



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

**Avaliação do perfil químico e da atividade larvicida do óleo
essencial do *Croton linearifolius* sobre o *Aedes aegypti***

Renata Correia Assunção Spósito

Itapetinga-BA

2013

**Avaliação do perfil químico e da atividade larvicida do óleo
essencial do *Croton linearifolius* sobre o *Aedes aegypti***

Renata Correia Assunção Spósito

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Prof^a Dr^a Simone Andrade Gualberto.

Co-orientadora: Profa. Dra. Sandra Lúcia da Cunha e Silva

Itapetinga-BA

2013

*Dedico a todos que vivenciam a Ciência com responsabilidade social
e fazem da pesquisa um instrumento de transformação da sociedade,
em prol do bem-estar social, econômico e ambiental.*

AGRADECIMENTOS

- À Deus, pela proteção constante e por permitir que eu vivencie desafios e supere obstáculos, os quais certamente contribuirão para o progresso moral e intelectual;
- À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahai e ao Program de Pós Graduação em Ciências Ambientais pela oportunidade de realização deste curso.
- Às professoras orientadora, Simone Gualberto e Sandra Cunha, que possibilitaram as condições para o desenvolvimento deste trabalho, pelo respeito, apoio e, principalmente pela credibilidade em mim depositada.
- Aos colegas do curso de mestrado, pela convivência, incentivo, apoio e carinho;
- À equipe dos laboratórios de pesquisa (LAPIN e LAPRON) pelo auxílio constante.
- À prof. Rosilene Aparecida Oliveira da UESC e ao prof. Valdir Chechinel Filho da UNIVALI pela colaboração na pesquisa, a qual foi imprescindível para a conclusão do trabalho.
- Aos amigos que fiz em Itapetinga, pelo carinho e apoio.
- A Rômulo Spósito, pelo amor, companheirismo, confiança e por compreender os vários momentos que me fiz ausente.
- A minha mãe, Ana Maria Correia, modelo de dedicação e persistência, pelo amor incondicional e pela confiança em mim depositada;

- Ao meio Pai, Reinaldo Assunção, pelos ensinamentos de infância, que até hoje me serve de inspiração.
- Aos meus irmãos, Iara Correia e Reinaldo Júnior, pelo incentivo, apoio e confiança;
- À Roosevelt Spósito e Ednalva Spósito, pelo respeito, dedicação e confiança;
- Aos sobrinhos e afiliados, pela dedicação e amor e por tornar os momentos de tristeza e de dificuldades tão pequenos, diante da alegria que vocês proporcionam.
- A todos os familiares e amigos, pelo apoio e confiança e por ter sempre demonstrado a certeza de que os momentos de afastamento devido às várias atribuições assumidas seriam superados;
- E finalmente a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho.

*“A possibilidade de realizarmos um sonho
é que torna a vida interessante”*

Paulo Coelho

ASSUNÇÃO-SPÓSITO, R. Avaliação do perfil químico e da atividade larvicida do óleo essencial do *Croton linearifolius* sobre o *Aedes aegypti*. Itapetinga - BA: UESB, 2013. 58 p. (Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais – Área de Concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento)*

Resumo

Muitas espécies de *Croton* são produtoras de óleos essenciais cuja composição química é rica em monoterpenos e sesquiterpenos, e podem apresentar atividade larvicida. Neste contexto, o objetivo do estudo foi avaliar a composição química e a atividade larvicida do óleo essencial das folhas do *Croton linearifolius* contra o *A. aegypti*. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger. A avaliação dos teores dos constituintes químicos foi realizada por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chamas (CG/DIC) através da comparação dos índices de retenção com a substância padrão. A atividade larvicida foi testada sobre larvas em 3º instar do *A. aegypti*. O delineamento do bioensaio foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro repetições, sendo as concentrações do óleo testadas correspondentes a 66,67; 50,00; 33,33; 27,67 e 16,67 $\mu\text{g/mL}$. Foi possível identificar 23 constituintes químicos correspondendo a 49,75% %, com predominância de sesquiterpenos. Os componentes majoritários do óleo essencial do *C. linearifolius* foram o β -cariofileno (20,63%), β -copaen-4- α -ol (16,48%), óxido de cariofileno (12,64%) e δ -guaiene (10,95%). A taxa de mortalidade das larvas foi de 45 a 90%, entre as concentrações de 16.67 a 66.67 $\mu\text{g/mL}$, em 24h de observação. Os resultados obtidos para as concentrações letais em 24h foram $CL_{10}= 5, \mu\text{g/mL}$, $CL_{50}= 19,98 \mu\text{g/mL}$ e $CL_{90}= 77,30 \mu\text{g/mL}$. Os resultados indicaram a potencialidade do óleo essencial das folhas do *C. linearifolius* contra as larvas de *A. aegypti*, em condições laboratoriais.

Palavras-chave: β -cariofileno, composição química, Cromatografia, Inseticidas naturais, *Aedes aegypti*

*Orientador: Simone Andrade Gualberto. D. Sc. UESB e Co-orientador: Sandra Lúcia da Cunha e Silva. D. Sc. UESB.

ASSUNÇÃO-SPÓSITO, R. Evaluation of the chemical profile and larvicidal activity of the essential oil of *Croton linearifolius* against *Aedes. aegypti*. BA: UESB, 2013. 58 p. (Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais – Área de Concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento)*

Abstract

Many *Croton* species are producers of essential oils whose chemical composition is rich in mono- and sesquiterpenes and may have larvicidal activity. In this context, the objective of this study was to evaluate the chemical composition and larvicidal activity of the essential oil from leaves of *Croton linearifolius* against *A. aegypti*. The essential oil was obtained through hydrodistillation in Clevenger type apparatus. The chemical analysis of essential oil was analyzed by gas chromatography with flame ionization detection by comparison of the retention times with the standard substance. The larvicidal activity was tested against the 3rd larval instar of *A. aegypti*. The bioassay design was completely randomized with six treatments and four replications, being the oil's concentrations tested corresponding to 66.67, 50.00, 33.33, 27.67 and 16.67 $\mu\text{g/mL}$. There were identified 23 chemical constituents representing 49,75% with predominance of sesquiterpenes. β -caryophyllene (20,63%), β -copaen-4- α -ol (16,48%), caryophyllene oxide (12,64%) and δ -guaiene (10,95%), were identified as major compounds of *C. linearifolius* essential oil. The mortality rate of larvae was 45 to 90%, between concentrations 16.67 to 66.67 $\mu\text{g/mL}$ in 24h of observation. The results obtained for lethal concentrations in 24h were $\text{CL}_{10} = 5.17 \mu\text{g/mL}$, $\text{CL}_{50} = 19.98 \mu\text{g/mL}$ and $\text{CL}_{90} = 77.30 \mu\text{g/mL}$. The results indicated the potential of oils from leaves of *C. linearifolius* against larvae of *A. aegypti* in laboratory conditions.

Keywords: β -caryophyllene, chemical composition, Chromatography, Natural Insecticides, *Aedes aegypti*

*Orientador: Simone Andrade Gualberto. D. Sc. UESB e Co-orientador: Sandra Lúcia da Cunha e Silva. D. Sc. UESB

LISTA DE TABELA

- Tabela 1. Mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* em relação ao tempo de exposição às diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do óleo essencial das folhas de *Croton linearifolius*----- 44
- Tabela 2. Concentrações letais do óleo essencial das folhas de *Croton linearifolius* sobre larvas de *Aedes aegypti* em diferentes tempos de observação.----- 47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Inseticidas orgânicos de origem natural-----	14
Figura 2.	Estruturas do DDT (8), Deltametrina (9) e Malation (10)-----	16
Figura 3.	Relação dos metabólitos primários com a biossíntese dos metabólitos secundários-----	20
Figura 4.	Estrutura de uma unidade de isopreno-----	21
Figura 5.	Esquema da justaposição sucessiva de unidades isopropênicas para a formação dos terpenos-----	22
Figura 6.	Estrutura química do ácido giberélico-----	23
Figura 7.	Rota de biossíntese dos terpenos-----	24
Figura 8.	Foto da espécie <i>Croton linearifolius</i> encontrada na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA).-----	32
Figura 9.	Extrator de Clevenger modificado-----	33
Figura 10.	Larvas de <i>Aedes aegypti</i> em 3 ^o instar-----	35
Figura 11.	Observação da mortalidade das larvas de <i>A. aegypti</i> submetidas a diferentes concentrações do óleo essencial do <i>C. linearifolius</i> -----	36
Figura 12.	Cromatograma do óleo essencial das folhas do <i>Croton linearifolius</i> obtido por CG-FID -----	38
Figura 13.	Mortalidade das larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 4, 8 e 16h de exposição às diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do óleo essencial das folhas de <i>Croton linearifolius</i> -----	41
Figura 14.	Mortalidade das larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 24h de exposição às diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do óleo essencial das folhas de <i>Croton linearifolius</i> -----	43

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	11
2.REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1. Inseticidas Naturais: uma alternativa viável no controle de vetores de doenças.....	13
2.2. Metabólitos secundários	19
2.3. Óleos Essenciais.....	25
2.4. Formas de controle do mosquito <i>Aedes aegypti</i> : o vetor da dengue	277
2.5. Características gerais do gênero <i>Croton</i>	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. Localização e caracterização da área de estudo.....	32
3.2. Procedimentos metodológicos	33
3.2.1. Preparação do material botânico.....	33
3.2.2. Extração do óleo essencial	33
3.2.3. Composição química do óleo essencial.....	34
3.2.4. Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de <i>Croton linearifolius</i>	35
3.2.5. Análise estatística	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.2. Composição química do óleo essencial obtido das folhas do <i>Croton linearifolius</i>	38
4.2. Atividade larvicida do óleo essencial de <i>C. linearifolius</i>	40
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
6. REFERÊNCIAS.....	4747

1. INTRODUÇÃO

O estudo de plantas com atividade inseticida tem sido uma alternativa promissora para o controle de vetores transmissores de doenças. De acordo com Castro *et al.* (2005), os vegetais são capazes de produzir uma enorme variedade de metabólitos secundários, muitos dos quais possuem importantes atividades biológicas, apresentando-se como recursos potenciais para a produção de inseticidas e fitoterápicos.

Os óleos essenciais estão entre os produtos do metabolismo secundário dos vegetais que podem ter propriedades inseticidas. Geralmente, apresentam-se como misturas de substâncias químicas de natureza terpênica, incluindo seus derivados alcoólicos e aldeídicos (Simões *et al.*, 2007). Estes compostos atuam sobre diferentes tipos de organismos e seus estágios de vida.

Vários pesquisadores têm trabalhado com produtos naturais, visando obter substâncias inseticidas extraídas de plantas, com atuação no desenvolvimento embrionário, na fase larval, pupal e na emergência dos adultos do inseto (Pohlit *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2006). Além disso, os produtos naturais têm sido amplamente empregados como fitoterápicos e matéria-prima para a síntese de substâncias bioativas (López, 2006).

As espécies do gênero *Croton*, por exemplo, vêm se destacando por suas propriedades farmacológicas e, também, pelo seu potencial inseticida. Porto *et al.* (2008), ressaltam que as espécies deste gênero apresentam elevada atividade inseticida contra mosquitos, incluindo o *Aedes aegypti*. Entretanto, em relação à espécie investigada neste trabalho, o *Croton linearifolius*, há carência de informações quanto a sua composição química, propriedades farmacológicas e potencial inseticida.

Segundo Silva *et al.* (2010), o *Croton linearifolius* é reconhecido popularmente pelo seu efeito inseticida. Portanto, a investigação da ação inseticida desta espécie contribuirá para a confirmação das suas propriedades biológicas, além de possibilitar o desenvolvimento de novos produtos alternativos e menos agressivos à saúde humana e ao meio ambiente, com maior eficiência e segurança no combate ao *Aedes aegypti*.

Nesse contexto, o trabalho foi direcionado para a investigação da composição química e da atividade larvicida do óleo essencial das folhas do *Croton linearifolius*, sobre larvas de *A. aegypti*, bem como para a determinação das concentrações letais (CL₁₀, CL₅₀ e CL₉₀), necessárias para causar a mortalidade em 10, 50 e 90% das larvas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Inseticidas Naturais: uma alternativa viável no controle de vetores de doenças

Na tentativa de controlar insetos que podem causar danos à saúde humana e prejuízos à agricultura, são utilizados os inseticidas, para inibir o desenvolvimento desses organismos. Gallo *et al.* (2002), definem inseticidas como compostos químicos ou biológicos, que aplicados direta ou indiretamente sobre os insetos, em doses adequadas, provocam sua morte, atuando no bloqueio de processos fisiológicos ou bioquímicos, sendo o sistema nervoso o seu principal alvo.

Os inseticidas podem ser de origem vegetal, inorgânicos e organossintéticos. Os inseticidas organossintéticos pertencem, na sua maioria, aos seguintes grupos químicos: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides (Bisset, 2002).

