



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS

**Avaliação do potencial inseticida das folhas de *Croton argyrophyllus*
(Euphorbiaceae) sobre o *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e
toxicológica sobre *Mus musculus* (Rodentia: Muridae)**

Rômulo Carlos Dantas da Cruz

Itapetinga-Bahia
Fevereiro- 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

**Avaliação do potencial inseticida das folhas de *Croton argyrophyllus*
(Euphorbiaceae) sobre o *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e
toxicológica sobre *Mus musculus* (Rodentia: Muridae)**

Autor: Rômulo Carlos Dantas da Cruz

Orientadora: Dra. Sandra Lúcia da Cunha e Silva

Co-orientadora: Dra. Simone Andrade Gualberto

**“Dissertação apresentada, como parte das exigências
para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS, no Programa de Pós-Graduação em
Ciências Ambientais da Universidade Estadual do
Sudoeste da Bahia - Área de concentração: Meio
Ambiente e Desenvolvimento”**

Itapetinga-Bahia
Fevereiro- 2016

632.951 Cruz, Rômulo Carlos Dantas da.
C964a Avaliação do potencial inseticida das folhas de *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae) sobre o *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e toxicológica sobre *Mus musculus* (Rodentia: Muridae) / Rômulo Carlos Dantas da Cruz. - Itapetinga: UESB, 2016.
61f.

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Área de concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento. Sob a orientação da Prof^ª. D. Sc. Sandra Lúcia da Cunha e Silva e co-orientação da Prof^ª. D. Sc. Simone Andrade Gualberto.

1. Fitoquímica. 2. Dengue - Inseticidas botânicos. 3. Toxicologia. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. II. Silva, Sandra Lúcia da Cunha. III. Gualberto, Simone Andrade. IV. Título.

CDD (21): 632.951

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Fitoquímica
2. Dengue - Inseticidas botânicos
3. Toxicologia

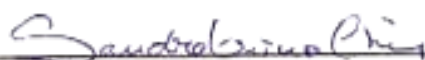
RÔMULO CARLOS DANTAS DA CRUZ

"AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INSETICIDA DAS FOLHAS DE CROTON ARGYROPHYLLUS (EUPHORBIACEAE) SOBRE O AEDES AEGYPTI (DIPTERA: CULICIDAE) E TOXICOLÓGICA SOBRE MUS MUSCULUS (RODENTIA: MURIDAE)."

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *Campus* de Itapetinga, BA. Área de Concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento.

Aprovada em: 12/02/2016

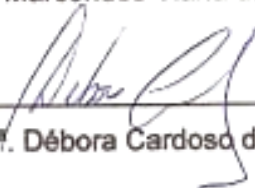
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Sandra Lúcia da Cunha e Silva (Orientadora/UESB)



Prof. Dr. Marcondes Viana da Silva (UESB)



Prof.^a Dr.^a Débora Cardoso da Silva (UESB)

Dedico este trabalho a Deus, por seu amor infinito e me fornecer saúde, fé, força e coragem para chegar ao final de mais uma etapa; a minha avó Nair Marques dos Santos, aos meus pais José Carlos Marques da Cruz e Maria de Fátima Dantas Brito e ao meu irmão Thiago Dantas Cruz, pelo amor e por estarem sempre ao meu lado transmitindo todo apoio, paz e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e por permanecer ao meu lado durante todos os momentos difíceis e felizes, sempre guiando meus passos e iluminando meus caminhos.

A minha avó, Nair Marques dos Santos, aos meus pais José Carlos Marques da Cruz e Maria de Fátima Dantas Brito e ao meu irmão Thiago Dantas da Cruz, pelo amor incondicional e por estarem sempre presentes em todas as etapas da minha vida, fornecendo todo apoio nos estudos, com muito amor, paz e carinho.

A minha família, pelo carinho e amor que me foram oferecidos desde sempre destacando a minha prima Emiliana Cruz Neves, pelos incentivos e conselhos, assim como, aos meus avôs, Hermínio Balisteiro da Cruz (*in memoriam*), Abel Fernandes de Brito e Santana Alves Dantas, pelas orações e cuidados fornecidos.

Agradeço especialmente e carinhosamente a Karine da Silva Carvalho pelo amor, carinho e por estar sempre presente, seja nos momentos alegres ou difíceis e por todo o apoio ao longo da minha jornada acadêmica. Obrigado por fazer parte da minha vida!

Agradeço carinhosamente à orientadora Profa. Dra. Sandra Lúcia da Cunha e Silva pela amizade, por compartilhar seus conhecimentos e por toda dedicação, contribuindo assim, desde a graduação, para minha formação profissional e pessoal. Obrigado pela gentileza!

A co-orientadora Profa. Dra. Simone Andrade Gualberto, pelo apoio nos trabalhos e valiosos ensinamentos, os quais foram de grande importância para esse estudo.

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), que tem contribuído para o meu conhecimento acadêmico.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, pela oportunidade de realização do mestrado e motivação à pesquisa científica.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa de estudo e apoio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, pela dedicação e pelos conhecimentos transmitidos, e aos coordenadores e secretários (a) do Programa pelo carinho e toda atenção.

Aos meus colegas do Laboratório de Pesquisa de Inseticidas Naturais (LAPIN), pela amizade, companheirismo e colaboração no desenvolvimento dos trabalhos.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LAPRON), especialmente a Matheus Andrade e Manuela Trindade pela amizade e inúmeros auxílios prestados.

A professora Dra. Débora Cardoso pela amizade, atenção e carinho, assim como pelo convite para a apresentação de palestras, as quais foram de grande importância para minha formação acadêmica.

A Antonio Correia Freire, pela amizade e auxílios prestados durante as coletas dos materiais botânicos, e aos gestores da Floresta Nacional Contendas do Sincorá, pelo apoio na realização das atividades de campo.

Agradeço imensamente a Profa. Dra. Ivone Antonia de Souza pelo carinho, receptividade e orientação na realização dos ensaios de toxicidade. Grato também por disponibilizar o Laboratório de Ensaios Toxicológicos da (UFPE) para a realização dos testes e, a toda sua equipe de laboratório, especialmente a Mateus Nascimento e Laíse Figueira, pela atenção e auxílios prestados na realização dos ensaios e ao Dr. Eduardo Henrique Ramos, pelas contribuições nas práticas laboratoriais.

Ao Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho e a Frances Regiane dos Santos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pelos auxílios prestados no que diz respeito às análises químicas do óleo essencial.

Aos meus colegas de república, Matheus Andrade Rocha Costa e Aída Magdala Andrade Rocha Costa, pela amizade, compreensão e por representarem a minha família.

A banca examinadora pela amizade, por vir a contribuir com sugestões construtivas de grande relevância para a redação conclusiva desse trabalho e pela disposição.

