *Aedes albopictus* no Brasil: aspectos ecológicos e riscos de transmissão da dengue. *Entomotropica*, 28(2): 75-86; 2013.

MARTINS-RAMOS D, BORTOLUZZI RLC, MANTOVANI A. Plantas medicinais de um

remascente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana, Urupema, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 12(3):380-397; 2010.

MASON PJ, HADDOW AJ. An Epidemic Of Virus Disease In Southern Province, Tanganyika Territory, In 1952-53 An Additional Note On Chikungunya Virus Isolations And Serum Antibodies. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene*, 51(3); 1957.

MASOTTI V, JUTEAU F, BESSIEARE JM, VIANO J. Seasonal and Phenological Variations of the Essential Oil from the Narrow Endemic Species *Artemisia molinieri* and Its Biological Activities. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 51(24):7115-21; 2003.

MEYER BN, FERRIGNI NR, PUTNAN JE, JACOBSEN LB, NICHOLS DML, AUGHLIN J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medical Plant Research*, 45(1): 31-34; 1982.

MIDIO AF, SILVA ES. Inseticidas: acaricidas organofosforados e carbamatos. São Paulo: Roca 1995.

MORAES GH, DE FÁTIMA DUARTE E, DUARTE EC. Determinants of mortality from severe dengue in Brazil: a population-based case-control study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(4): 670-676; 2013.

MORAIS LAS, CASTANHA RF. Composição química do óleo essencial de duas amostras de carqueja (*Baccharis* sp.) coletadas em Paty do Alferes – Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. Botucatu, 13: 628-632; 2011.

MOREIRA FPM, COUTINHO V, MONTANHER ABP, CARO MSB, BRIGHENTE IMC, PIZZOLATTI MG. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioatividade sobre *Artemia salina*. *Química Nova*, 26(3): 309-11; 2003.

MOTHES K. Historical introduction. 1980. In: SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5ª edição. Editora da UFSC 2016

MURRAY NE, QUAM MB, WILDER-SMITH A. Epidemiology of dengue: past, present and future perspectives. *Clinical Epidemiology*, 5: 299-309; 2013.

MUSTAFA MS, RASOTGI V, JAIN S, GUPTA V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India*, 71(1):67-70; 2015.

NAKASUGI T, KOMAI K. Antimutagens in the Brazilian folk medicinal carqueja (*Baccharis trimera* Less). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 2560- 3564; 1998.

NDUMU PA, GEORGE JBD, CHOUDHURY MK. Toxicity of neem seed oil (*Azadiracta indica*) against the larvae of *Amblyomma variegatum* a three-host tick in cattle. *Phytotherapy Research: PTR*, 13(6):532-4; 1999.

OLIVEIRA LB, MARIA R, NUNES P, SANTANA M, ROSA A, MARIANA N, NUNES F, BANTIM I, CALOU F, PERON AP, MARIA M, MARQUES M, MICHEL P, FERREIRA P. Perfil do uso populacional de inseticidas domésticos no combate a mosquitos Profile of the population use of household insecticides against mosquitoes. *Seminários de Ciências*

Biológicas e da Saúde, 36:79–92; 2015.

OLIVEIRA F, AKISUE G, AKISUE MK. Farmacognosia. São Paulo: Atheneu, 426: 1998.

OLIVEIRA MJ, CAMPOS IFP, OLIVEIRA CBA, SANTOS MR, SOUZA OS, SANTOS S C, SERAPHIN JC, FERRI PH. Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. Biochemical Systematics and Ecology, 33: 275-285; 2005.

OUSSALAH, M, CAILLET S, SAUCIER L. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control, 18(5):414-420; 2007.

PALÁCIO CPAM, BIASI LA, NAKASHIMA T, SERRAT BM. Biomassa e óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* (Less) DC.) sob influência de fontes e doses de nitrogênio. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. Botucatu, 9(3):58-63; 2007.

PASTORI T, KUHN AW, TEDESCO M, HOFFMANN CE, NEVES LAS, CANTO-DOROW TS, TEDESCO SB. Ação genotóxica e antiproliferativa de *Polygonum punctatum* Elliott (Polygonaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 17(2): 186-194; 2015.

PAVARINI DP, PAVARINI SP, NIEHUES M, LOPES NP. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. Animal Feed Science and Technology, 176 (1-4): 5-16; 2012.

PICHERSKY E, NOEL JP, DUDAREVA N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. Science, 10;311(5762):808-11; 2006.

PINHO DS, STURBELLE RT, MARTINO-ROTH MG; GARCÍAS GL. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 20(2): 165-170; 2010.

PINTO AC, SILVA DHS, BOLZANI VS, LOPES NP, EPIFANIO RA. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. Química Nova, 25: 45-61; 2002.

BESERRA EB, CASTRO JR FPD, SANTOS JWD, SANTOS TDS, FERNANDES CRM. Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. Neotropical Entomology, 35(3): 853-860; 2006.

RIBEIRO ECG. Atividade moluscicida de óleos essenciais de plantas aromáticas da região amazônica maranhense. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão. São Luís. 2016.