O histórico sobre o uso de inseticidas revela que, até a década de 40, os inseticidas naturais, tanto orgânicos quanto inorgânicos, foram muito utilizados. Os inorgânicos mais utilizados foram os arseniatos de cálcio e chumbo (verde Paris), cupratos (calda bordalesa), enxofre em pó, vários sulfatos, cal, fluorsilicato de bário, aminosselenossulfito de potássio (criolite) e óleos minerais. Destes, os arseniatos mostravam-se extremamente tóxicos ao homem, animais superiores e meio ambiente como um todo (Viegas Jr., 2003).

Dentre os orgânicos de origem natural, foram muito utilizados os alcaloides, como a nicotina (1), nor-nicotina (2) e anabasina (3), os piretróides, como a piretrina (4) e aletrina (5), os rotenóides, como a rotenona (6) e, em menor escala, alguns quassinóides, como a quassina (7) (Viegas Jr., 2003) (Figura 1).

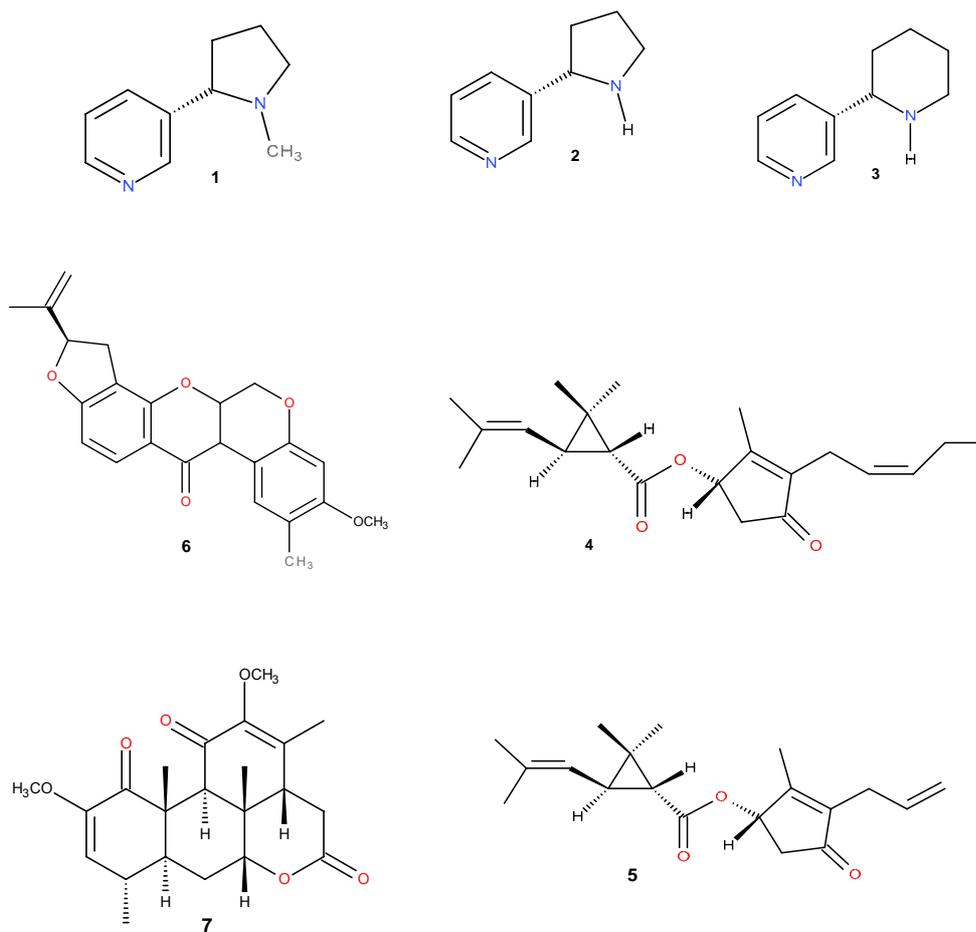


Figura 1: Inseticidas orgânicos de origem natural.

No século XX, um dos mais importantes avanços no controle de insetos foi o desenvolvimento de inseticidas que permaneciam ativos por longos períodos de tempo. O dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) (8), um organoclorado desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial, foi o primeiro inseticida de efeito prolongado, ou de propriedade residual. A partir do surgimento de resistência ao DDT, na década de 1960, inseticidas organofosforados começaram a ser utilizados (OPAS, 1995). Segundo a FUNASA (2001), o emprego desses compostos nos últimos anos tem sido limitado, sendo recomendado em caso de emergência ou quando não houver outra ferramenta disponível.

Nas décadas de 1950 a 1970, no contexto do pós Guerra, ocorreu uma explosão no desenvolvimento da síntese orgânica, inclusive de produtos com

atividade inseticida. Estes produtos acarretaram na substituição quase total dos produtos naturais pelos sintéticos.

O lançamento do livro *Primavera Silenciosa*, em 1962, foi um fato marcante em relação ao uso de inseticidas químicos sintéticos, pois trouxe discussões a cerca das consequências do uso indiscriminado de defensivos químicos, como os danos causados aos seres humanos. Esta obra motivou mudanças filosóficas que influenciaram a comunidade científica (Viegas Jr., 2003). A autora, Rachel Carson, trouxe reflexões sobre a relação inseto-planta, a respeito do mecanismo natural de adaptação e sobre a necessidade de haver maior objetividade em relação ao controle de pragas.

Segundo Simões *et al.* (2007), após as décadas de 1950-1960 começaram a surgir movimentos de proteção ao meio ambiente e três conceitos passaram a ser introduzidos na produção de inseticidas: seletividade, biodegradabilidade e baixa persistência.

No entanto, ainda hoje, as principais classes de inseticidas sintéticos utilizados no controle de vetores de doenças são os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (Bisset, 2002). A utilização dessas substâncias provoca o aparecimento de populações resistentes de mosquitos e danos ambientais, devido ao seu uso intensivo (Polanczyk *et al.*, 2003; Luna *et al.*, 2004).

Em todo o país utilizam-se inseticidas do grupo dos piretróides (deltametrina) (9), produto sintético obtido a partir de protótipos de origem vegetal. Entretanto, no Estado de São Paulo são usados os organofosforados (malation) (10) (Figura 2), pois já foi detectada resistência a piretróides (Donalísio & Glasser, 2002).

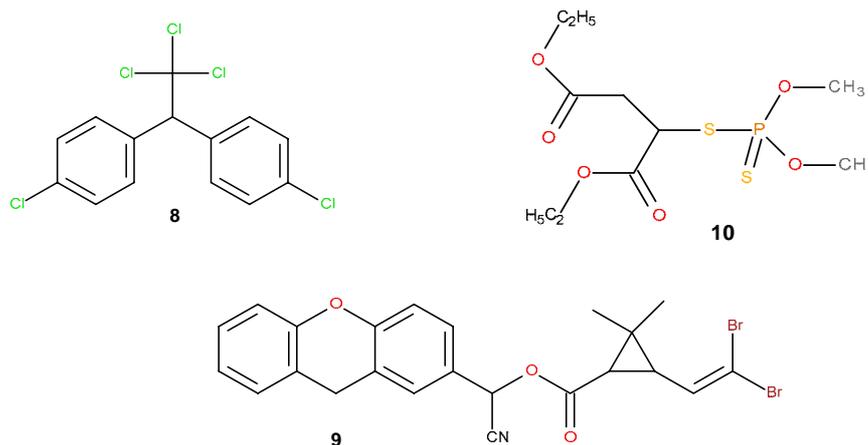


Figura 2: Estruturas do DDT (8), Deltametrina (9) e Malation (10).

A deltametrina apresenta um amplo espectro de atividade em relação a outros inseticidas e tem ação rápida, eficiência em pequenas doses e baixa persistência no meio ambiente e, praticamente não apresenta toxicidade para os mamíferos. Já o malation é mais tóxico para os vertebrados que os piretróides e, como a deltametrina, são bastante utilizados na área da saúde (Bisset, 2002).

O uso de tais inseticidas acarreta problemas de intoxicação e contaminação ambiental, o que ocasiona graves problemas à saúde humana. Além disso, já existem registros de desenvolvimento de resistência dos mosquitos aos inseticidas convencionais (Furtado *et al.*, 2005).

A evolução da resistência aos inseticidas vem se tornando um grande obstáculo para os programas de controle de insetos, que envolvem o uso de produtos químicos sintéticos (Gallo, *et al.* 2002).

A contínua utilização do controle químico sintético no combate aos insetos vetores pode causar grandes desequilíbrios ambientais, mediante a eliminação de insetos benéficos, a contaminação do meio ambiente (solo, água, atmosfera e seres vivos) e intoxicações acidentais de indivíduos, devido ao uso indiscriminado dos inseticidas, este último trazendo sérios problemas de saúde pública (Paumgarten, 1993; Gallo, *et al.* 2002).

Devido aos impactos negativos do uso dessas substâncias, os pesquisadores têm buscado formas alternativas para o controle dos insetos

vetores. Nesse contexto, os inseticidas botânicos e os bioinseticidas apresentam-se como uma opção econômica e ecologicamente viável (Barreto, 2005).

O termo bioinseticida refere-se à utilização de microrganismos entomopatogênicos, ou seja, que afetam apenas insetos alvos, para reduzir sua população. Neste caso, os microrganismos amplamente utilizados são fungos, como exemplo o *Beauveria bassiana* e bactérias, como o *Bacillus thuringiensis* (Polanczyk *et al.* 2003; Barreto, 2005).

Já os inseticidas botânicos são produtos derivados de plantas ou partes dela, podendo ser o próprio material vegetal, normalmente moído, ou seus produtos obtidos por extração aquosa ou com solventes orgânicos (álcool, éter, acetona, clorofórmio), ou destilação (Menezes, 2005).

A utilização de plantas com potencial inseticida é uma alternativa bastante estudada, devido, principalmente, ao seu menor impacto à saúde humana e ao meio ambiente (Roel, 2001). O conhecimento popular sobre o uso e a eficácia das plantas contribui de forma relevante para a divulgação de suas propriedades biológicas, despertando o interesse de pesquisadores de diferentes áreas do conhecimento (Maciel *et al.*, 2002).

Produtos obtidos de plantas, além de terem efeito inseticida comprovado, apresentam uma diversidade de compostos ativos, os quais podem agir sinergicamente, apresentando propriedades atraentes ou repelentes, que poderiam ser empregados em sistemas de manejo integrado de pragas, como alternativa dirigida para o controle e monitoramento das populações de mosquitos vetores de doenças (Isman, 2006; Navarro-Silva *et al.*, 2009). Alguns estudos apontam que compostos de origem botânica apresentam atividade larvicida com potencial para serem utilizados no controle de vetores (Silva *et al.* 2004).

De acordo com Vendramim & Castiglioni (2000), a necessidade de obterem-se produtos para o controle de vetores de doenças, que minimizem os problemas de contaminação ambiental, resíduos nos alimentos, efeitos prejudiciais sobre organismos benéficos e seleção de insetos resistentes, tem incentivado pesquisas com inseticidas botânicos.

Segundo Menezes (2005), os compostos de origem botânica, por ação tóxica, podem provocar a repelência, evitar a oviposição e inibir a alimentação; podem agir diretamente em órgãos ou enzimas específicas, interferindo nos processos de desenvolvimento, no metabolismo respiratório e na síntese de proteínas ou causando retardo e paralisia no desenvolvimento do inseto, levando à morte ou a deformidades; e, por fim, por contato ou ingestão, impedir a respiração ou provocando redução na alimentação e resultando na morte do inseto.

A atividade inseticida de plantas foi estudada por Santos *et al.* (2007), onde foi demonstrado o potencial dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Schinus terebinthifolius* sobre *Acanthoscelides obtectus* e *Zabrotes saubfasciatus* visando o controle de pragas de leguminosas. Neste trabalho, a mortalidade dos insetos expostos aos óleos ocorreu, provavelmente, devido à inibição da sua respiração traqueal, provocada pela absorção do óleo através de pequenos orifícios (espiráculos), localizados lateralmente, o que favoreceu sua morte por asfixia.

A obtenção de inseticidas a partir de plantas pode ser considerada uma alternativa promissora a ser incluída como estratégia para o controle de vetores de doenças, pois, segundo Macoris *et al.* (2003), o Brasil tem registrado resistência de mosquitos a inseticidas convencionais.

No Brasil, as principais doenças vetoriais (doenças metaxênicas) sujeitas a controle são: dengue, malária, leishmanioses, doença de Chagas, febre amarela, esquistossomose e filarioses. Os programas mais importantes, pelo volume de recursos que movimentam, são os de controle da malária e da dengue, doenças combatidas através do controle vetorial (Tauil, 2006).

A utilização de inseticidas naturais tem algumas vantagens quando comparado ao emprego de inseticidas químicos. Os inseticidas naturais são obtidos de recursos renováveis e são rapidamente degradados, ou seja, não persistem no ambiente. O desenvolvimento de resistência nos insetos, provocado por esses produtos, geralmente compostos da associação de vários princípios ativos, é um processo que ocorre muito lentamente. Esses produtos agem de diversas formas sobre os insetos provocando repelência, inibição de

oviposição e da alimentação, distúrbios no desenvolvimento, deformações, infertilidade e mortalidade (Roel, 2001).