Aos colegas de curso, em especial a Arthur Sampaio Cardoso Lima, Quesia Santos Amorim, Daiana Nolasco Moreira Fernandes, Carla Silva Santos e Marcos Vinícius Nogueira Damasceno pelo companheirismo.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae), (Linnaeus, 1762): Taxonomia e Morfologia	5
2.1.2 Ciclo de vida	8
2.1.3 Importância epidemiológica e controle do <i>Aedes aegypti</i>	10
2.2 A Caatinga, a produção de metabólitos secundários e o controle do <i>Aedes aegypti</i> ...13	
2.3 Óleos essenciais: bioatividade e toxicidade sobre <i>Mus musculus</i>	16
2.4 <i>Croton argyrophyllus</i> (Kunth, 1817) (Euphorbiaceae)	18
CAPÍTULO 1	21
INTRODUÇÃO	22
MATERIAL E MÉTODOS	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
CONCLUSÃO	26
AGRADECIMENTOS	26
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 2	29
INTRODUÇÃO	29
MATERIAIS E MÉTODOS	32
Material vegetal	32
Extração e rendimento do óleo essencial	32
Análise química do óleo essencial	32
Ensaio biológicos	33
Avaliação da atividade aduicida e larvicida	33
Avaliação da atividade toxicológica sobre <i>Mus musculus</i>	34

RESULTADOS	35
DISCUSSÃO	41
CONCLUSÃO	47
AGRADECIMENTOS	47
CONFORMIDADE COM AS NORMAS ÉTICAS	47
CONFLITO DE INTERESSE	47
REFERÊNCIAS	47
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE TABELAS

		Páginas
CAPÍTULO 1	21
Tabela 1.	Percentual de mortalidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> , em relação ao tempo de exposição aos diferentes extratos aquosos obtidos a partir das folhas secas de <i>Croton argyrophyllus</i>	25
CAPÍTULO 2	29
Tabela 1.	Concentração letal 50 e 90 do óleo essencial obtido das folhas de <i>Croton argyrophyllus</i> , sobre larvas de terceiro e quarto instar do <i>Ae. aegypti</i> , em relação a hora de exposição.....	35
Tabela 2.	Concentração letal 50 e 90 do óleo essencial obtido das folhas de <i>Croton argyrophyllus</i> , sobre fêmeas adultas do <i>Ae. aegypti</i> , em relação a hora de exposição.....	36
Tabela 3.	Monoterpenos e sesquiterpenos identificados no óleo essencial das folhas de <i>Croton argyrophyllus</i>	36
Tabela 4.	Efeitos comportamentais e mortalidade em camundongos administrados intraperitoneal e oralmente com óleo essencial obtido das folhas de <i>Croton argyrophyllus</i> , em relação às diferentes dosagens.	37

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Morfologia geral da larva do <i>Aedes aegypti</i>	6
Figura 2. Morfologia geral da pupa do <i>Aedes aegypti</i>	7
Figura 3. Adulto macho e fêmea do <i>Aedes aegypti</i>	7
Figura 4. Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	8
Figura 5. Aspecto geral de <i>Croton argyrophyllus</i> (A); folhas da planta (B).....	20
 CAPÍTULO 2.	 29
 Figura 1. Peso médio dos camundongos fêmeas que foram administrados com o óleo essencial obtido das folhas de <i>Croton argyrophyllus</i> na dose de 2000 mg kg ⁻¹ (A), 300 mg kg ⁻¹ (B), 50 mg kg ⁻¹ (C), 5 mg kg ⁻¹ (D) e o grupo controle (E) via oral (VO) e intraperitoneal (IP).....	 40

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BLU	Base Livre de Umidade
CDB	Convenção sobre Diversidade Biológica
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal
CG/DIC	Cromatografia Gasosa/Detector por Ionização e Chama
CG/EM	Cromatografia Gasosa/Espectometria de Massas
CL	Concentração Letal
CNCFlora	Centro Nacional para a Conservação da Flora
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DL	Dose Letal
FAPESB	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
HUEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
LAFICAVE	Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes e Vetores
LAPIN	Laboratório de Pesquisa de Inseticidas Naturais
LAPRON	Laboratório de Produtos Naturais
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
ONU	Organização das Nações Unidas
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
WHO	World Health Organization

RESUMO

CRUZ, R. C. D. **Avaliação do potencial inseticida das folhas de *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae) sobre o *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e toxicológica sobre *Mus musculus* (Rodentia: Muridae).** Itapetinga - BA: UESB, 2016. 61p. (Dissertação – Mestrado em Ciências Ambientais – Área de Concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento)*

O *Aedes aegypti* possui grande importância epidemiológica, por ser o principal vetor do vírus da dengue. Com vistas a contribuir com o controle desse vetor, a busca por inseticidas botânicos mais seletivos e menos impactantes para o ambiente e a saúde humana, tem sido intensificada. Assim, objetivou-se avaliar a toxicidade de extratos aquosos e do óleo essencial das folhas de *Croton argyrophyllus* sobre o *Aedes aegypti*, bem como realizar a análise química e a toxicidade aguda do óleo essencial sobre *Mus musculus*. Foram avaliados os extratos aquosos das folhas frescas e secas, obtidos pelos métodos de maceração e infusão, assim como o hidrolato e o resíduo aquoso, subprodutos do processo de extração do óleo essencial por hidrodestilação. Para a realização dos ensaios larvicidas com os extratos aquosos foram utilizadas 30 larvas de terceiro e quarto instar por repetição, as quais foram expostas a concentração de 100% (v/v) dos extratos. Para o óleo essencial, também foram utilizadas 30 larvas por repetição e submetidas às concentrações de 4,3; 2,1; 1,0; 0,5 e 0,3 mg mL⁻¹. Com relação ao ensaio adulticida do óleo essencial, foram utilizadas 20 fêmeas por repetição. As fêmeas foram expostas às concentrações de 20,0; 10,0; 5,0; 2,5 e 1,2 mg mL⁻¹. Na determinação da toxicidade aguda utilizou-se fêmeas de camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), entre 90 e 120 dias de idade, submetidas as dose de 2000, 300, 50 e 5 mg kg⁻¹. Para a análise química do óleo essencial foi utilizado o CG/EM e CG/DIC. Com relação ao resíduo aquoso e o hidrolato, obtidos das folhas secas, com 24 horas de exposição ocasionaram 53,3% e 52,5% de mortalidade das larvas de *Ae. aegypti*, respectivamente, sendo significativamente mais tóxicos quando comparados aos demais extratos aquosos. O óleo essencial foi tóxico para as larvas do *Ae. aegypti*. As menores concentrações letais 50 e 90 foram 0,31 e 0,70 mg mL⁻¹ respectivamente, com 16 horas de exposição. O óleo essencial também teve efeito tóxico para as fêmeas adultas do *Ae aegypti* e as menores CL₅₀ e CL₉₀ foram 5,92 e 8,94 mg mL⁻¹ respectivamente, com 72 horas de exposição. A avaliação da toxicidade aguda intraperitoneal apresentou uma média toxicidade DL₅₀ = 2000 mg kg⁻¹ e a toxicidade aguda oral ausência de toxicidade DL₅₀ = 2500 mg kg⁻¹. Os componentes majoritários do óleo essencial foram espatulenol (22,80%), (E) cariofileno (15,41%), α -pineno (14,07%) e biciclogermacreno (10,43%). O hidrolato e o resíduo aquoso, obtidos das folhas secas de *C. argyrophyllus*, apresentam efeito tóxico sobre as larvas do *Ae. aegypti*, o que não ocorre com os diferentes extratos obtidos a partir das folhas frescas. O óleo essencial é tóxico para o *Ae. aegypti*, necessitando de uma concentração letal média bem inferior a dose letal média necessária para ocasionar a toxicidade aguda.

Palavras-chave: Fitoquímica, Inseticidas botânicos, Dengue, Toxicologia

*Orientadora: Sandra Lúcia da Cunha e Silva, D.Sc. UESB e Co-orientadora: Simone Andrade Gualberto, D.Sc. UESB.