DZIECIOLOWSKA S, LARROQUE AL, KRANJEC EA, DRAPEAU P, SAMARUT, E. The larvicide pyriproxyfen blamed during the Zika virus outbreak does not cause microcephaly in zebrafish embryos. Scientific Reports, 7, 40067; 2017.

CHINOU IB, ROUSSIS V, PERDETZOGLU D, LOUKIS A. Chemical and biological studies on two *Helichrysum* species of Greek origin. Planta Medica, 62(4): 377-379; 1996.

KAMATCHI PAC, MAHESWARAN R, IGNACIMUTHU S. Toxicity of *Lantana camara* L. and *Catharanthus roseus* L. against *Culex quinquefasciatus* say and *Aedes aegypti* L. Entomology, Ornithology & Herpetology, 5 (1); 2016.

ROSE, R.I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerging Infectious Diseases*, 7(1): 17–23; 2001.

RUIZ ALTG, TAFFARELLO D, SOUZA VHS, CARVALHO JE. Farmacologia e Toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. *Revista Brasileira farmacognosia* 18(2): 295-300; 2008.

RYAN MF, BYRNE O. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *Journal of Chemical Ecology*, 14:1965–1975; 1988.

SÁ IM, SAAD GA. *Fitoterapia Contemporânea - Tradição e Ciência na Prática Clínica - 2ª Ed* Guanabara Koogan 2016.

SANTOS RP, NUNES EP, NASCIMENTO RF, SANTIAGO GMP, MENEZES GHA, SILVEIRA ER, PESSOA ODL. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17(5): 1027-1030; 2006.

SANTOS RF, ISOBE MTC, LALLA JG, HABER LL, MARQUES MOM, MING LC. Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14; 224-234; 2012.

SCHMOURLO G, MENDONÇA-FILHO RR, ALVIANO CS, COSTA SS. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(3): 563-568; 2005.

SILVA FG, OLIVEIRA CBA, PINTO JEBP, NASCIMENTO VE, SANTOS SV, SEAPHINO JC, FERRI PH. Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18 (5): 990- 997; 2007.

SILVA FG, PINTO JEP, CARDOSO MG, NASCIMENTO EA, NELSON DL, SALES JF, MOL DJS. Influence of radiation level on plant growth yield quality of essential oil carqueja. *Ciencias e agrotecnologia*, 30(1); 2006.

SILVA HGG, SILVA IG. Estudo do ciclo evolutivo de *Aedes aegypti* a partir de ovos com quatro meses de estocagem em laboratório. *Revista de Patologia Tropical*, 29(1):95-100; 2000.

SILVA HHG, SILVA IG. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32(4):349-355; 1999.

SILVA RMG DA, OLIVEIRA VMD, VALADARES F, MECINA GF, SILVA LP. Genotoxic activity and toxicity of *Baccharis trimera* Less. regarding the bioaccumulation of heavy metals. *Journal of Medicinal Plant Research*, 6(26): 4321- 4327; 2012.

SILVA-SANTOS A, ANTUNES AMS, BIZZO HR, D'AVILA LA. A participação da indústria óleo-citricola na balança commercial brasileira. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 8(4): 8-13; 2006.

SIMAS NK, LIMA EC, CONCEIÇÃO SR, KUSTER RM, OLIVEIRA AMF. 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;

2004.

SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5ª edição. Editora da UFSC, 2016

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da Planta ao medicamento. 2ª Edição. Editora da UFRGS 1999.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. Farmacognosia. Porto Alegre: UFRGS, 2000.

SIQUEIRA, NC. S.; SILVA, G. A.A.B.; ALICE, C.B.; NITSCHKE, M. Análise comparativa dos óleos essenciais de *Baccharis articulata* e *Baccharis trimera* espécies espontâneas no rio Grande do Sul. Revista Brasileira de Farmácia, 66 (3): 36-39; 1985.

SOUSA MP, MATOS FJA, MATOS MEO, MACHADO MIL, CRAVEIRO AA. Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras. Fortaleza: Editora UFC 2004.

SOUZA SAM, ROCHA BHG. Biotestes na avaliação da fitotoxicidade de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas 2005.

SOUZA SP, CARDOSO MG, SOUZA PE, GUIMARÃES LGL, ANDRADE J, MALLET ACT, NELSON DL. Óleo essencial de *Baccharis tridentata* Vahl: composição química, atividade antioxidante e fungitóxica, e caracterização morfológica das estruturas secretoras por microscopia eletrônica de varredura. Revista brasileira de plantas medicinais, 13(4): 456-466; 2011.

SUGUMAR SKS, CLARKE MJ, NIRMALA BK, TYAGI AM, CHANDRASEKARAN N. Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. Bulletin of Entomological Research, 104(3):393–402; 2014.

SULLIVAN JJ, GOH KS. Environmental fate and properties of pyriproxyfen. Journal of Pesticide Science, 33(4): 339-350; 2008.

SUZUKI EY, CANESCHI CA, COSTA FR, FERNANDES BMA, BARBOSA RNR. Antimicrobial activity of essential oil from *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja- amarga). Revista Cubana de Plantas Medicinales, 21(3); 2016.