Furtado *et al.* (2005), destacam que algumas propriedades devem estar associadas aos produtos utilizados como inseticidas, tais como: eficácia mesmo em baixas concentrações, ausência de toxicidade frente a mamíferos e animais superiores, ausência de fitotoxicidade, fácil obtenção, manipulação e aplicação, viabilidade econômica e não ser cumulativa no tecido adiposo humano e de animais domésticos.

Para Regnault-Roger (1997), substâncias produzidas pelas plantas podem ser utilizadas como inseticidas alternativos aos inseticidas sintéticos, pois, normalmente agem em doses baixas e com ações específicas, além de apresentar baixa toxicidade a mamíferos.

2.2. Metabólitos secundários

As plantas produzem uma larga e diversa quantidade de constituintes químicos, divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia, como aminoácidos, proteínas e ácidos nucléicos. Os metabólitos secundários, produtos secundários ou produtos naturais, aparentemente não possuem relação com o crescimento e desenvolvimento da planta e têm a função de proteger as plantas contra herbívoros e patógenos, servem como atrativos (aroma, cor, sabor) para polinizadores e, ainda, funcionam como agentes de competição entre plantas e de simbiose entre plantas e microrganismos (Taiz & Zeiger, 2009).

O estudo dos mecanismos de defesa de plantas podem fornecer subsídios para a descoberta de novos inseticidas, que preencham os requisitos de eficácia, segurança e seletividade (Viegas Jr. 2003).

A prospecção de metabólitos secundários que, no ambiente natural, atuam na defesa de vegetais contra insetos fitófagos, tem sido um método bastante explorado, pois constituem uma rica fonte de princípios bioativos. Estas substâncias podem exercer efeitos biológicos diversos, dentre eles

atividade inseticida, atraente ou repelente para insetos (Maciel *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2006).

A biossíntese de metabólitos secundários é realizada por rotas metabólicas específicas dos organismos vivos, as quais apresentam estreita relação com a síntese de metabólitos primários. Os metabólitos primários fornecem moléculas que são utilizadas como precursoras para as principais rotas de síntese de metabólitos secundários (Castro *et al.* 2005), conforme mostrado na Figura 3.

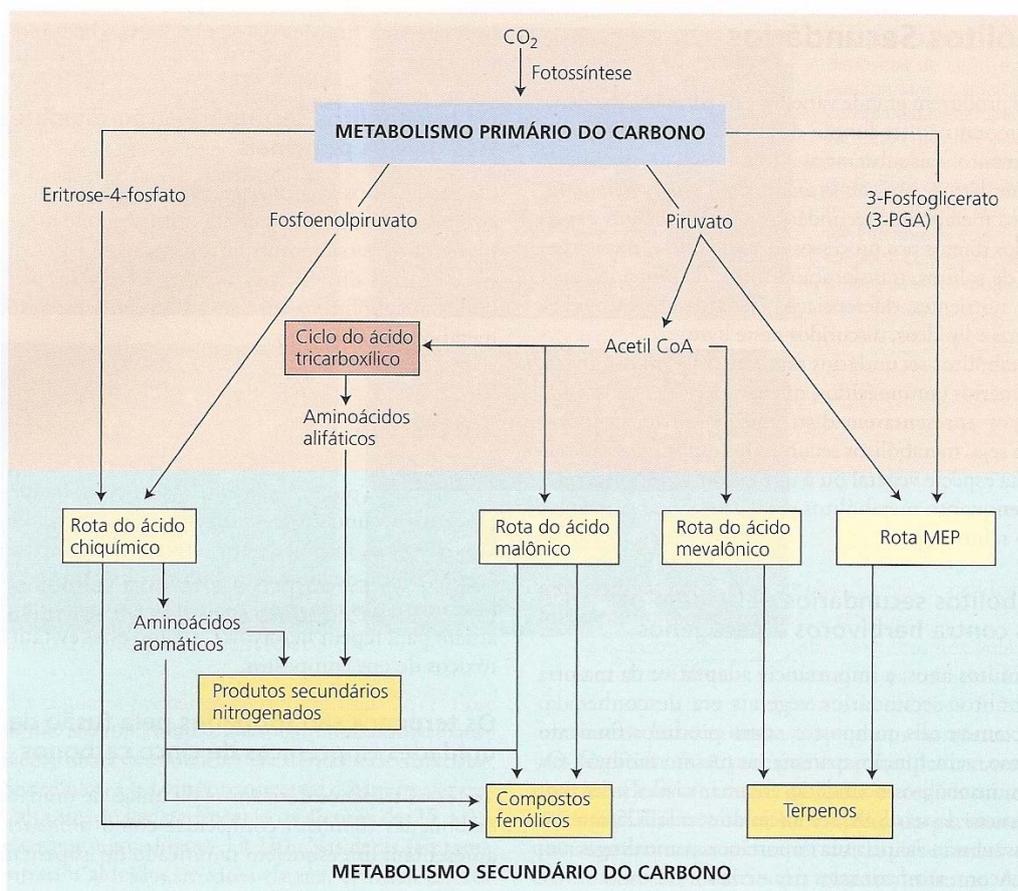


Figura 3: Relação dos metabólitos primários com a biossíntese dos metabólitos secundários.

Fonte: Taiz & Zeiger, 2009.

Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grandes grupos distintos quimicamente: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides (Simões *et al.*, 2007). Os terpenos são derivados de isoprenóides, obtidos pela via do mevalonato, sintetizados a partir do acetil-CoA. Os compostos fenólicos são sintetizados, principalmente, a partir da rota do ácido chiquímico e, também,

pela rota do ácido mevalônico. A biossíntese dos alcalóides ocorre a partir de aminoácidos sintetizados na rota do ácido chiquímico e do acetil-CoA (Taiz & Zeiger, 2009).

Os terpenos representam a maior classe dos metabólitos secundários. O nome terpeno, deriva do fato de que os primeiros membros da classe foram isolados da terebentina (terpentin em alemão). Os terpenos são formados por unidades de cinco carbonos denominadas de isopreno ou isopentenil pirofosfato (IPP) (Figura 4).

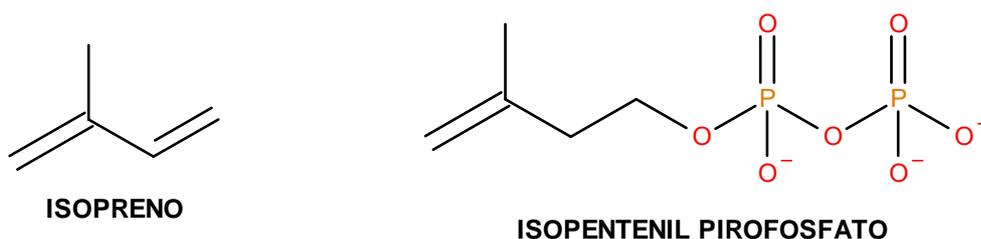


Figura 4. Estrutura de uma unidade de isopreno.

A justaposição sucessiva de um número variável de unidades isopropênicas é responsável pela formação de todos os terpenos (Vizzoto *et al.*, 2010) (Figura 5). A partir do número de unidades de isopreno (unidades pentacarbonadas), os terpenos podem ser classificados em: hemiterpenos (unidade básica – 5 carbonos), monoterpenos (10 átomos de carbonos), sesquiterpenos (15 átomos de carbono), diterpenos (20 átomos de carbono), sesterpenos (25 átomos de carbono), triterpenos (30 átomos de carbono), tetraterpenos (40 átomos de carbonos), polisoprenos (n átomos de carbono) (Alves, 2001). As diferentes classes de terpenos, quando apresentam em sua estrutura química heteroátomos distintos de carbono e hidrogênio, são denominados utilizando-se o sufixo “óides”, como por exemplo, sesquiterpenóides.

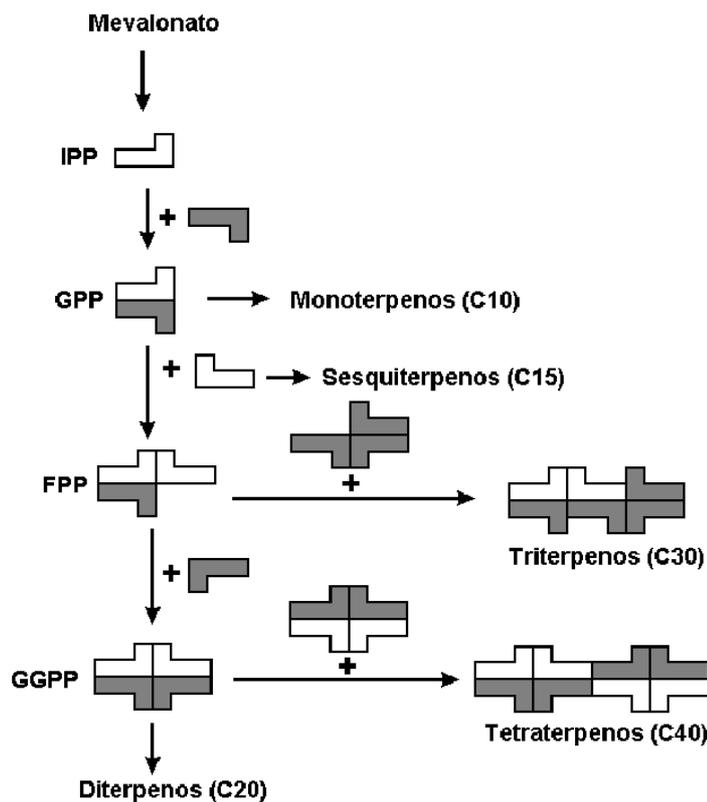


Figura 5: Esquema da justaposição sucessiva de unidades isopropênicas para a formação dos terpenos.

Fonte: Vizzoto *et al.*, 2010.

As unidades pentacarbonadas básicas dos terpenos são formadas através de duas rotas biossintéticas diferentes, a rota do ácido mevalônico e a rota do metileritritol fosfato (MEP), que sintetizam compostos intermediários fosforilados com 5 carbonos, o isopentil difosfato (IPP) e o dimetilalil difosfato (DMAPP), respectivamente. O IPP e o seu isômero DMAPP são as unidades bioquimicamente ativas do isopreno, que estão diretamente envolvidos na formação dos terpenos (Castro *et al.*, 2005; Niero & Malheiros, 2009) (Figura 7).

O isopentil difosfato (IPP) e o dimetilalil difosfato (DMAPP) se combinam para formar o geranyl pirofosfato (GPP), uma molécula de 10 carbonos, precursora de todos os monoterpênicos. Moléculas de IPP podem se ligar ao GPP formando compostos de 15 carbonos, o farnesil difosfato (FPP), que forma a maioria dos sesquiterpenos, e moléculas de 20 carbonos, o geranylgeranyl difosfato (GGPP), que origina os diterpenos. A dimerização de

duas unidades de IPP e GPP gera os triterpenos e os tetraterpenos, respectivamente (Dubey, et al. 2003).

Os terpenos apresentam funções variadas nos vegetais, sendo os monoterpenos os principais constituintes dos óleos voláteis, atuando na atração de polinizadores; os sesquiterpenos, de modo geral, protegem as plantas contra fungos e bactérias e os diterpenos são precursores de hormônios de crescimento vegetal (Gershenzon & Dudavera, 2007).

Devido a essa variedade funcional, alguns terpenos atuam no crescimento e desenvolvimento vegetal, como as giberelinas, hormônios vegetais derivados do ácido giberélico (Figura 6), outros agem na defesa de muitas plantas contra herbívoros. Os piretróides, por exemplo, encontrados em espécies de *Chrysanthemum*, apresentam potente atividade inseticida (Taiz & Zeiger, 2009).

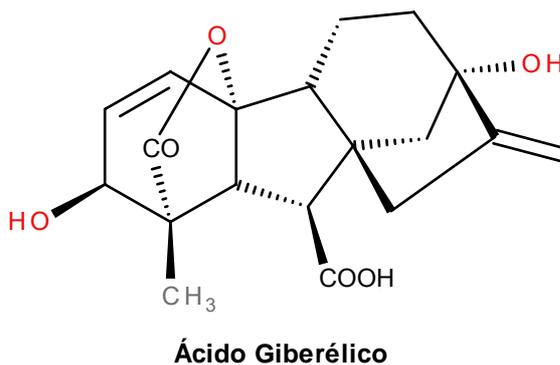


Figura 6: Estrutura química do ácido giberélico.