ABSTRACT

Evaluation of insecticide potential of the leaves of *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae) on the *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and Toxicology on *Mus musculus* (Rodentia: Muridae)

The *Aedes aegypti* has great epidemiological importance, for being the main vector of the dengue virus. In order to contribute to the control of this vector, the search for botanical insecticides more selective and less impactful to the environment and human health has been intensified. Thus, the objective of assessing the toxicity of aqueous extracts and essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus* about *Ae. aegypti*, as well as perform chemical analysis and acute toxicity of essential oil on *Mus musculus*. We evaluated the aqueous extracts of fresh and dried leaves, obtained by maceration and infusion methods, as well as the high grade and aqueous waste, by-products of the extraction process of the essential oil for hidrodestilação. For the carrying out of the trials Larvicides with the aqueous extracts were used 30 third and fourth instar larvae by repetition, which were exposed to concentration of 100% (v/v) of the extracts. For the essential oil, were also used 30 larvae for repetition and subject to concentrations of 4.3; 2.1; 1.0; 0.5 and 0.3 mg mL⁻¹. With respect to the adulticida test of essential oil, 20 females were used for repetition. Females were exposed to concentrations of 20.0; 10.0; 5.0; 2.5 and 1.2 mg mL⁻¹. In the determination of acute toxicity used female albino Swiss mice (*Mus musculus*), between 90 and 120 days of age, submitted the dose of 2000, 300, 50 and 5 mg kg⁻¹. For the chemical analysis of the essential oil was used the GC/MS and GC/DIC. With respect to the aqueous residue and high grade, obtained from dried leaves, with 24 hours of exposure caused 53.3% and 52.5% mortality of the larvae of *Ae. aegypti*, respectively, being significantly more toxic when compared to the other aqueous extracts. The essential oil was toxic to larvae of *Ae. aegypti*. The lowest lethal concentrations 50 and 90 were 0.31 and 0.70 mg mL⁻¹ respectively, with 16 hours of exposure. The essential oil also had toxic effect to the adult females of the *Ae aegypti* and the lowest LC50 and LC90 were 5.92 and 8.94 mg mL⁻¹ respectively, with 72 hours of exposure. The evaluation of acute toxicity presented an average toxicity intraperitoneal LD 50=2000 mg kg⁻¹ and acute oral toxicity toxicity absence LD 50=2500 mg kg⁻¹. The major components of the essential oil have been espatulenol (22.80%), caryophyllene (15.41%), α -pinene (14.07%) and biciclogermacreno (10.43%). The high grade and the aqueous residue obtained from dried leaves of *C. argyrophyllus*, toxic effect on the larvae of *Ae. aegypti*, which does not occur with different extracts obtained from the fresh leaves. The essential oil is toxic to the *Ae. aegypti*, requiring a median lethal concentration well below the median lethal dose necessary to cause acute toxicity.

Keywords: Phytochemistry, Botanical insecticides, Dengue, Toxicology

1 INTRODUÇÃO

As plantas são importantes recursos naturais e sintetizam conjuntos complexo de metabólitos secundários, substâncias, que poderão atuar como fitoterápicos e/ou na formulação de inseticidas botânicos (GARCEZ *et al.*, 2013).

A partir dessas propriedades fitoterápicas e também do potencial de ação sobre os insetos, as plantas vêm sendo utilizadas tradicionalmente pela espécie humana, utilizando métodos como a infusão, a maceração e a decocção para produzir remédios caseiros. Além disso, conforme ressalta Porsch *et al.* (2013), alguns vegetais eram queimados, o que permitia a liberação de seus princípios ativos mais voláteis, que, através da fumaça produzida, repeliam os insetos. Assim, as informações populares a respeito dos usos, indicações e manejo dessas plantas, foram passando de geração a geração, servindo de subsídio para os conhecimentos científicos atuais.

Dessa forma, a recente utilização da engenharia metabólica com seus complexos estudos de potencialização passa a se destacar e adquirir informações científicas a respeito dos compostos bioativos, o que amplia ainda mais as utilizações dessas plantas, agora, com vista na formulação de produtos naturais que sejam mais efetivos e, ao mesmo tempo, apresentem uma maior segurança para os organismos vivos (SIMAS, 2004).

Tal fato pode ser evidenciado com *Camellia sinensis* L., conhecida popularmente como chá, que era adquirida apenas em comércios informais. Entretanto, as pesquisas científicas, principalmente no âmbito químico e biológico, possibilitaram a identificação de seus compostos químicos, adquirindo maiores conhecimentos de suas propriedades, a exemplo da atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena e antibactericida. Além disso, os testes de toxicidade aguda em camundongos e testes clínicos em humanos referendaram o seu uso, o que potencializou a comercialização do chá verde em redes de comércios legais (RESENDE *et al.*, 1998; PINHEIRO *et al.*, 2010).

Os óleos essenciais sintetizados por alguns vegetais também vêm sendo amplamente pesquisados, devido sua vasta quantidade de substâncias voláteis, as quais podem apresentar atividades farmacológicas como: anestésico, antiespasmódicos e anti-inflamatório (BOTREL *et al.*, 2010).

Além disso, o potencial inseticida de óleos essenciais também tem despertado o interesse da comunidade científica, e poderá vir a contribuir com programas de manejo integrado para o controle de insetos vetores, a exemplo do *Aedes aegypti*, visto que os

inseticidas de origem botânica são biodegradáveis, podem apresentar um baixo impacto ambiental e uma maior seletividade (SIMAS, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2014a).

O *Ae. aegypti*, vetor de grande importância médica, é o transmissor do vírus causador da febre amarela, dengue, febre chikungunya e zika, a qual pode estar associada a síndrome de Guillain-Barré (BARRETO & TEIXEIRA, 2008; VASCONCELOS, 2015). Como principal forma de controle desse vetor, tem-se utilizado inseticidas sintéticos, os quais mediante o uso continuado, tem selecionado populações de insetos resistentes (HORTA *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2011), o que torna essencial a busca por novas formas alternativas de controle para esse vetor, a exemplo dos inseticidas botânicos.

Na busca por inseticidas botânicos, há que se atentar para o potencial da biodiversidade do bioma Caatinga, único exclusivamente brasileiro, e que apresenta grande número de representantes da família Euphorbiaceae (SILVA & FREIRE, 2010) e, algumas de suas espécies têm demonstrado atividade inseticida promissora sobre larvas do *Ae. aegypti* (MORAIS *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2014a).

Dória *et al.* (2010), demonstraram que os óleos essenciais obtidos das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kunth. e *Croton pulegioidorus* Baill. ocasionaram 100% de mortalidade em larvas do *Ae. aegypti*. Os hidrolatos, soluções aquosas do óleo essencial também mostram ser alternativas de controle para esse vetor. Lima *et al.* (2006) verificaram que hidrolatos, obtidos de caules e folhas de *Croton zehntneri* Pax e Hoffm., *Croton nepetaefolius* Baill. e *Croton argyrophyloides* Muell Arg., ocasionaram 100% de mortalidade de larvas do *Ae. aegypti*, o que demonstra o potencial inseticida desse gênero.

Croton argyrophyllus Kunth. (Euphorbiaceae), alvo desse estudo, é encontrada na Caatinga, popularmente conhecida como velame falso e pode apresentar potencial inseticida conforme outros estudos realizados com espécies desse mesmo gênero. Contudo, os inseticidas botânicos devem ser seletivos, o que torna imprescindível à avaliação da toxicidade dos vegetais, obtendo uma maior segurança no uso de seus metabólitos com potencial inseticida, a serem utilizados no controle de insetos vetores (ALBUQUERQUE, 2007; TAPP *et al.*, 2009).