TANG HQ, HU J, YANG L, TAN RX. Terpenoids and flavonoids from *Artemisia* species. Planta Medica, 66: 391-393; 2000.

TAUIL PL. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 39(3): 275-277; 2006.

VALOTTO CFB, CAVASIN G, SILVA HHG, GERIS R, SILVA IG. Alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (linnaeus, 1762) (Diptera ,Culi cidae) causadas pelo tanino catéquico isolado da planta do cerrado *Magonia pubescens* (Sapindaceae). Revista de Patologia Tropical, 39 (4): 309-321; 2010.

VAREJÃO JBM, SANTOS CB, REZENDE HR, BEVILACQUA LC, FALQUETO A. Criadouros de *Aedes* (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) em bromélias nativas na Cidade

de Vitória, ES. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 38(3): 238-240, 2005.

VASCONCELOS PFC, LIMA JWO, RAPOSO ML, RODRIGUES SG, DA ROSA JST, AMORIM SMC. Inquérito soro-epidemiológico na Ilha de São Luís durante epidemia de dengue no Maranhão. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 32(2): 171-179; 1999.

VERDI LG, BRIGHENTE IMC, PIZZOLATI MG. Gênero *Baccharis*(Asteraceae): Aspectosquímicos, econômicos e biológicos. Química Nova, 28(1); 2005.

VIANA DV, IGNOTTI E. A ocorrência da dengue e variações meteorológicas no Brasil: revisãosistemática. Revista brasileira de epidemiologia São Paulo, 16(2): 240-256; 2013.

VIDAL VN, VIDAL MRR. Botânica - Organografia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 1995.

VIJAYAKUMAR S, VINOJ G, MALAIKOZHUNDAN B, SHANTHI S, VASEEHARAN B. *Plectranthus amboinicus* leaf extract mediated synthesis of zinc oxide nanoparticles and its control of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* biofilm and blood sucking mosquito larvae. Spectrochim Acta Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 137: 886-891; 2015.

VU DM, JUNGKIND D, LABEAUD AD. Chikungunya Virus. Clinics in Laboratory Medicine, 37(2):371-382; 2017.

WALIWITIYA R, KENNEDY CJ, LOWENBERGER CA. Larvicidal and oviposition-altering activity of monoterpenoids, transanethole and rosemary oil to the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Pest Management Science, 65(3):241-8; 2009.

WHO. World Health Organization. TDR Global Alert e Repsonse Dengue / Dengue Haemorrhagic Fever. Genebra: Organização Mundial da Saúde (OMS); 2013. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/index.html>

WHO. World Health Organization. Global Guidelines for Prevention and Control of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. Second Edition. Regional Office of the World Health Organization for Southeast Asia 2011.

WHO. World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: World Health Organization 2009.

WHO. World Health Organization. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. 2. ed. Geneva: World Health Organization, 147; 2009.

WHO. World Health Organization. Global Strategy for the Prevention and Control of Dengue. World Health Organization , Geneva , Switzerland 2012.

WHO. World Health Organization. Dept. of Communicable Disease Prevention, Control and Eradication & WHO Pesticide Evaluation Scheme. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Geneva : World Health Organization. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005/3, 41, 2005.

WHO. World Health Organization. Guidelines for Drinking-Water Quality, 3rd edition, including first and second addenda 2008.

WHO. World Health Organization. Pyriproxyfen in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers 2007.

WHO. World Health Organization. Immunization, Vaccines and Biologicals. DENGUE 2016 Disponível em: <http://www.who.int/immunization/diseases/dengue/en/>.

WOODRING JL, HIGGS S, BEATY BJ. Natural cycles of vector borne pathogens. In: Marquardt WC, Beaty BJ, editors. Biology of disease vectors, 51-72; 1996.

ZANLUCA C, MELO VCA, MOSIMANN ALP, SANTOS GIV, SANTOS CND, LUZ K. The first report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. Memorando do Instituto Oswaldo Cruz, 110(4):569-72; 2015.

ZHENG GQ, KENNEY PM, LAM LKT. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. Journal of Natural Products Cincinnati, 55(7): 999-1003, 1992.

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA
CIAEP:01.0341.2014

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Controle de doenças negligenciadas: estudo químico e atividade moluscicida e larvacida frente *Aedes aegypti* de espécies vegetais do Maranhão” registrada com o nº 23115.009327/2017-10, sob a responsabilidade de **Denise Fernandes Coutinho**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão.

FINALIDADE	() ENSINO (X) PESQUISA () EXTENSÃO
Vigência da autorização	20/03/2018 à 20/10/2019
Espécie/linhagem/raça	Peixe <i>Danio rerio</i> ou <i>Poecilia reticulata</i>
Nº de animais	180
Peso/Idade	0,70-0,3g/Peixe <i>Danio rerio</i> : 4 meses/ <i>Poecilia reticulata</i> : 30 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	ACQUA RIO IMP E EXP DE PEIXES LTDA-ME; CNPJ: 10.863.168/001-84

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho
 Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais - CEUA
 UFMA