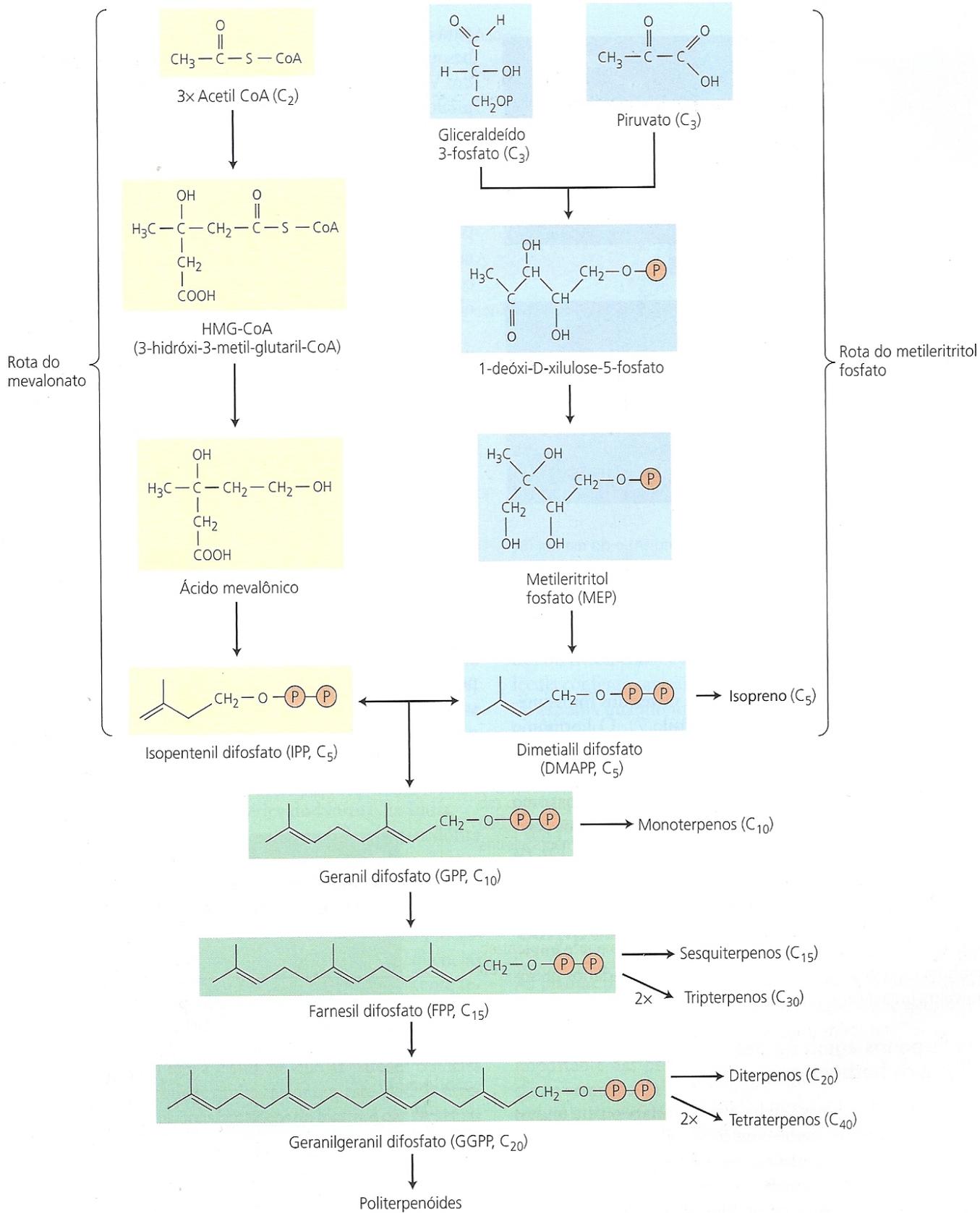


Figura 7: Rotas metabólicas para a biosíntese de terpenos.

Fonte: Taiz & Zeiger, 2009.

2.3. Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são produtos voláteis extraídos de plantas aromáticas, que evaporam a temperatura ambiente e, normalmente, são elaborados nas folhas, armazenados em espaços extracelulares, entre a cutícula e a parede celular (Santos *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004). Estão relacionados com a fragrância das plantas, atuando na defesa contra herbívoros e patógenos (Raven *et al.*, 2001).

Os óleos essenciais também são denominados de óleos voláteis. Essas denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas, como, por exemplo, a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa a temperatura ambiente, advindo daí a designação de óleo (Spitzer, 2004).

São misturas naturais que podem conter aproximadamente entre 20 a 60 componentes em concentrações diferentes. Caracterizam-se por apresentar dois ou três constituintes majoritários, que constituem 20 a 70% do óleo e o constituinte majoritário, em geral, é o responsável pela atividade do óleo (Bakkali *et al.*, 2008). Outros aparecem em menores quantidades e, ainda, há aqueles que estão presentes em concentrações muito baixas (traços) (Simões *et al.*, 2007).

Os óleos essenciais são constituídos por diferentes classes de metabólitos secundários, dentre eles, os terpenos, ésteres, alcoóis, fenóis, aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos (Rocha & Santos, 2007). Entretanto, a grande maioria é constituída de terpenóides (Alves, 2001).

Dentre os terpenos presentes em óleos essenciais, os monoterpenos e os sesquiterpenos são os compostos mais frequentemente encontrados (Simões *et al.*, 2007). Os mono e sesquiterpenos são moléculas bioativas que apresentam importante papel na interação das plantas com outros organismos e estão envolvidos na defesa contra pragas e doenças (Aharoni *et al.*, 2006; Vizzoto *et al.*, 2010).

Contudo, alguns fatores ambientais, como a radiação, temperatura, precipitação, ventos fortes, altitude, solo, época de coleta e outros, podem interferir na composição e na concentração das substâncias presentes nos óleos essenciais (Gouinguéné & Turlings, 2002; Angélico *et al.*, 2011).

Okoh *et al.* (2010), destacam outro aspecto importante em relação à utilização de óleos essenciais, o qual refere-se à sua forma de obtenção. Este autor aponta que a extração de óleos voláteis pode ser realizada através de inúmeras técnicas e considera que os métodos mais utilizados são: extração por arraste a vapor, hidrodestilação, prensagem a frio, extração por solventes orgânicos, extração por alta pressão e extração por CO₂ supercrítico. Dentre as estas técnicas, Santos *et al.* (2004), consideram que a extração por arraste a vapor é o método mais utilizado.

As técnicas analíticas mais empregadas na detecção, quantificação e identificação de produtos naturais são a cromatografia e a espectroscopia. Para a análise de compostos voláteis e termicamente estáveis, o método mais utilizado é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS). O uso de técnicas hífenadas vem crescendo nos últimos anos, uma vez que facilitam as análises a serem realizadas, requerendo um menor tempo de investigação e reduzindo os gastos operacionais e com solventes.

Diversas propriedades biológicas também têm sido atribuídas aos óleos essenciais. Segundo Silva *et al.* (2008), esses produtos têm sido largamente estudados, devido as suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e inseticidas. Apresentam também atividade larvicida (Rajkumar *et al.*, 2010), antioxidante (Wannes *et al.*, 2010), analgésica e antiinflamatória (Henriques *et al.*, 2009).

A utilização de extratos e óleos essenciais obtidos de plantas, contra mosquitos vetores de doenças, tem aumentado nos países industrializados, inclusive no Brasil (Amer & Mehlhor, 2006). Segundo Hummelbrunner & Isman, (2001), vários óleos essenciais foram descritos por produzir efeito agudo tóxico contra insetos.

Restello *et al.* (2009), verificaram que o óleo essencial de *Tagetes patula* tem efeito repelente sobre adultos de *Sitophilus zeamais*. Costa *et al.* (2005), constataram a ação larvicida de óleos essenciais de *Syzygium aromaticum*, *Hyptis martiusii* e *Lippia. sidoides* frente ao *Culex quinquefasciatus* e ao *Aedes aegypti*. Dória *et al.* (2006), também verificou ação larvicida de óleo essencial de *L. gracilis* contra o *A. aegypti*. Resultado semelhante para o *A. aegypti* foi

encontrado por Cavalcanti *et al.* (2004), ao analisar o potencial do óleos de *Ocimum americanum*, *O. gratissimum*, *Citrus citratus* e *L. sidoides*.

Considera-se que os óleos essenciais podem ser eficazes no controle de vetores, além de alguns serem constituídos por compostos biodegradáveis (Amer & Mehlhor, 2006), que apresentam baixa toxicidade à saúde humana e ao meio ambiente (Santos *et al.*, 2006).

Portanto, muitas pesquisas têm sido realizadas com óleos essenciais produzidos por plantas, e algumas têm se mostrado promissoras. No entanto, apesar da comprovação de vários efeitos biológicos dos óleos essenciais, poucos estudos têm sido realizados sobre a estabilidade destes óleos e seus constituintes (Rajendram & Sriranjini, 2008).

2.4. Abordagem geral sobre o *Aedes aegypti*: o vetor da dengue

O *A. aegypti* é de origem africana e foi trazido para as Américas logo depois do descobrimento. Este mosquito apresenta hábitos sinantrópicos e antropofílicos, o que facilitou a sua dispersão pelo globo terrestre (WHO, 1999).

Ao longo de sua evolução, o *A. aegypti* desenvolveu um comportamento estritamente sinantrópico e antropogênico, sendo considerada a espécie de mosquito mais dependente do ambiente urbano (Natal, 2002). Seu habitat está intimamente ligado aos ambientes domiciliares ou peridomiciliares, ofertados pelo modo de vida das populações humanas.

A preferência do *A. aegypti* por depósitos artificiais faz com que a concentração populacional advinda com a urbanização, ao lado da larga utilização de recipientes artificiais, seja fator determinante na sua crescente proliferação nos centros urbanos das regiões tropicais e subtropicais do planeta (Beserra *et al.*, 2009).

Em relação ao seu desenvolvimento, o mosquito *A. aegypti* apresenta um curto ciclo biológico, com duração de 15 a 30 dias, em regiões tropicais, com metamorfose completa (holometabolía). Seu ciclo de vida é composto por quatro fases: ovo, larva (1º a 4º *instar*), pupa e indivíduo adulto (dimorfismo sexual). O ovo, a larva e a pupa pertencem às fases aquáticas do ciclo de vida

do mosquito (Beserra *et al.* 2006). As fêmeas apresentam hábitos diurnos, são hematófilas e apenas depositam seus ovos após o repasto sanguíneo (Forattini, 2002).

O número de oviposturas das fêmeas depende essencialmente da quantidade de sangue ingerido para o desenvolvimento dos ovos. O repasto satisfatório poderá ser alcançado com 3,0 a 3,5 mg de sangue. Geralmente, a fêmea faz uma postura após cada repasto sanguíneo, ovipositando cerca de 120 ovos (Forattini, 2002).

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

O tempo necessário para o desenvolvimento do ovo a adulto sofre variações de acordo com as condições de temperatura, umidade, disponibilidade de alimento e, normalmente, completa-se em 10 dias. (Guarido, 2009).

Alguns ovos são extremamente resistentes a dessecação, devido à presença de uma cutícula serosa que surge entre 11 e 13 horas após a oviposição. Essa característica tem-se tornado um grande obstáculo para o controle dessa espécie. (Rezende *et al.*, 2008; Guarido 2009).

As larvas, morfologicamente, são alongadas, vermiformes, esbranquiçadas. O corpo é formado por cabeça, tórax e abdome. A cabeça possui um par de antenas, olhos compostos e alguns ocelos e aparelho bucal mastigador-raspador. O tórax é globoso, mais largo que a cabeça com segmentos fundidos e revestidos por cerdas. No oitavo e último segmento localiza-se o sifão respiratório (curto, grosso e escuro) (Lozovei, 2001).

As pupas não se alimentam e esse estágio dura de dois a três dias em condições adequadas de temperatura. Correspondem ao estágio de transição entre o indivíduo do meio aquático para o terrestre (Forattini, 2002).

Devido a seu ciclo de vida rápido e alta capacidade adaptativa, o *A. aegypti* é um dos principais problemas de saúde pública. É o principal inseto-transmissor da dengue nos países tropicais. Nas Américas, é responsável por

freqüentes epidemias e a circulação dos quatro sorotipos do vírus no continente (WHO, 2004)

A dengue se caracteriza como um grande desafio para os serviços de saúde e a transmissão da doença ocorre pela picada da fêmea dos mosquitos *Aedes aegypti*, contaminado com o vírus do gênero *Flavivirus*, pertencente à família Flaviviridae, sendo conhecidos quatro sorotipos do vírus da dengue: Den-1, Den-2, Den-3 e Den-4 (Brasil, 2002).

Essa doença pode ser classificada clinicamente como febre do dengue (FD) ou dengue clássico (DC), febre hemorrágica do dengue (FHD) ou síndrome do choque do dengue (SCD). A Secretaria de Vigilância em Saúde usa também denominação caso de dengue com complicações (DCC). A infecção confere imunidade permanente para cada sorotipo (WHO, 1999; Rothman, 2004; Ministério da Saúde, 2011).

A perspectiva de controle do vetor da dengue esbarra na sua grande capacidade adaptativa a condições adversas, como o desenvolvimento em águas poluídas, e a quiescência dos ovos em ambientes inóspitos (Silva *et al.*, 1999).