A partir dessas considerações, objetivou-se avaliar a toxicidade de extratos aquosos e do óleo essencial das folhas de *Croton argyrophyllus* Kunth, 1817, sobre o *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762, bem como realizar a análise química e avaliação toxicológica do óleo essencial sobre *Mus musculus* Linnaeus, 1758.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), (Linnaeus, 1762): Taxonomia e Morfologia

O *Ae. aegypti* é um mosquito originário do continente Africano e descrito no Egito, pertence ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Culicinae, tribo Aedini e Gênero *Aedes* (BRAGA & VALLE 2007; SOUZA *et al.*, 2008). É uma espécie cosmopolita e de ampla dispersão, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais do globo. No Brasil, a alta incidência desse vetor, deve-se ao acelerado e desordenado processo de urbanização, bem como às condições climáticas e sociais, que favorecem a sua rápida proliferação (BUSATO *et al.*, 2014).

Esse vetor apresenta ciclo de vida com metamorfose completa: o ovo, quatro estádios larvais, um estágio de pupa e adulto. Os ovos medem aproximadamente 1 mm de comprimento e apresentam contorno alongado e fusiforme. No momento da postura os ovos são brancos, mas rapidamente adquirem a cor negra brilhante. A fase de ovo é a etapa de maior resistência do ciclo biológico do mosquito e, nas regiões onde as estações anuais são bem marcadas, é tida como estratégia da espécie para suportar os rigores do inverno (BESERRA *et al.*, 2008; SILVA & POLETO, 2012).

As larvas apresentam-se um corpo composto de cerdas e dividido em cabeça, tórax e abdome (Figura 1). A cabeça envolve um par de antenas, olhos compostos por alguns ocelos e aparelho bucal do tipo mastigador-raspador. À frente da cabeça encontra-se as escovas orais ou palatais. Tais escovas, quando em movimento promovem correntes hídricas na água que trazem para a boca das larvas pequenas partículas para que possam se alimentar. O tórax apresenta-se globoso e mais largo que a cabeça, já o abdome é cilíndrico e dividido em oito segmentos aparentes (Figura1) e mais dois que são reduzidos e modificados em ânus e genitália externa. No oitavo e último segmento localiza-se o sifão ou tubo de ar para a respiração das larvas, que caracteriza-se como curto, grosso e escuro, além disso, apresenta estruturas com aspectos de espinhos que formam uma fileira de cada lado da sua parte pósterobasal (pecten) (Figura1) (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; HARBACH, 2011).

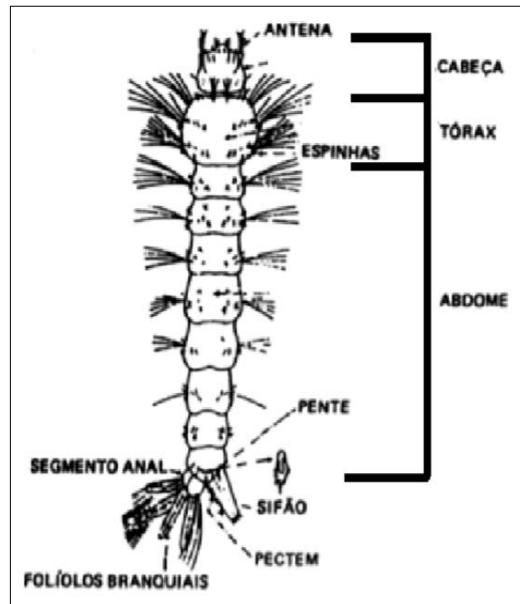


Figura 1 – Morfologia geral da larva do *Aedes aegypti*.

(Fonte: Adaptada de Agrello, S. R. Notificación en Uruguay. Revista médica, 1997).

As pupas são divididas em cefalotórax e abdome (Figura 2), ambos providos de cerdas. A cabeça e o tórax são unidos, constituindo dessa forma a porção chamada cefalotórax, o que dá à pupa, vista de lado, a aparência de uma vírgula. No cefalotórax existe duas estruturas tubulares chamadas de trombetas ou trompas respiratórias (Figura 2), onde, se abrem os únicos espiráculos da pupa. Ainda nesta porção do corpo, vêem-se manchas escuras bilaterais, que correspondem aos seus olhos compostos (FORATTINI, 2002).

No final do abdome há um par de pás ou paletas, que auxiliam a pupa na locomoção. Ligado a este segmento e ventral às paletas encontra-se o lobo genital, que, no caso das pupas de fêmeas é geralmente bem pequeno, enquanto que nas pupas de machos é volumoso e parcialmente bilobulado, ou seja, aloja as estruturas maiores da genitália masculina: os gonocoxitos e gonostilos (SARMENTE, 2007).

No que diz respeito aos mosquitos adultos (Figura 3), esses medem de 3 a 6 mm de comprimento, apresentam coloração escura com faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais e um “desenho em forma de lira” no mesonoto (parte central da cabeça) (Figura 3). Seu corpo é nitidamente dividido em cabeça, tórax e abdome (BESERRA *et al.*, 2008).

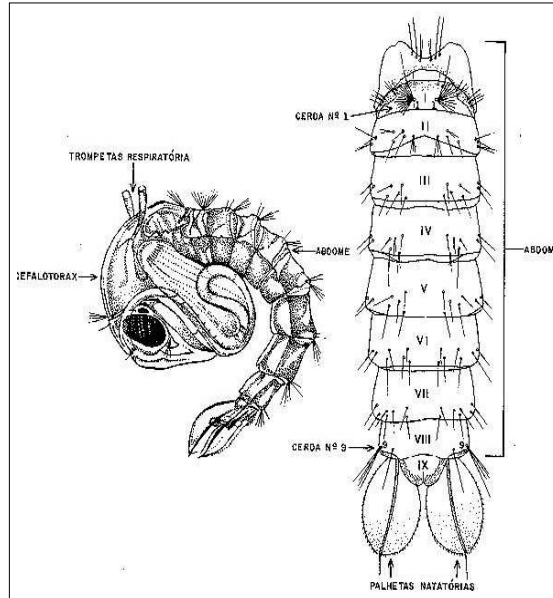


Figura 2 – Morfologia geral da pupa do *Aedes aegypti*.
(Fonte: Fé, N. F. Subgerência de Entomologia, 2014).

Na cabeça encontram-se os olhos convexos, reniformes e compostos, o que constitui um agregado de elementos ópticos: os omatídeos. Entre os olhos está presente um par de antenas e logo abaixo dessas, os palpos, estruturas que caracterizam a distinção do sexo da espécie por apresentar, antenas pilosas nas fêmeas e plumosas nos machos (Figura 3), além disso, os machos exibem palpos mais longos. O conjunto de órgãos do aparelho bucal é do tipo picador ou pungitivo e constituído por um par de maxilas, um par de mandíbulas, o hipofaringe e o labro, os quais se encontram alojados em uma espécie de estojo ou calha alongada, o lábio. Todo este conjunto de peças bucais é denominado de probóscide ou tromba (FORATTINI, 2002; LEITE & ASSOCIADO, 2011).

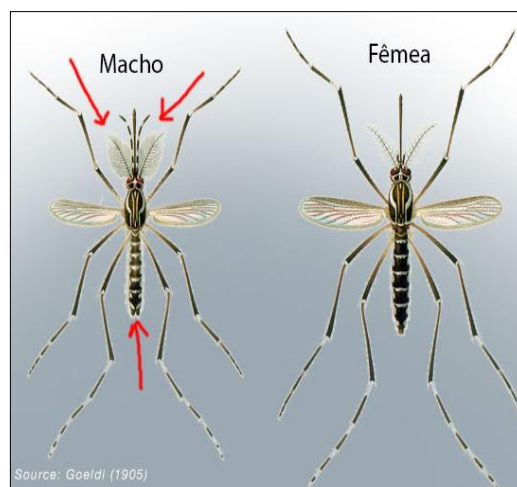


Figura 3 – Adulto macho e fêmea do *Aedes aegypti*.
(Fonte: Adaptada de Goeldi, E. A. Sistema Mosquitos não Pará, 1905).

2.1.2 Ciclo de vida

As fêmeas do *Ae. aegypti* são hematófagas. Para completar seu ciclo de vida evolutivo, composto pelo ovo, os quatro estádios larvais, pupa e adulto (Figura 4), necessitam primeiramente realizar o repasto sanguíneo, essencial para a maturação de seus ovos. Não havendo a completa ingestão de sangue, o desenvolvimento das larvas não passará dos primeiros estádios (OLIVEIRA *et al.*, 2014b).

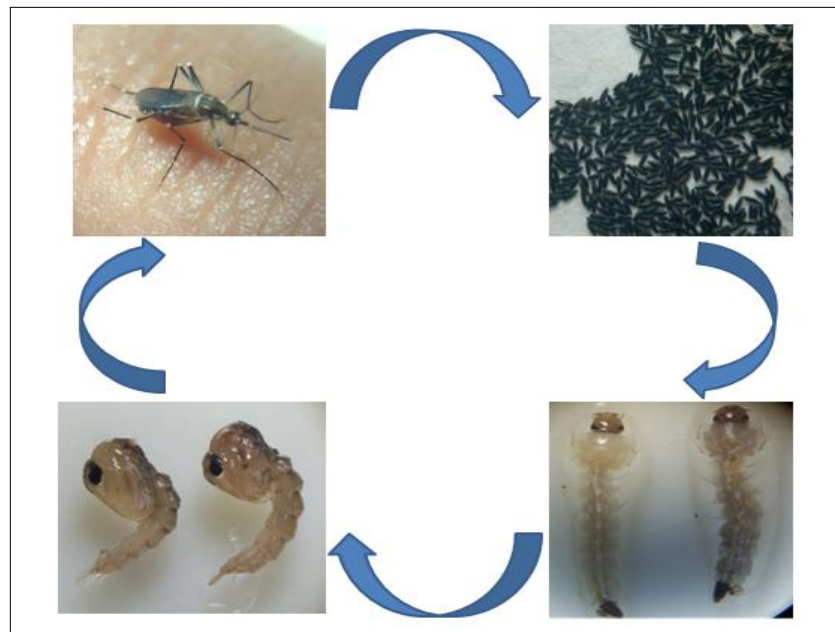


Figura 4 – Ciclo de vida do *Aedes aegypti*.
(Fonte: Cruz, R. C. D. 2015).

As fêmeas após copularem, tende a pousarem no hospedeiro para a realização do repasto sanguíneo, que é realizado com o auxílio da probóscide, sendo está introduzida na pele, ficando o lábio dobrado. Na maioria das vezes a sucção ocorre diretamente de um capilar, e o processo se completa em aproximadamente três minutos. Ocasionalmente o sangue pode ser sugado também a partir de uma hemorragia subcutânea produzida pelas peças bucais do vetor, podendo, neste caso, durar mais do que dez minutos. O volume de sangue ingerido pela fêmea do *Ae. aegypti* pode variar de 1,5 a 4,2 mm³ (BARATA, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2014b).

Após o repasto, as fêmeas buscam diferentes tipos de criadouros para depositarem seus ovos. Cada fêmea pode depositar entre 150 a 200 ovos, a depender da quantidade de sangue ingerido. Os substratos para oviposição pode ser tanto naturais quanto artificiais. Os

criadouros naturais podem ser as bromélias, ocos de árvores, axilas de folhas, cascas de frutas e internódios de bambus, enquanto os artificiais incluem uma série de recipientes produzidos pela ação antrópica, como os tanques, calhas, jarros decorativos, pneus descartados, entulhos de construção civil e recipientes plásticos, preferencialmente situados em locais sombreados ou parcialmente sombreados (MARTINS *et al.*, 2013a).

Os criadouros, geralmente são localizados em alturas inferiores a 1 m do solo e com volume que varia desde 100 mL até 8000 L, podendo acumular água limpa ou com pouca matéria orgânica em decomposição (SILVA, 2007; MARTINS *et al.*, 2010; WEAVER & REISEN, 2010). Ao encontrar o criadouro favorável as fêmeas dão início ao ciclo com a postura de seus ovos.

A fecundação ocorre no momento da postura, quando os ovos passam pelo oviduto e alguns dos espermatozoides liberados da espermateca penetram na extremidade anterior de cada ovo, onde se encontra um orifício, o cório (micrópila). Posteriormente, as fêmeas depositam os ovos na linha da água dos criadouros. O desenvolvimento do embrião se completa em 48 a 72 horas, desde que haja condições climáticas favoráveis. A eclosão larvária é auxiliada pelo atrito de um "dente" quitinoso situado dorsalmente na cabeça da larva de primeiro instar contra a casca do ovo, assim como pelo engurgitamento da larva, juntamente com os seus movimentos pulsáteis (FORATTINI, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2014b).

As larvas são exclusivamente aquáticas e alimentam-se de detritos orgânicos, bactérias, fungos e protozoários existentes na água do criadouro. A duração de cada estágio evolutivo das larvas é variável com a temperatura, disponibilidade de alimento e densidade das larvas no criadouro, mais em condições ideais não excedem cinco dias, até atingirem a fase de pupa (BESERRA *et al.*, 2008).

As pupas também são aquáticas e não se alimentam, devido às modificações necessárias para surgimento dos adultos. Esta fase apresenta uma durabilidade de 2,0 a 2,5 dias e, quando inativas, se mantêm na superfície d'água, para respirar e também facilitar a emergência do inseto adulto (PALENCIA, 2012).

O adulto do *Ae. aegypti* representa a fase reprodutora do inseto. Logo após emergir do estágio pupal, o mosquito adulto procura pousar sobre as paredes do recipiente, assim permanecendo durante várias horas, o que permite o endurecimento do exoesqueleto, das asas e, no caso dos machos, a rotação da genitália em 180° (SILVA *et al.*, 2008).

2.1.3 Importância epidemiológica e controle do *Aedes aegypti*

A importância epidemiológica atribuída a este inseto, se dá principalmente pelo fato de transmitir o vírus causador da febre amarela urbana, da febre da chikungunya, da febre zika, a qual pode estar associada à síndrome Guillain-Barré, e do vírus da dengue, sendo esta, a doença que mais tem chamado atenção, por infectar 50 a 100 milhões de pessoas anualmente e gerando grandes epidemias, refletindo dessa forma, em um grave problema de Saúde Pública a nível mundial (WHO, 2012; TAPPE *et al.*, 2014; VASCONCELOS, 2014; VASCONCELOS, 2015).