A única forma de controle da dengue na atualidade é o combate ao vetor, pois não existe uma vacina que confira imunidade permanente aos quatro sorotipos do vírus, nem às suas variações genéticas (Hombach, 2007; Periago & Guzmán, 2007). As estratégias de controle são realizadas através da eliminação dos criadouros potenciais dos mosquitos vetores, aplicação de larvicidas em depósitos de água de consumo e uso de inseticidas para as formas adultas, durante os períodos de transmissão (Tauil, 2006), utilização de produtos químicos e biológicos, integrados com programas de manejo ambiental (Luna *et al.*, 2004).

No Brasil, os programas que visam controlar o *A. aegypti* utilizam principalmente inseticidas químicos, como os organofosforados e piretróides, que requerem monitoramento constante (Luna *et al.*, 2004). Entre os organofosforados adotados pelos Programas de Saúde Pública, destacam-se o temephos, o malathion e fenitrothion (Furtado *et al.*, 2005)

Devido à existência de populações do mosquito resistentes aos inseticidas sintéticos, mais aplicações do produto são realizadas, de forma

irracional, de modo que, cada vez maiores quantidades desses produtos são colocadas na natureza, causando grandes estragos (D'Amato *et al.*, 2002). A contínua utilização do controle químico no combate aos insetos vetores pode causar grandes desequilíbrios ambientais, mediante a eliminação de insetos benéficos, a contaminação do meio ambiente (solo, água, atmosfera e seres vivos), e intoxicações acidentais de indivíduos, devido à má utilização dos inseticidas, trazendo sérios problemas de saúde pública (Paumgarten, 1993).

Portanto, o monitoramento e o manejo da resistência, assim como a utilização de substâncias com modos de ação diferentes dos inseticidas químicos convencionais, são elementos de suma importância em qualquer programa de controle de vetores (Ferrari, 1996). Neste contexto, a obtenção de inseticidas a partir de plantas pode ser considerada como uma alternativa promissora a ser incluída como estratégia para o controle de vetores de doenças (Macoris *et al.*, 2003).

2.5. Características gerais do gênero *Croton*

As espécies do gênero *Croton* são arbustivas ou subarbustivas, com até dois metros de altura, providas de látex incolor e óleo essencial. Na sua maioria são espécies monóicas, as inflorescências apresentam flores femininas na base e masculinas no ápice, caracterizando-se ainda por possuírem flores masculinas com filamentos flexionados no botão e as flores femininas com pétalas reduzidas ou ausentes (Webster, 1993; Suárez *et al.*, 2003). Estão presentes em matas, campos e cerrados de Norte a Sul do país. Várias espécies ocorrem na Caatinga e nas áreas de Brejos de altitude de Pernambuco (Albuquerque & Andrade, 2002). No Nordeste, são conhecidas popularmente por marmeleiro ou velame e são usadas na medicina popular no tratamento de inflamações, úlceras, e hipertensão (Randau *et al.* 2004).

O gênero *Croton* apresenta relevância econômica devido ao seu conteúdo de óleos essenciais e de diversas substâncias ativas como terpenóides, flavonóides e alcalóides. De acordo com Palmeira Jr. *et al.* (2006),

a maioria das espécies deste gênero são produtoras de óleos essenciais ricos em terpenos, mono e sesquiterpenos, e fenilpropanóides.

Estudos fitoquímicos realizados com algumas espécies do gênero *Croton*, de ocorrência no Brasil, têm proporcionado o isolamento das mais variadas classes de metabólitos secundários, tais como diterpenos, alcalóides, flavonóides e triterpenos (Torres, 2008).

A diversidade estrutural dos compostos químicos dos óleos voláteis do *Croton* contribui para tornarem-se fontes de substâncias bioativas (Angélico *et al.*, 2012). Espécies deste gênero são ricas em constituintes que apresentam atividades biológicas, sendo que algumas espécies apresentam propriedades terapêuticas já comprovadas (Torrice *et al.*, 2007; Costa *et al.* & Rocha *et al.*, 2008), destacando-se o *C. zehntineri*, *C. sonderianus*, *C. nepetaefolius* e *C. argyrophyloides*. Vários autores constataram que todas essas espécies são compostas principalmente por mono e sesquiterpenos e que o *C. zehntineri* apresenta efeito antiinflamatório comprovado, o *C. sonderianus* tem atividade antimicrobiana e larvicida contra *Aedes aegypti* e *C. nepetaefolius* e *C. argyrophyloides* apresentam ação antioxidante larvicida.

O Brasil é o país que possui o maior número de espécies do gênero *Croton* (Berry *et al.*, 2005), sendo este é o segundo maior representante da família Euphobiaceae (Randau *et al.*, 2004). Esta família é a mais extensa do Bioma Caatinga, com ocorrência nos Estados da Bahia, Pernambuco, Fortaleza e Sergipe e compreende cerca de 300 gêneros e 7600 espécies.

Neste contexto, é importante destacar a necessidade de conservação da Caatinga, devido a sua diversidade vegetal e importância socioeconômica. Este Bioma está submetido à intensa e predatória exploração de seus recursos naturais, os quais ainda precisam ser mais estudados.

A pressão antrópica sobre a Caatinga tem colocado em risco a sobrevivência de espécies e comprometido o seu potencial socioeconômico. Como as espécies do gênero *Croton* têm larga ocorrência nesta região, o cenário atual de degradação ambiental é preocupante, pois estas espécies ainda são relativamente pouco estudadas, considerando sua complexidade e o número de representantes (Vunda, 2001).

Dessa forma, tornam-se necessárias ações para fortalecer e/ou garantir o desenvolvimento de estratégias de conservação da Caatinga, bem como pesquisas sobre as espécies do gênero *Croton*, pois de acordo com Randau *et al.* (2004), estas se caracterizam como fontes promissoras para a realização de estudos fitoquímicos e farmacológicos da flora do Nordeste brasileiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização e caracterização da área de estudo

As folhas do *Croton linearifolius* (Figura 9) foram coletadas em abril de 2011, período chuvoso, na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), localizada entre os municípios de Contendas do Sincorá-BA e Tanhaçu-BA. A FLONA tem uma área de aproximadamente 11000 ha, altitude média de 350 m, temperatura média anual de 23°C e precipitação média anual de 596 mm. O clima da região é semiárido com alta sazonalidade e período chuvoso de novembro a abril (Brasil, 2006). Esta unidade de conservação, segundo Rios *et al.* (2007), apresenta diversas unidades de paisagem (UP), dentre as quais destacam-se as seguintes: Mata Ciliar; Caatinga arbustiva; Capoeira.



Figura 8: Foto da espécie *Croton linearifolius* encontrada na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA).

3.2. Procedimentos metodológicos

3.2.1. Preparação do material botânico

O processo de identificação taxonômica do material vegetal foi realizado pela botânica Daniela Santos Carneiro do herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana, local onde a planta encontra-se armazenada sob o registro número HUEFS 146620.

O material botânico coletado foi levado ao Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LAPRON) da UESB, para a desfolha, pesagem e secagem. Após a desfolha, pesou-se o material e obteve-se um total de 1, 340 g. Logo em seguida, as folhas foram submetidas à secagem, que foi feita em estufa de circulação de ar a temperatura de 40°C, durante 12 horas, até o ponto de ficarem quebradiça. Depois da secagem, as folhas foram pesadas, tendo um valor total de 960 g de material seco.

As folhas secas foram trituradas manualmente e, posteriormente, submetidas à extração do óleo essencial.

3.2.2. Extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação em um extrator de Clevenger modificado (Figura 10). Utilizou-se em média 150g de folhas secas e 2 L de água deionizada por extração, com um total de 6 (seis) extrações.

O tempo de duração de cada extração por foi 2 h e 30 minutos. Esse tempo foi determinado através da observação do volume de óleo essencial extraído a cada 30 minutos, sendo considerando como tempo ótimo quando não houve alteração do mesmo, neste caso 2h e 30 min.



Figura 9: Extrator de Clevenger modificado.

Após o processo de extração, o óleo essencial foi recolhido e a água residual eliminada através da adição de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). O óleo seco foi pesado e armazenado em frasco âmbar, que foi envolvido em papel alumínio, e mantido sob refrigeração a 10°C até o momento da sua utilização.

3.2.3. Composição química do óleo essencial

O óleo essencial do *C. linearifolius* foi analisado por Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) e acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM), o que permitiu a identificação dos seus constituintes químicos majoritários. Essa etapa do experimento foi realizada em parceria com a Universidade Estadual de Santa Cruz/UESC - Ilhéus e a Universidade do Vale do Itajaí/UNIVALI – Santa Catarina.

O cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC) utilizado foi da marca VARIAN SATURNO 3800. O método empregado para a separação dos componentes do óleo foi: temperatura do injetor: 250°C , do detector: 280°C , coluna: VF5-ms (30 m X 0,25 mm X 0,25 μm). Temperatura da coluna: teve início a 70°C , sendo acrescida de $8^\circ\text{C}/\text{min}$ até 200°C e de 10°C até 260°C , sendo mantida nessa temperatura por 5 minutos. Fluxo de 1,2 mL.

Foi usado He 5.0 como gás de arraste e foi injetado 1uL de solução do óleo a 10% em CHCl₃, na razão *split* 1:10.

A identificação dos constituintes químicos do óleo essencial do *C. linearifolius* foi realizada através da comparação os índices de retenção dos compostos com a substância padrão.

3.2.4. Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *Croton linearifolius*

Os ensaios de atividade inseticida sobre as larvas de *Aedes aegypti* foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Inseticidas Naturais (LAPIN) da UESB/Campus Itapetinga. A criação estoque de *A. aegypti* foi estabelecida a partir de ovos obtidos do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, da Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro.

Para a avaliação da atividade larvicida do óleo essencial do *C. linearifolius*, foram utilizadas larvas em 3° *instar* do *A. aegypti* (Figura 11), oriundas da criação do LAPIN. A criação das larvas foi realizada em câmara biológica climatizada a 27°±1°C e 12h de fotoperíodo.



Figura 10: Larvas de *Aedes aegypti* em 3° *instar*

Foi realizado um pré-teste com o objetivo de demonstrar quais concentrações seriam viáveis para o bioensaio.

Para a obtenção das soluções a serem testadas no bioensaio, foi preparada uma solução estoque do óleo essencial na concentração de 50

mg/mL, utilizando como solvente a solução de Tween 80 a 10%. A partir da solução estoque foram obtidas diluições de diferentes concentrações do óleo, correspondentes a 0,5; 0,83; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/mL.

O bioensaio foi realizado a $27\pm 1^\circ\text{C}$, utilizando as cinco diferentes concentrações do óleo essencial obtidas e um grupo controle, totalizando seis tratamentos e quatro repetições por tratamento. Para cada repetição foram utilizadas 30 larvas, imersas em 29,0 mL de água deionizada e adicionado 1,0 mL de cada uma das soluções obtidas (0,5; 0,83; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/mL), correspondendo a concentrações finais de 16,7; 27,7; 33,3; 50,0 e 66,7 $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial. Foram consideradas mortas as larvas que não apresentavam movimento quando estimuladas com a ponta de um pincel.

A mortalidade das larvas expostas às cinco diferentes concentrações do óleo essencial foi observada nos intervalos de 30 min, 1h, 2h, 4h, 8h, 16h e 24h (Figura 12).



Figura 11: Observação da mortalidade das larvas de *A. aegypti* submetidas a diferentes concentrações do óleo essencial do *C. linearifolius*.

3.2.5 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado no bioensaio foi inteiramente casualizado (DIC), sendo os dados relativos à mortalidade das larvas avaliados mediante análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

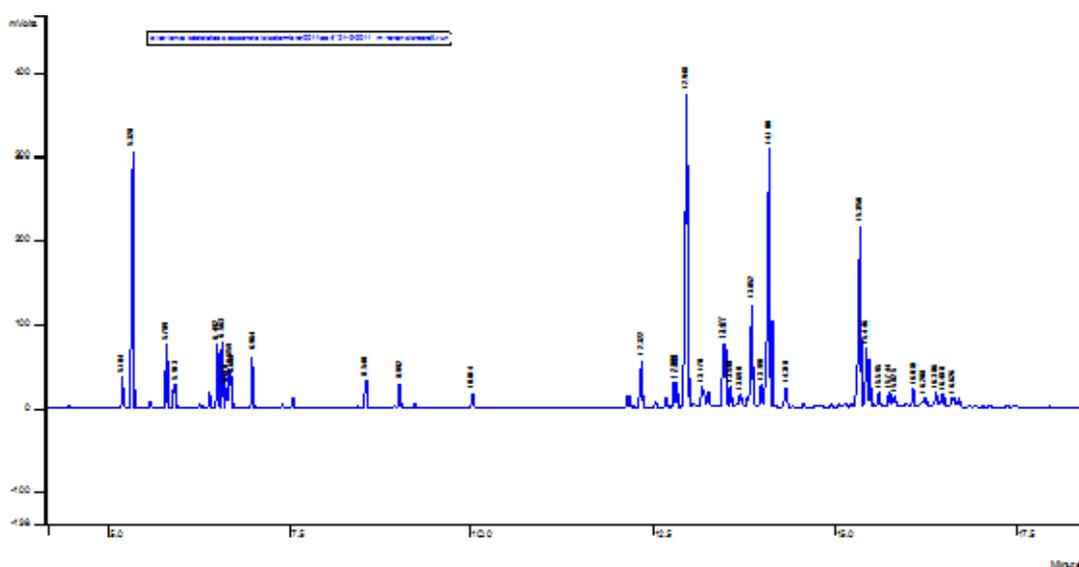
Os dados de mortalidade em função da concentração ($\mu\text{g/mL}$) foram obtidos pelo método Probit, a fim de determinar as concentrações letais do óleo essencial necessárias para matar 10% (CL_{10}), 50% (CL_{50}) e 90% (CL_{90}) das larvas, e os seus respectivos intervalos de confiança.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição química do óleo essencial obtido das folhas do *Croton linearifolius*.