A febre amarela urbana cujo agente etiológico é um vírus pertencente ao gênero *Flavivirus*. A doença se caracteriza por apresentar uma evolução do seu quadro clínico bifásico, sendo que na primeira fase, os sintomas são leves e moderados e, posteriormente, o caso pode evoluir para a forma mais grave, com manifestações hemorrágicas. Já a febre da chikungunya, que significa “aquele que se curva”, posição em que o paciente adquire durante o período da doença, apresenta como agente etiológico o vírus do gênero *Alphavirus*, e, dificilmente, apresenta sinais de hemorragias, mas se caracteriza por exibir quadro de febre associada à dor articular intensa e debilitante. Embora possua sintomas semelhantes aos da dengue, o que chama a atenção é a poliartrite que acomete principalmente os punhos, tornozelos e cotovelos (ANJOS *ta al.*, 2014; DONALÍSIO & FREITAS, 2015).

No que diz respeito à febre zika, tem como agente etiológico o vírus do gênero *Flavivirus* e foi isolado pela primeira vez em macacos na floresta zika, na Uganda em 1947. Em 1954 foi identificado o primeiro caso em humanos na Nigéria, detectado pela primeira vez no Brasil e, portanto na América Latina em 2015, confirmando os primeiros casos no município de Camaçari-BA e Natal-RN. A doença apresenta como sintomas principais exantema, febre, artralgia, mialgia, cefaleia e conjuntivite. Ocasionalmente podem ocorrer dor de garganta, tosse, vômitos e diarreia. Apesar do quadro clínico se assemelhar ao da dengue, a evolução costuma ser mais benigna, sem relato de casos graves e seus sintomas costumam ser autolimitados com duração de 3 a 6 dias. Contudo, a doença zika, pode estar associada à síndrome Guillain-Barré, uma doença autoimune que pode surgir após a infecção de seu vírus. A doença Guillain-Barré costuma apresentar como sintomas iniciais sensações de formigamento e perda da sensibilidade em ambas às pernas, e, posteriormente, afeta os braços, sendo a debilidade seu principal sintoma (DUFFY *et al.*, 2009; TAPPE *et al.*, 2014; ZANLUCA *et al.*, 2015; VASCONCELOS, 2015).

A dengue é uma doença febril aguda, e também apresenta como agente etiológico um vírus do gênero *Flavivirus*. São conhecidos atualmente quatro sorotipos, antigenicamente distintos: DEN 1, DEN 2, DEN 3 e DEN 4. Suas manifestações clínicas variam de uma síndrome viral, inespecífica e benigna, que, além da febre, apresenta dores musculares e articulares, dor de cabeça, desânimo e fadiga. Entretanto, essas complicações podem-se manifestar com um quadro mais grave e fatal, pois a partir do quinto dia de infecção pode ocorrer sangramento em vários órgãos manifestando o choque hemorrágico. Os fatores de risco para os casos graves variam principalmente entre o tipo da cepa do sorotipo do vírus infectante, o estado imunitário e genético do paciente e a concomitância com outras doenças (TAUIL, 2002; HINO *et al.*, 2010; POWELL & TABACHNICK, 2013).

Diversas práticas para o controle da dengue vêm sendo amplamente exploradas, por não dispor, até o momento, de vacinas ou medicamentos efetivos. Dessa forma, o controle vetorial se torna a estratégia mais efetiva e pode ser efetuado principalmente a partir do controle biológico, físico, químico e genético (BRAGA & VALLE, 2007; MARTINS, 2013b).

O controle biológico consiste em reduzir a população do vetor através da predação, competição e por agentes patogênicos que liberam toxinas. Nessa concepção de controle biológico, os predadores do tipo peixes larvófagos como os *Poecilia reticulata* Peters, 1859 e *Betta splendens* Regan, 1910 são os mais recomendados, devido a sua fácil obtenção e manutenção, podendo ser utilizados em fossos de elevador de obras, fontes ornamentais, piscinas abandonadas e depósitos de água não potável (DONALÍSIO & GLASSER, 2002; FORATTINI, 2002).

À competição por espaço e alimentação também podem afetar o desenvolvimento e aumentar a mortalidade larval, além de ocasionar a redução no tamanho dos mosquitos adultos, o que influencia em sua longevidade, fecundidade e capacidade de dispersão de vôo do inseto, apresentando assim, um considerável controle epidemiológico. No que diz respeito à utilização de agentes patogênicos, as bactérias do tipo *Bacillus thuringiensis israelensis* Var, 1979 (Bti) e o *Bacillus sphaericus* Neide, 1593, também são largamente utilizadas para o controle do *Ae. aegypti*, por produzirem endotoxinas nocivas que agem nas células gástricas das larvas, provocando sua lise (DONALÍSIO & GLASSER, 2002; GAMA *et al.*, 2005).

O controle físico se baseia em eliminar o *Ae. aegypti* através da aplicação de produtos que formam películas monomolecular sobre a superfície da água, o que impede a respiração de larvas e pupas e, a utilização de água quente, visto que a água a 49 °C será o suficiente para o ressecamento dos ovos em menos de cinco minutos e causar a morte das larvas e pupas em um período de três minutos (DONALÍSIO & GLASSER, 2002).

O método de controle através da manipulação genética consiste na criação e liberação de um grande número de mosquitos submetidos à radiação, que ocasiona a quebra do material genético tornando o mosquito estéril, posteriormente os machos modificados são liberados no ambiente para copular com as fêmeas selvagens, fazendo com que as larvas resultantes deste acasalamento não atinjam o estágio adulto. Em 2011, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), permitiu a liberação de mosquitos dessa linhagem para realização de testes em campo, no município de Juazeiro-Bahia e em 2014 foi aprovado a produção comercial desses mosquitos (OSTERA & GOSTIN, 2011; BRASIL, 2014).

No entanto, vários autores têm alertado para os riscos oriundos da liberação dos mosquitos transgênicos no ambiente, o que possivelmente acarretará impactos negativos e significativos à biodiversidade, pois pode haver liberação de fêmeas entre os machos irradiados o que resulta em aumento de fêmeas no ambiente. Isso causa não apenas incômodo e transmissão de doenças, mas interfere na cópula com machos irradiados, ao competir com fêmeas selvagens, além disso, os animais podem também ser picados por fêmeas transgênicas e as larvas, pupas e mosquitos adultos resultantes do seu ciclo biológico e geneticamente modificados poderiam ser consumidos por outras espécies (MARRELLI, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011; OSTERA & GOSTIN, 2011).

O controle químico faz uso de inseticidas sintéticos, destacando-se os organofosforados como os larvicidas de mais ampla utilização (tratamento focal). Já para o controle adúlticida empregam-se a borrifação, por meio de inseticidas de ação residual, a exemplo dos piretróides (tratamento perifocal). Entretanto, o controle químico vem agindo negativamente, em função do surgimento de populações de insetos resistentes, além disso, vem contribuindo intensamente com a contaminação ambiental, uma vez que se torna necessário realizar um número cada vez maior de aplicações para que possa garantir um resultado satisfatório (DONALÍSIO & GLASSER, 2002; BRAGA & VALLE, 2007).

Dessa forma, novas alternativas de controle para o *Ae. aegypti* vêm sendo estudadas, como o uso de plantas, para a formulação de inseticidas botânicos, os quais se tornam menos impactante para o meio ambiente, tende a reduzir os riscos de populações de insetos resistentes, em virtude da sua complexidade molecular e minimizar os riscos à saúde humana (CORRÊA & SALGADO, 2011; GARCEZ *et al.*, 2013).