O óleo essencial do *C. linearifolius* foi analisado por Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC), o que permitiu a quantificação e identificação dos seus constituintes químicos majoritários, comparando os índices de retenção dos compostos com a substância padrão.

O cromatograma obtido por CG-DIC para o óleo essencial das folhas de *C. linearifolius* evidenciou a presença de vinte e três picos (Figura 13), sendo que apenas 8 (oito) compostos foram identificados perfazendo um total de que 76,3% dos constituintes químicos.



4,6% do total do óleo essencial. A Tabela 1 apresenta a composição química do óleo essencial estudado.

Sendo os terpenos a classe de metabólitos secundários predominantemente encontrada em óleos essenciais do gênero *Croton*, é importante destacar suas propriedades funcionais para os vegetais, pois, de acordo com Veiga Jr. (2003), apresentam importância ecológica como defensivos de plantas. Além disso, alguns estudos também comprovam sua ação antimicrobiana, anticarcinogênica e anti-inflamatória e destacam o seu potencial inseticida (Bouvier *et al.* & Han, 2005).

Dentre os terpenos, os sesquiterpenos e monoterpenos apresentam propriedades funcionais importantes em relação à atividade inseticida. Os monoterpenos apresentam atividade larvicida e os sesquiterpenos tem a capacidade de inibir o processo de troca do exoesqueleto pelos insetos.

Entre os compostos identificados, o *beta*-cariofileno foi o componente encontrado em maior concentração (20,63%), seguido do *beta*-copaen-4-*alfa*-ol (16,48%), do óxido de cariofileno (12,64%) e do *delta*-guaieno (10,95%) (Figura 14).

Vários autores constataram que o *beta*-cariofileno está entre os principais constituintes químicos do óleo essencial de diferentes espécies do gênero *Croton* (Matos & Vunda 2011; Radulovic *et al.*, 2006), entre elas, o *C. heliotropiifolius* (Angélico *et al.*, 2012), *C. muscicapa* (Freitas *et al.*, 2010), *C. ovalifolius* (Meccia *et al.*, 2000), e o *C. cajucara* (Azevedo, 2010).

Em relação às propriedades biológicas dos compostos de maior ocorrência no óleo essencial do *C. linearifolius*, destaca-se a atividade do *beta*-cariofileno e do óxido de cariofileno, os quais têm sido relacionados com a ação inseticida de óleos voláteis.

São atribuídas ao *beta*-cariofileno outras propriedades biológicas além da atividade inseticida (Jacobson, 1990), tais como: anti-inflamatória (Passos *et al.*, 2007), antialérgica (Ghelardini *et al.*, 2001), anestésica local (Costa *et al.*, 2000), antifúngica (Zheng *et al.*, 1992; Lam, 1992) e anticarcinogênica (Chinou *et al.*, 1996; Angélico *et al.*, 2011). Este composto é responsável pelo aroma dos vegetais e, geralmente é encontrado em diferentes partes das plantas (Randau *et al.*, 2004).

O óxido de cariofileno, um sesquiterpenóide, que além da atividade inseticida, possui grande valor para a indústria de cosméticos, devido ao seu aroma característico (Pereira *et al.*, 2008) e apresenta ação anti-inflamatória e antitumoral descritas na literatura (Soares, 2008).

Outros estudos sobre a química de óleos essenciais de espécies do gênero *Croton*, demonstram a presença de α -pineno, β -pineno e β -cariofileno como seus principais constituintes químicos (Radulovic *et al.*, 2006). Alguns trabalhos encontrados na literatura avaliaram a composição química de espécies do gênero *Croton*, como o *C. nepetaefolius*, que apresenta como composto majoritário o metil-eugenol (Morais *et al.* 2006), o *C. zehntneri*, que apresenta o *E*-anetol, (Morais *et al.* 2006) e o estragol (Costa *et al.* 2008) e o *C. heliotropiifolius*, contendo o eucaliptol (Angélico *et al.* 2012) e o *p*-cimeno (Craveiro *et al.* 1981) como compostos majoritários.

Os compostos majoritários encontrados por alguns autores diferem dos observados no *C. linearifolius*. Para Bruneton (2011) e Angélico *et al.* (2011), diferenças observadas na composição química de óleos essenciais podem estar relacionadas à fisiologia da planta, pois a composição e quantidade de metabólitos produzidos dependem, principalmente, das enzimas específicas que catalisam a produção de compostos voláteis em um órgão, do estágio de desenvolvimento e de estresses abióticos, como a salinidade do solo, a umidade e a temperatura.

4.3. Atividade larvicida do óleo essencial de *C. linearifolius*

Os resultados obtidos a partir da avaliação da atividade larvicida do óleo essencial do *C. linearifolius*, mostraram que o óleo provocou a mortalidade das larvas em 3° *instar* do *Aedes aegypti*. O percentual encontrado foi de 45 a 90% de mortalidade, entre as concentrações de 16,67 a 66,67 $\mu\text{g/mL}$, em 24h de observação (Tabela 2). Não foi observado taxa de mortalidade durante as primeiras horas de experimento (30 min, 1h e 2h) em nenhuma das concentrações testadas.

Tabela 1: Mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* a partir de 4 horas de exposição às diferentes concentrações do óleo essencial das folhas de *Croton linearifolius*.

Concentração (µg/mL)	Mortalidade (%)			
	4h	8h	16h	24h
66,67	9,17a*	62,50a	77,49a	85,00a
50,00	3,33 ^a	59,22a	85,00a	90,00a
33,33	0,83b	32,50b	50,83b	54,17c
27,67	0,83b	49,17a	61,66b	67,50b
16,67	0,00b	13,33c	36,66c	44,99c
Controle	0,00b	0,00c	0,00d	0,00d

*médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Ducan a 5 % de probabilidade.

A partir das 4h verificou-se um percentual em torno de 10% de mortalidade, na concentração de 66,67 µg/mL. Depois de 8 horas a mortalidade foi superior a 50% a partir das duas maiores concentrações (66,67 e 50,00 µg/mL) (Figura 15). Após as 16h de observação as concentrações 66,67 e 50,00 µg/mL provocaram mortalidade superior a 75%.

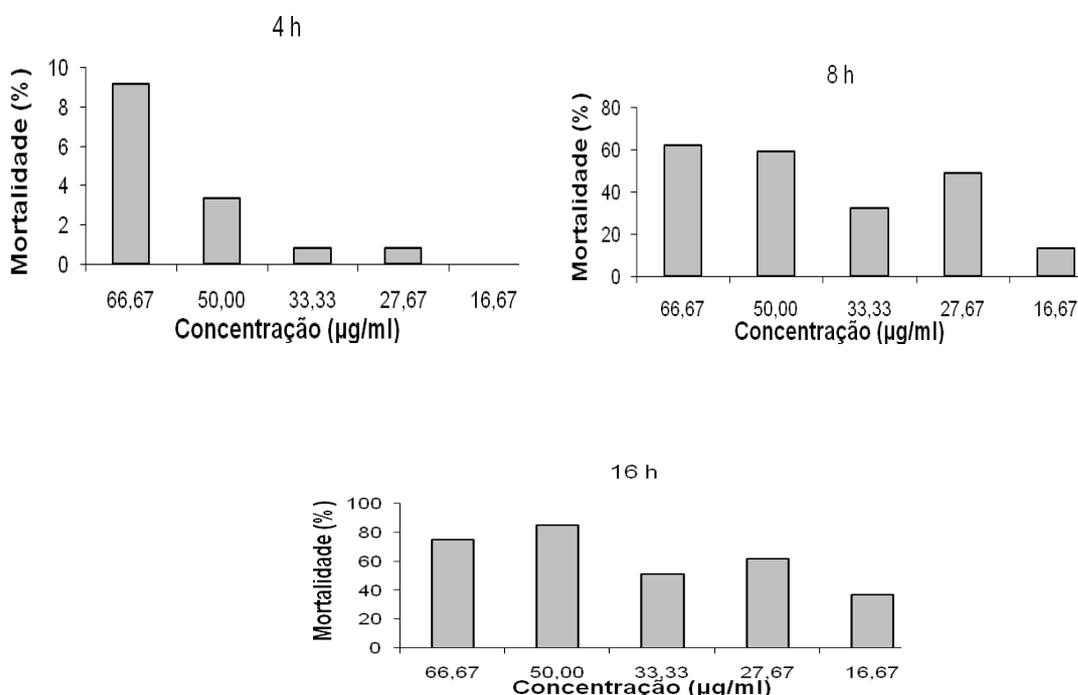


Figura 13: Mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* após 4, 8 e 16 h de exposição às diferentes concentrações (µg/mL) do óleo essencial das folhas de *Croton linearifolius*.

Após as 24h de observação, para a concentração de 50,00 $\mu\text{g/mL}$ já foi observada uma porcentagem de mortalidade das larvas em torno de 90%, equivalente à concentração de 66,67, que não diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$), demonstrando o potencial larvicida do óleo estudado (Figura 16).

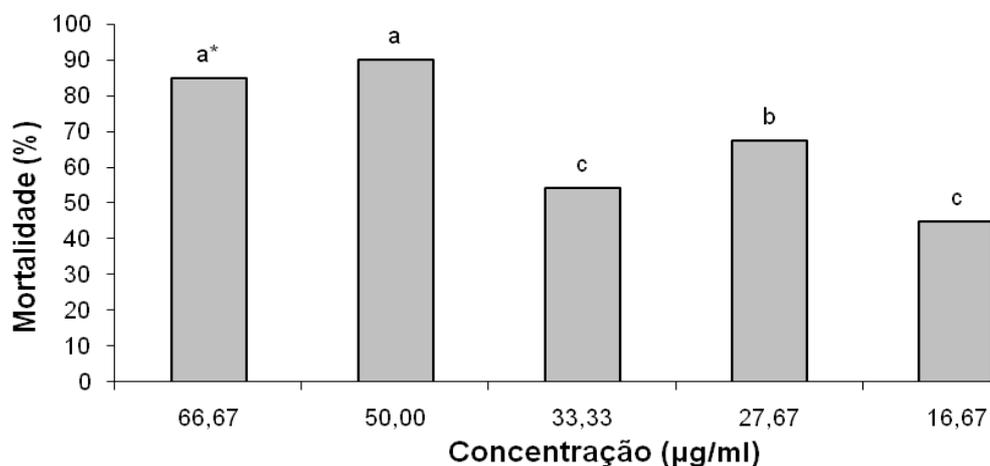


Figura 14: Mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* após 24h de exposição às diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do óleo essencial das folhas de *Croton linearifolius*. *médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste Duncan a 5 % de probabilidade.

O percentual de 100% de mortalidade em larvas de *A. aegypti* foi demonstrado por Dória *et al.* (2006), nos testes realizados com óleos essenciais das folhas do *C. heliotropiifolius*, na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, e do *C. pulegiodorus* com 1500 $\mu\text{g/mL}$, após 24h de observação. Silva *et al.* (2006), investigando a atividade larvicida dos óleos essenciais de *C. heliotropiifolius* e *C. pulegiodorus* em *A. aegypti* obtiveram resultados semelhantes.

Os resultados encontrados neste trabalho demonstraram que o óleo essencial das folhas do *C. linearifolius* apresenta maior atividade sobre as larvas de *Aedes aegypti* que os óleos essenciais das espécies testadas por Dória *et al.* (2006) e Silva *et al.* (2006), evidenciando o potencial inseticida da espécie estudada.

Lima-Accioly *et al.* (2006), também constataram que os óleos essenciais do *C. sonderianus*, *C. nepetaefolius* e *C. argyrophyloides* apresentam propriedade larvicida sobre o *A. aegypti*.

A concentração letal do óleo essencial de *C. linearifolius* para provocar a mortalidade de 50% (CL₅₀) e de 90% (CL₉₀) das larvas de *Aedes aegypti*, após 24h de observação, foi de 19, 990 µg/mL e 77, 311 µg/mL, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 2. Concentrações letais do óleo essencial das folhas de *Croton linearifolius* sobre larvas de *Aedes aegypti* em diferentes tempos de observação.