A participação efetiva da população também é fundamental para que o controle vetorial seja muito bem sucedido. Assim, existe a necessidade de intervenções educativas entre os técnicos de saúde e a comunidade, e a educação, deve ter como objetivo o acréscimo de conhecimento e também a eliminação mensurável de criadouros dos mosquitos vetores,

pelo cidadão. Os trabalhos educativos convencionais nessa área têm sido o da veiculação pela mídia, cartazes, faixas, painéis, folhetos ou palestras em escolas e outros núcleos sociais (CLARO *et al.*, 2004).

2.2 A Caatinga, a produção de metabólitos secundários e o controle do *Aedes aegypti*

O Brasil é considerado o país com maior número de espécies existentes no mundo e apresenta as maiores taxas de endemismo do planeta, destacando-se como o maior representante mundial da biodiversidade (BROWN *et al.*, 2009; SCARIOT, 2010).

Com vistas ao uso sustentável dos recursos biológicos, o Brasil é signatário do tratado estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU), conhecido como Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), um dos mais importantes instrumentos internacionais relacionados ao meio ambiente. Vale ressaltar que o Brasil foi o primeiro país a assinar o tratado, e a partir de então criou institutos como o Centro Nacional para a Conservação da Flora (CNCFlora) e o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2011).

Contudo, uma análise realizada pelo quarto Relatório Nacional do Brasil para a Convenção sobre Diversidade Biológica, prevê que o efeito do desmatamento da Floresta Amazônica impactará significativamente outros biomas como a Mata Atlântica e o Cerrado, considerados os dois *hotspots* de biodiversidade brasileira, assim como um efeito de seca severa e um clima cada vez mais quente na região semiárida, o que afetaria diretamente o bioma Caatinga, por já apresentar um déficit hídrico considerado (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2011).

A Caatinga é avaliada como único bioma exclusivamente brasileiro, que compreende em média 11% do seu território, destacando-se como de fundamental importância para a conservação da biodiversidade brasileira (LEWINSOHN & PRADO, 2000; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2011).

Contudo, alterações atuais no bioma Caatinga, decorrente das construções de represas, expansões agrícolas e a retirada da vegetação nativa, principalmente para abastecimento dos fornos de carvoarias e olarias (lenha), vem afetando consideravelmente os elementos climáticos, tais como o vento, a temperatura e a umidade do ar, o que contribui expressivamente com a degradação dessa região (MELO *et al.*, 2014).

Este bioma abrange cerca de 735.000 km² e envolve a maior parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e a parte

nordeste de Minas Gerais. A biodiversidade da Caatinga se caracteriza pela presença de 187 espécies de abelhas, 240 de peixes, 167 de reptéis e anfíbios, 510 espécie de aves e 148 de mamíferos (ZANELLA & MARTINS, 2003; ROSA *et al.*, 2003; RODRIGUES, 2003; LEAL *et al.*, 2005; SCARIOT, 2010).

No que diz respeito à vegetação, estima-se que 932 espécies já foram registradas, sendo que 380 são consideradas endêmicas. A formação vegetal apresenta características bem definidas, representadas por plantas caducifólias do tipo arbustivas, herbáceas, arbóreas e espinhosas, constituídas principalmente de Cactáceas, Bromeliáceas, Euforbiáceas e Leguminosas (LEAL *et al.*, 2005; ALVES *et al.*, 2009).

A Caatinga apresenta um clima semiárido, portanto com florestas secas. A precipitação média anual é menos de 1.000 mm, que se distribuem de forma desigual na região, já a evapotranspiração é sempre alta, variando de 1.500 e 2.000 mm por ano, o que interfere constantemente na disponibilidade de água. Essas variações motivam mudanças de adaptação dos animais e estimulam significativamente a produção de metabólitos secundários dos vegetais presentes na região (MACIEL *et al.*, 2002; VELLOSO *et al.*, 2002; ALVES *et al.*, 2009).

Para se adaptarem no ecossistema, frente às várias alterações, as plantas tendem a estimular a produção de diferentes metabólitos primários, como celulose, proteínas, lipídios e açúcares, os quais são responsáveis pela manutenção da fotossíntese, respiração e crescimento. Além disso, novas rotas biossintéticas podem ser iniciadas a partir dos metabólitos primários, desencadeando a produção de metabólitos secundários, como alcaloides, terpenoides e derivados de fenilpropanóides, que não estão envolvidos diretamente com o seu metabolismo, e sim com suas propriedades fototerápicas e proteção contra insetos herbívoros (BARRETO, 2005; MENEZES, 2005; GARCÍA & CARRIL, 2009).

Assim, diversas espécies de plantas do bioma Caatinga são utilizadas, principalmente pela comunidade do entorno, sobretudo no uso da medicina popular, devido à ação de seus compostos bioativos (GOMES *et al.*, 2008). Há que se ressaltar, que tais substâncias também podem ser utilizadas para a formulação de inseticidas botânicos, que possa vir a atuar consideravelmente no controle populacional de muitos insetos causadores de doenças, a exemplo do *Ae. aegypti* (SILVA & FREIRE, 2010; SILVA *et al.*, 2012a).

Substâncias, a exemplo de alcaloides, taninos e flavonoides, apresentam propriedades terapêuticas comprovadas, como analgésica, anti-inflamatória e antioxidante (PEREIRA & CARDOSO, 2012; MOURA *et al.*, 2013), além da atividade inseticida (CHIESA & MOYNA, 2004).

Roque et al. (2010), relataram que no bioma Caatinga, as famílias Fabaceae, Euphorbiaceae, Cactaceae e Lamiaceae, são as que mais se destacam no que diz respeito ao uso medicinal. E entre as espécies nativas mais citadas encontra-se *Myracrodruon urundeuva* Fr. devido apresentar um forte potencial anti-inflamatório. Vale ressaltar que tal espécie apresenta altas concentrações de taninos em suas cascas e raízes, sendo possivelmente estas as substâncias responsáveis pela sua ação (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Além de suas utilidades fitoterápicas, a ação inseticida de algumas plantas tem atraído à atenção de pesquisadores envolvidos com o controle de insetos vetores, visando encontrar uma alternativa a mais a ser usada no controle desses vetores. Segundo Costa & Costa (2009), a busca por novas alternativas é essencial, visto que os inseticidas químicos contribuem significativamente para o surgimento de populações de insetos resistentes e dispersa maiores porções de substâncias poluidoras na natureza, atingindo os insetos benéficos e interferindo na forma natural do ecossistema, ocasionando grandes desequilíbrios ambientais.

Populações do *Ae. aegypti* com níveis de resistência significativos aos organofosforados, piretróides, carbamatos e organoclorados, já foram detectadas em diversos estados brasileiro (PAEPORN *et al.*, 2005). Nesse contexto, diferentes produtos de origem vegetal estão sendo pesquisados a partir de espécies nativas da Caatinga apresentando resultados promissores em relação ao controle alternativo para esse vetor.

Morais et al. (2006), revelaram que óleos essenciais obtidos de folhas de *Croton nepetaefolius*, *Croton argyrophyloides* e *Croton sonderianus*, espécies endêmicas da Caatinga, ocasionaram 100% de mortalidade das larvas do *Ae. aegypti*, após 24 horas de exposição.

Estudos realizados por Silva et al. (2014) demonstraram que a fração diclorometânica obtida a partir do fracionamento do extrato etanólico do caule de *Croton linearifolius* Mull Arg. ocasionou 99,17% de mortalidade larval do *Ae. aegypti*, sendo essa a melhor fração, comparada as demais obtidas, sendo possivelmente os alcaloide os principais responsáveis pela ação larvicida.