Tempo	CONCENTRAÇÃO LETAL (µg/mL)					
	CL ₁₀	Intervalo de confiança	CL ₅₀	Intervalo de confiança	CL ₉₀	Intervalo de confiança
4h	70,455	63,496-82,507	175,491	132,340-290,528	437,11	269,704-1046,256
8h	10,924	9,009-12,699	42,591	40,013-45,605	166,046	137,700-211,380
16h	5,759	4,318-7,178	23,845	21.871-25,665	98,730	85,4489-118,940
24h	5,169	3,852-6,479	19,990	18,077-21.715	77,311	68,596-90.004

A CL₅₀ do óleo estudado, para as larvas de *A. aegypti*, pode ser considerada eficiente pois, segundo Silva *et al.* (2004), trabalhos que evidenciaram o potencial larvicida de produtos de origem natural, propõem que substâncias que apresentam CL₅₀ variando entre 0,1 a 49 µg/mL são eficientes no controle do *A. aegypti*.

Concentrações letais abaixo de 49 µg/mL também foi observado por Vieira *et al.* (2009), que investigou diferentes espécies de *Croton* e obtiveram valores de CL₅₀ correspondentes a 37,28 µg/mL, 43,70 µg/mL e 51,88 µg/mL para o *C. jacobinensis*, *C. sincorensis* e *C. sp.*, respectivamente, e avaliou como promissores os resultados alcançados. Porto *et al.* (2008), também obtiveram valor de CL₅₀ equivalente a 20,9 µg/mL para o óleo essencial das folhas de *Anacardium humile* e evidenciaram que apresentou um alto potencial larvicida

Portanto, o valor de CL₅₀ encontrado neste trabalho, para o óleo essencial de *C. linearifolius*, sobre larvas de *A. aegypti*, corrobora com as observações feitas pelos os autores apresentados acima, demonstrando uma alta taxa de mortalidade das larvas em concentrações relativamente baixas do óleo essencial testado.

A atividade larvicida de óleos essenciais de espécies do gênero *Croton* contra larvas do *A. aegypti* também foi estudada por Silva (2006) que verificou valores de CL₅₀ acima de 49 µg/mL, sendo 158,81 µg/mL e 550,68 µg/mL para os óleos essenciais de *C. heliotropiifolius* e *C. pulegioidorus*, respectivamente. Furtado *et al.* (2005) encontraram CL₅₀ acima de 1000 µg/mL para óleos essenciais obtidos das folhas de 10 espécies diferentes de plantas. Os valores de CL₅₀ observados por Cavalcanti *et al.* (2004), para óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* (alfavaca), *Ocimum americanum* (manjeriço branco), *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta), *Cymbopogon citratus* (capim-limão) foram de 60 µg/mL, 67 µg/mL, 63 µg/mL e 69 µg/mL, respectivamente.

Para Porto *et al.* (2008), a utilização de produtos vegetais com propriedades inseticidas é extremamente eficaz, pois, devido a complexidade na sua composição química, produzem maior mortalidade nas larvas de insetos em concentrações mais baixas, diminuindo a possibilidade de aparecimento de populações resistentes e, geralmente, não são depositados no ambiente.

Os resultados obtidos para o *C. linearifolius* indicam que o óleo testado apresenta alta atividade frente às larvas de *A. aegypti*, podendo tornar-se uma alternativa viável, menos agressiva ao ambiente e à saúde humana do que os inseticidas sintéticos, caracterizando-se como um inseticida natural para o controle deste inseto.

A determinação da CL₅₀ de produtos e extratos vegetais é um fator favorável à comprovação da sua atividade larvicida, pois é importante para a verificação da dosagem mais econômica do produto investigado, que servirá de base para uma possível utilização no campo.

De acordo com Silva *et al.* (2004), a confirmação de que produtos obtidos a partir de espécies vegetais (extratos, óleos essenciais) tem efeito tóxico sobre o *A. aegypti* é muito vantajoso, do ponto de vista comercial, pois a viabilidade econômica para sua obtenção é maior do que para compostos puros.

Como não há relatos na literatura sobre o *C. linearifolius*, faz-se necessário o aprofundamento destes estudos, bem como a realização de outras pesquisas, que forneçam novas informações sobre esta espécie, a fim

de se ampliar os conhecimentos sobre sua constituição química e comprovação das suas propriedades biológicas.

Simas *et al.* (2004), consideram importante a realização de estudos que investiguem a relação entre a estrutura dos constituintes químicos e sua atividade biológica, e ressaltam que, embora existam relatos na literatura mostrando a atividade inseticida de óleos essenciais, há poucas informações sobre essa relação.

Pesquisas relacionadas à toxicidade do óleo essencial do *C. linearifolius* para a espécie humana também são essenciais, uma vez que, segundo Veiga Júnior (2003), a ausência de toxicidade frente a mamíferos e animais superiores são uma das propriedades que devem estar associadas à atividade de determinada substância, para ser qualificada como inseticida.

Como se trata de um estudo pioneiro, pesquisas multidisciplinares poderão contribuir para o processo de validação científica da utilização do *Croton linearifolius* como inseticida natural. Souza *et al.* (2006), ressaltam que *C. cajucara* tem sido a espécie mais estudada do gênero *Croton*, com cerca de 60 artigos publicados e, segundo Maciel *et al.* (2006), isso só está sendo possível devido aos trabalhos multidisciplinares que estão sendo desenvolvidos com esta espécie.

Como o *C. linearifolius* é reconhecido popularmente por seu efeito inseticida, de acordo com um levantamento etnobotânico realizado por Silva *et al.* (2010), pesquisas que comprovem sua eficiência como inseticida natural trarão contribuições significativas para a população que faz uso desta planta.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os principais constituintes químicos encontrados no óleo essencial obtido das folhas de *Croton linearifolius* foram os sesquiterpenos β -cariofileno (20,63%), β -copaen-4- α -ol (16,48%), óxido de cariofileno (12,64%) e δ -guaiene (10,95%), correspondendo a 49,75% da composição do óleo.

A CL₅₀ do óleo essencial das folhas de *C. linearifolius* foi 19, 990 μ g/mL e a CL₉₀ 77, 311 μ g/mL, mostrando-se ativo contra as larvas de terceiro *ínstar* de *Aedes aegypti*. Os resultados indicaram a potencialidade do óleo essencial das folhas do *C. linearifolius* contra as larvas de *A. aegypti*, em condições laboratoriais.

Devido à carência de informações sobre o *C. linearifolius* na literatura, evidencia-se a necessidade de novas pesquisas que visam investigar a composição química, as atividades biológicas, a toxicidade e o potencial para utilização comercial de produtos e extratos obtidos a partir desta espécie.

Este trabalho fornece subsídios para a descoberta de inseticidas naturais, que poderão ser utilizados no combate ao *Aedes aegypti*, através da comprovação do potencial inseticida de espécies vegetais usadas tradicionalmente com esta finalidade, visando o desenvolvimento de produtos que ofereçam menos riscos ao ambiente e à saúde da população, contribuindo, também, para a preservação e uso sustentável dos recursos naturais.

6. REFERÊNCIAS

AHARONI, A.; JONGSMA, M.A.; KIM, T.Y.; MAN-BOK, R.I.; GIRI, A.P.; VERSTAPPEN, F.W.A.; SCHWAB, W.; BOUWMEESTER, H.J. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. **Phytochemistry Reviews**, v.5, 2006.

ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de Caatinga no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta Bot. Bras**, v 01, 2002.

ALONSO, J. **Fitomedicina**: curso para profissionais da área de saúde. São Paulo:Pharmabooks, 2008

ALVES, H.M. A diversidade química das plantas como fontes de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v.3, 2001.

AMER, A.; MEHLHORN, H. Larvicidal effects of various essential oils against Aedes, Anopheles and Culex larvae (Diptera, Culicidae). **Parasitology Research**, v 99, 2006.

ANGÉLICO, E.C.; da COSTA, J.G.M.; GALVÃO, F.F.R.; SANTOS, F.O.; RODRIGUES, O.G. Composição química do óleo essencial das folhas de *Croton Heliotropiifolius* KANT (Sinônimo *C. Rhamnifolius*): resultados preliminares. **Revista de Biologia e Farmácia**, v 07, n 01, 2012.

ANGÉLICO, E.C.; COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, O.G.; LIMA, E.Q.; MEDEIROS, R.S. Composição química do óleo essencial das folhas de *Croton blanchetianus* (Baill): Resultados Preliminares. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 05, 2011.

AZEVEDO, M.M.B. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais de *Croton cajacara* Benth. e *Croton sacaquinha* Croizat. E obtenção de seus componentes bioativos. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) Instituto de Química-Universidade Federal de Rio de Janeiro, 2010.

BARRETO, C.F. Resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, Goiás, v.1, n.2, 2005.

BERRY, P.E.; HIPPI, A.L., WURDACK, K.J.; VAN EE, B.W.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto). **American Journal of Botany**, v 92, 2005.

BESERRA, E.B. *et al.* Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. **Neotropical Entomology**, v 35, 2006.

BESERRA, E.B.; DE FREITAS, E.M.; DE SOUZA, J.T.; FERNANDES, C.R.M.; SANTOS, K.D. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. *Iheringia, Sér. Zool.*, Porto Alegre, 99(3):281-285, 30 de setembro de 2009.

BISSET, J.A. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v.54, 2002.

BOUVIER, F.; RAHIER, A.; CAMARA, B. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 44, 2005.

BRASIL – Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica/Fundação Nacional de Saúde, Brasil, 2002.

BRUNETTON, J. **Farmacognosia: Fitoquímica Plantas Medicinalés**. Zaragoza: Acribia, 2011

CARMO, E. S.; LIMA, E.O.; SOUZA, E. L. The potential of *Origanum vulgare* L. (lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related aspergillus species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v 39, 2008.

CASTRO, H.G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Metabólitos Secundários**. 2. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2005

CAVALCANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M. DE; LIMA, M. A. A.; SANTANA, E.W.P. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v 99, 2004.

CHINO, I. B.; ROUSSIS, V.; PERDETZOGLU, D.; LOUKIS, A. Chemical and biological studies on two *Helichrysum* species of Greek origin. **Planta Médica**, v. 62, 1996.

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

COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G.; ANGÉLICO, E.C.; PEREIRA, C.K.B.; SOUZA, E.O.; CALDAS, G.F.R.; SILVA, M.R.; SANTOS, N.K.A.; MOTA, M.L.; SANTOS, P.F. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, 2008.

CRAVEIRO, A.A.; RODRIGUES, A.S.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L.; MACHADO, M.I.L. Volatile constituents of brazilian. Euphorbiaceae. Genus *Croton*. **J.Nat. Prod.** v. 44, 1981.

D'AMATO, C; TORRES, J.P.M; MALM, O. DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): Toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. **Química. Nova**, v 25, 2002.

DONALÍSIO, M.R.; GLASSER, C. M. Vigilância entomológica e controle de vetores do Dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.5, 2002.

DÓRIA, G.A.A.; SILVA, W.J.; MARÇAL, R.M. Atividade larvicida de óleos essenciais de plantas contra as larvas do *Aedes aegypti*. In: Reunião Anual da SBPC, 2006, Florianópolis, SC. **Anais...** Florianópolis, SC, 2006.

DUBEY, V.S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **J. Biosci**, v. 28, 2003.

FARAH, A.; DONÂNGELO, C.M. Compostos fenólicos em café. **Braz. J. Plant Physiol.** [online], v.18, 2006.

FERRARI, J.A. Insecticide resistance In: **The Biology of Disease Vectors**, University Press of Colorado, 1996.

FORATTINI, O.P. **Culicidologia médica**. São Paulo: Edusp, 2002.

FREITAS, J.V.B.; GOMES, C.L.; VIEIRA, M.G.S.; QUEIROZ, V.A.; NETO, A.C.; GRAMOSA, N.V. Constituintes, químicos voláteis das folhas de *Croton muscicapa* Mull. Arg. In: Congresso Brasileiro de química, 2010. **Resumo...**, 2010.

FUNASA. Direção do Centro Nacional de Epidemiologia, 2001.

FURTADO, R.F.; LIMA, M.G.A.; ANDRADE NETO, A.; BEZERRA, J.N.S.; SILVA, M.G.V. Atividade Larvicida de Óleos Essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v 34, 2005.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTIST, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002.

GERSHENZON, J; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, v 3, 2007.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; DI CESARE MANNELLI, L.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene. **II Farmaco**, v.56, 2001

GOUINGUENÉ, S.P.; TURLINGS, T.C.J. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. **Plant Physiology**, v. 129, 2002.

HAN, Y. Ginkgo terpene component has an anti-inflammatory effect on *Candida albicans*-caused arthritic inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 1049-1056, 2005.

HENRIQUES, A.T.; SIMÕES-PIRES, C.; APEL, M.A. Principais aspectos químicos e biológicos dos terpenos. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: UNIVALI Editora, 2009.

HOMBACH, J. Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages. **Revista Panamericana de Salud Pública** **21(4)**: 254-260, 2007

HUMMELBRUNNER, L. A.; ISMAN, M. B.; Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the *Tobacco cutworm*, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, 2001.

ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v 51, 2006.

JACOBSON, M. **Glossary of Plant-Derived Insect Deterrents**, CRC Press: Boca Raton., 1990

LIMA-ACCIOLY, P.M.; LAVOR-PORTO, P.R.; CAVALCANTE, F.S.; MAGALH LAHLOU, S.; MORAIS, S.M.; LEAL-CARDOSO, J.H. Essential oil of *Croton nepetaefolius* and its main Constituent, 1,8-cineole, block excitability of rat Sciatic nerve in vitro. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, 2006.

LIMA, M.G.A.; MAIA, I.C.C.; SOUSA, B.D.; MORAIS, S.M.; FREITAS, S.M. Effect of stalk and leaf extracts from *Uphorbiaceae* species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. **Revista Instituto Medicina Tropical**, v. 48, 2006.

LÓPEZ, C.A.A Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, v.1, 2006.

LOZOVEI, A. L. Culicídeos (mosquitos), p. 59-104. In: Marcondes, C. B. (ed.). **Entomologia Médica e Veterinária**. Editora Atheneu, 432 p., 2001.

LUNA, J.E.D, MARTINS, M.F, ANJOS, A,F, KUWABARA, E.F, NAVARRO-SILVA, M.A. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v 38, 2004.

MACIEL, M.A.M. PINTO, A.C., VEIGAS Jr, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, 2002.

MACIEL, M.A.M. CASTRO-DANTAS, T.N.; CÂMARA, J.K.P.; PINTO, A.C.; VEIGS Jr. Pharmacological and biochemical profiling of lead compounds from traditional remedies: the case of *Croton cajucara*. **Advences in Phytomedicine**, v. 2, 2006.

MACORIS, M.L.G; ANDRIGHETTI, M.T.M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C.M.; GARBELOTO, V.C.; BRACCO, J.E. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v 98, 2003.

MATOS, L.M.M. **Química de espécies nativas de *Croton* L. (Euphorbiaceae)** 2011. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Botânica) Instituto de Biociências- Universidade de São Paulo, 2011.

MECCIA, G.L.B.; ROJAS, C.; ROSQUETE, C.; SAN FELICIANO, A. Essencial oil of *Croton ovolifolius* Vahl from Venezuela. **Journal Flavour and Fragrance**, v 15, 2000.

MENEZES, E.L.A. **Inseticidas botânicos: Seus Princípios Ativos, Modo de Ação e Uso Agrícola**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, Rio de Janeiro, 2005.

Ministério da Saúde. Brasília. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico da dengue. Semanas de 1 a 7 de 2011: [27 páginas]. Disponível em: portal.saude.gov.br/.../informe_epidemiologico_semana_1_a_7_09_revisado, 2011. Acesso em: 28/01/2011.

MORAIS, S.M.; CATUNDA JÚNIOR, F.E.A.; SILVA, A.R.A.; MARTINS NETO, J.S. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Químca Nova** [online], v 29, 2006.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, v 64, 2002.

NAVARRO-SILVA, M.A.; MARQUES, F.A.; DUQUE, J.E.L. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae. **Revista Brasileira de Entomologia**, v 53, 2009.

NIERO, R.; MALHEIROS, A. Principais aspectos químicos e biológicos dos terpenos. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: UNIVALI Editora, 2009.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control**. Washington. Publicação Científica n.º 548, 1995.

PALMEIRA-JR, R.S.F.; ALVES, F.S.M.; VIEIRA, L.F.A.; CONVERSA, L.M.; LEMOS, R.P.L. Constituintes químicos das folhas de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 16, 2006.

PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S.; DA CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v 11, 2007.

PAUMGARTTEN, F.J.R. Avaliação de risco de substâncias químicas: O elo entre a toxicologia e a saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, v 9, 1993.

PEREIRA F.J., MARTINS F.T., CORRÊA R.S., MOREIRA M.E.C., COSTA A.M.D.D., DOS SANTOS M.H., POLO M. & BARBOSA L.C.A. Isolamento, Composição Química e Atividade Anti-inflamatória do Óleo Essencial do Pericarpo de *Copaifera langsdorffii* Desf. de acordo com Hidrodestilações Sucessivas. **Latin American Journal of Pharmacy**, v 27, 2008.

PERIAGO, M.R.; GUZMÁN, M.G. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v 21, 2007.

POHLIT, A.M.; QUIGNARD, E.L.J.; NUMOMURA, S.M.; TADEII, W.P.; HIDALGO, F.A.; PINTO, A.C.S. Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. **Acta Amazônica**, v. 34, 2004.

POLANCZYK, R.A; GARCIA, M.O.; ALVES, S.B. Potencial de *Bacillus thuringiensis Berliner* no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, v 37, 2003.

PORTO, A.R.R.; SILVA, M.M.; COELHO, R.M.; SCHELEDER, E.J.D.; JELLER, A.H. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, 2008.

RAJENDRAN, S.; SRIRANJINI, V. Plant products as fumigants for stored-product insect control. **Journal of Stored Products Research**, v. 44, 2008.

RAJKUMAR, S.; JEBANESAN, A. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd) M. Roam. (Rutaceae) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v 13, 2010.

RALUDOVIC, N.; MANANJARASOA, E.; HARINANTENAINA, L.; YOSHINORI, A. Essential oil composition of four *Croton* species from Madagascar and their chemotaxonomy. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 34, 2006.

RANDAU, K.P.; FLORÊNCIO, D.C.; FERREIRA, C.P.; XAVIER, H.S. Estudo farmacognóstico de *C. rhamnifolius* H.B.K e *C. rhamnifolioides* Pax & Hoffms (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 14, 2004.

RAVEN, F.H.; EVERT, R.T.; CURTIS, H. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 2001.

REGNAULT-ROGER, C. The potencial of botanical essential oils for insect pest control. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 2, 1997.

RESTELLO, R.M.; MENEGATT, C.; MOSSI, A.J. Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, 2009.

REZENDE, G. L., A. J. MARTINS, C. GENTILE, L. C. FARNESI, M. PELAJO-MACHADO, A. A. PEIXOTO; D. VALLE. Embryonic dessication resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized Serosal Cuticle. **BMC Developmental Biology** 8: 82. 2008.

ROBBINS, R.J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, 2003.

ROCHA, M.E.N.; SANTOS, C.L. O uso comercial e popular do Eucalipto *eucalyptus Globulus* Labill- Myrtaceae. **Revista Duque de Caxias**, v 2, 2007.

ROCHA. F.F.; NEVES, E.M.N.; COSTA, E.A.; MULLER, A.H. GUILHON, G.M.S.P.; CORTES, W.S.; VANDERLINDE, F.A.. Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory effect of *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, 2008.

ROCHA, R.B.; MARQUES, E.J.; LOPES, R.M.; SILVA, C.C.; PASSOS, E.M.; VALENTE, E.C. Distribuição do pulgão *Lipaphis erysimi* e determinação da Concentração Letal CL50 do isolado URPE 24 de *Lecanicillium muscarium* sobre a praga. In: IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2009, UFRPE/Recife. **Resumo expandido...**, Recife, 2009

ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. Universidade Católica Dom Bosco. **Revista Internacional de Desenvolvimento**, v 1, 2001.

ROTHMAN, A.L. Dengue: deinig protective versus pathologic immunity. **J Clin Invest** 113: 946-951, 2004.

RIOS, G.F.P.; ARRUDA-FILHO, J.F.; REIS-JÚNIOR, G.; OLIVEIRA, H.M.F.; CARMO, T.N.N.; MORAIS, C.G.P.; SÁ-NETO, R.J.. Estrutura da comunidade de morcegos mammalia: chiroptera) da floresta nacional contendas do sincorá – BA. In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de, Caxambu – MG, 2007. **Anais...**Caxambu – MG, 2007.

SANTOS, A.S.; ALVES, S.M.; FIGUEIRÊDO, F.J.C.; ROCHA NETO, O.G. Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. Comunicado Técnico 99/EMBRAPA, 2004.

SANTOS, R.P.; NUNES, E.P.; NACIMENTO, R.F.; SANTIAGO, G.M.P.; MENEZES, G.H.A.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Cordia leucomalloides* and *Cordia*

curassavica form the Northeast o Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, 2006.

SANTOS, M.R.A.; LIMA, R.A.; SILVA, A.G.; FERNANDES, C.F.; LIMA, D.K.S., SALLET, L.A.P.; TEIXEIRA, C.A.D.; FACUNDO, V.A. **Atividade inseticida do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre *Acanthoscelides obtectus* Say e *Zabrotes subfasciatus* Boheman**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2007.

SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G. 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**, v. 32, 1999.

SILVA, H.H.G. DA; SILVA, I.G. DA; SANTOS, R.M.G. DOS; FILHO, E.R.; ELIAS, C.N. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v 37, 2004.

SILVA, W.J. **Atividade larvicida do óleo essencial de plantas existentes no estado de sergipe contra *Aedes aegypti*** Linn. Dissertação Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) Universidade Federal de Sergipe, 2006.

SILVA, W.J.; DORIA, G.A.A.; MAIA, R.T.; NUNES, R.S.; CARVALHO, G.A.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; MARÇAL, R.M.; CAVALCANTI, S.C.H. Effects of essential oil on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, 2008.

SILVA, S.L.C.; CAEVALHO, M.G.; GUALBERTO, S.A.; CARNEIRO-TORRES, D.S.; VASCONCELOS, K.C.F.; OLIVEIRA, N.F. Bioatividade do extrato etanólico do caule de *Croton linearifolius* MULL. ARG. (EUPHORBIACEAE) sobre *Cochliomyia macellaria* (DIPTERA:CALLIPHORIDAE). **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, 2010.

SIMAS, N.K; LIMA, E.C.; CONCEIÇÃO, S.R.; KUSTER, R.M.; FILHO, A.M.O. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myrozylonbalsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química. Nova** 27, v. 46, 2004.

SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre, ED.UFRGS, 2007.

SOARES, B.V. **Estudo fitoquímico e antifúngico de extratos de plantas contra *Microsporium canis* e *Cândida spp.* Isolado de cães** 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade, 2008.

SOUZA, M.A.A.; SOUZA, S.R.; VEIGA Jr., CORTEZ, J.K.P.C.; LEAL, R.S.; DANTAS, T.N.C.; MACIEL, M.A.M. Composição química do óleo fixo de *Croton*

cajucara e determinação das suas propriedades fungicidas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 16, 2006.

SPITZER, A. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. (Eds.), **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004,

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artemed: 2009.

TAUIL, P.L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, 2006.

TEIXEIRA, M.C.L.; TEUSCHER, E. **Pharmazeutische biologie**. Braunschweig: Vieweg, 1990.

TORRES, M.C.M. Estudo **Químico e Biológico de *Croton regelianus* Var *matosii* (Euphorbiaceae)**. 2008. 8p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Federal do Ceará, 2008.

TORRICO, F.; CEPEDA, M.; GUERRERO, G.; MELENDEZ, F.; BLANCO, Z.; CANELÓN, D.J.; DIAZ, B.; COMPAGNONE, R.S.; SUÁREZ, A.I. Hypoglycaemic effect of *Croton cuneatus* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 1, 2007.

TRENTINI, A. M. M.; TESKE, M. **Herbarium compêndio de fitoterapia**. Curitiba: Herbarium Lab. Bot., 2001.

WANNES, W.A.; MHAMDI, B.; SRITI, J.; JEMIA, M.B.; OUCHIKH, O.; HAMDAR, G.; KCHOUK, M.E.; MARZOU, B. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**, v 48, 2010.

WEBSTER, G.L.A Provisional Synopsis of the Sections of the Genus *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon**, v 42, 1993.

VENDRAMIM, J.D.; CASTIGLIONI, E. Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas. In: QUEDES, J. C.; COSTA, I. D.; CASTIGLIONI, E. **Bases e técnicas do manejo de insetos**, Santa Maria: UFSM/CCR/DFS, 2000.

VIEGAS JR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química. Nova**, v 26, 2003.

VIEIRA, P.R.N.; BEZERRA, F.H.Q.; PEREIRA, D.S.; MORAIS, S M.; DIAS, P.M.D. Avaliação do potencial larvicida dos óleos essenciais de *Croton* do nordeste do Brasil. In: 49º CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2009. Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Universidade Federal de Porto Alegre, 2009.

VUNDA, S.L.L. **Estudo químico e biológico de espécies de *Croton* (Euphorbiaceae) nativas do Rio Grande do Sul.** 2011. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

VIZZOTO, M.; KROLOW,C.; WEBER, G.E.B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância.** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.

WHO - World Health Organization. Dengue/dengue haemorrhagic fever. 1999 [acessado 2012 set 06]. páginas: 27. Disponível em: <http://www.searo.who.int/LinkFiles/DengueGuideline-dengue>.

World Health Organization. Dengue bulletin: A Situation of dengue/dengue haemorrhagic fever in SEA countries, 2004.

ZHENG, G.Q.; KENNY, P.M.; LAM, L.K.T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryphyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal Natural Product**, v. 55, 1992.