O óleo essencial das folhas de *Croton zehntneri*, apresentou uma atividade inibitória da oviposição de fêmeas do *Ae. aegypti* e os principais componentes químicos detectados nessa espécie foram o α -pineno, o β -felandreno e o trans-cariofileno (MORAIS *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2010).

A Caatinga constitui um bioma diversificado e apresenta uma grade diversidade de plantas, as quais a partir de seus metabólitos secundários propiciam grandes fontes de

pesquisas, com muitos exemplares promissores no que diz respeito ao âmbito medicinal, bem como para o controle do *Ae. aegypti*.

2.3 Óleos essenciais: bioatividade e toxicidade sobre *Mus musculus*

Os óleos essenciais são originados através do metabolismo secundário das plantas e possuem em sua composição química complexas substâncias voláteis, lipofílicas e geralmente odoríferas (MACHADO & JUNIOR, 2011).

Podem ser sintetizados em diversas partes das plantas, mas principalmente nas folhas, flores, frutos e sementes. Os componentes químicos dos óleos essenciais podem variar quantitativamente e qualitativamente nos diferentes órgãos dos vegetais, assim como, em resposta das espécies às condições ambientais como a precipitação, temperatura, umidade e luminosidade, bem como o tipo de solo e interações ecológicas com outras espécies (SIMÕES *et al.*, 2010).

A produção dos óleos essenciais ocorre principalmente em função da necessidade de adaptação da planta ao meio ambiente, garantindo, assim, sua defesa contra ataque de predadores, proteção contra a perda de água e atração de agentes polinizadores. Seus principais constituintes são os hidrocarbonetos (monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides) e compostos oxigenados (ésteres, alcoóis, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis entre outras substâncias de baixo peso molecular) (GONÇALVES *et al.*, 2003; SIMÕES *et al.*, 2010).

As propriedades biológicas das substâncias químicas dos óleos essenciais fazem com que os mesmos sejam bastante utilizados para a fabricação de muitos produtos nos setores farmacêuticos, alimentício, cosméticos, de perfumaria, higiene e inseticidas (SIANI *et al.*, 2012, GARCEZ *et al.*, 2013).

De acordo com Brasil *et al.* (2009), é perceptível que muitas espécies do gênero *Croton* apresentam fortes aromas e, portanto, se destacam na produção de óleos essenciais, compostos principalmente por hidrocarbonetos, especialmente (E)-cariofileno, β -elemeno, β -pineno e sabineno.

Dessa forma, os óleos essenciais de diversas espécies de *Croton* foram estudados cientificamente e tiveram seus efeitos farmacológicos e inseticidas comprovados. O óleo essencial das folhas de *Croton cajucara* Benth., oferece atividade promissora para o tratamento de diabetes, níveis elevado de colesterol no sangue e distúrbios gastrointestinais, bem como perturbações hepáticas e perda de peso. As sementes de *Croton tiglium* L. são

vastas em óleos essenciais com atividade antitumorais e também podem ser utilizados como purgante (CAMPOS *et al.*, 2002; GRASSI-KASSISSE *et al.*, 2003; SALATINO *et al.*, 2007).

No que diz respeito à atividade inseticida, os óleos essenciais obtidos de diferentes espécies de *Croton*, mostraram-se efetivos sobre as larvas do *Ae. aegypti* e diversos compostos químicos foram identificados tais como: metileugenol e α -copaeno para *Croton nepetaefolius*; α -pineno e β -pineno presente em *Croton argyrophyloides*; α -pineno, β -felandreno e trans-cariofileno para *Croton sonderianus* e o componente anetol presente em *Croton zehntneri*, sendo está última considerada a espécie mais promissora para o controle das larvas do mosquito.

Contudo, os óleos essenciais podem apresentar compostos químicos potencialmente perigosos, principalmente quando utilizados em sua forma concentrada, entre tais compostos destacam-se os ácidos aristolóquicos, ácido *o*-cumárico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ascaridol e cânfora, os quais são encontrados especialmente em *Aristolochia clematitidis* L., *Copaifera langsdorfii* Desf., *Ruta graveolens* L., *Peumus boldo* Mol. e *Cinnamomum canphora* Sieb., respectivamente. Tais espécies, ainda assim, são consideradas como plantas medicinais e frequentemente utilizadas para comercialização popular (JUNIOR *et al.*, 2005).

Os óleos essenciais obtidos das folhas de *Croton cajucara*, são popularmente utilizados no tratamento da diabete, no combate a problemas gástricos e no controle da taxa de colesterol (CAMPOS *et al.*, 2002). Contudo, o uso dessas folhas em tratamentos prolongados pode causar hepatite tóxica, conforme ressalta Maciel *et al.* (2002). O Hospital da Universidade Federal do Pará possui um histórico significativo de pessoas vitimadas por doenças do fígado, as quais estavam ingerindo o chá dessas folhas em dietas prolongadas de emagrecimento, assim como no Hospital Universitário da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que houve um relato de óbito no ano de 2001, devido seu uso, sendo comum a venda de cápsulas dessas folhas em comércios de produtos naturais na Tijuca, bairro do Rio de Janeiro (MACIEL *et al.*, 2002). Estudos tem demonstrado que a principal substância encontrada em óleos essenciais dessa planta é a *trans*-desidrocrotonina, e pode ser a principal responsável pela sua ação tóxica (JUNIOR *et al.*, 2005).

Mediante as atividades promissoras apresentadas pelos óleos essenciais, seja para produção de fitoterápicos ou formulação de inseticidas naturais, se torna imprescindível à realização de testes de toxicidade desses óleos, determinando assim, parâmetros importantes como a obtenção da dose letal, a partir da avaliação da toxicidade aguda, o que estabelece uma maior segurança para o uso de suas substâncias bioativas (ANVISA, 2010). A avaliação

da toxicidade aguda pode se dar através de ensaios envolvendo animais de laboratório, como exemplo a espécie *Mus musculus*, a qual se destaca por apresentar, facilidade de manutenção, ciclo de vida curto e padronização genética e, segundo a Organização Mundial de Saúde, ensaios com mamíferos possui elevado valor de aplicação para espécie humana (WHO, 1978).

2.4 *Croton argyrophyllus* (Kunth, 1817) (Euphorbiaceae)

A família Euphorbiaceae a qual estar inserida *Croton argyrophyllus*, abrange 317 gêneros e cerca de 8000 espécies, que estão distribuídas principalmente em regiões tropicais nos mais variados tipos de vegetação e habitats. É considerada uma das maiores famílias de vegetais a nível mundial, ocupando o quinto lugar em diversidade depois de Orchidaceae, Asteraceae, Poaceae e Rubiaceae. Na Caatinga, foram registradas diversas espécies e muitas são endêmicas, sendo considerada a terceira família desse bioma com maior riqueza em espécies, superada apenas por Fabaceae e Convolvulaceae (WEBSTER, 1994; SAMPAIO *et al.*, 2002; STEINMANN, 2002; GIULIETTI *et al.*, 2006; NEVES *et al.*, 2010).

As Euphorbiaceae são plantas de hábitos bastante variados desde árvores, arbustos, ervas e trepadeiras, algumas vezes suculentas e com folhas inteiras ou compostas, geralmente apresentam estípulas e podem ser latescentes ou não. Diversas espécies exibem flores pistiladas muito características pelo gineceu sincárpico, ovário súpero e geralmente tricarpelar. Seus frutos são comumente capsulares com deiscência explosiva, abrindo-se em três mericarpos (SÁTIRO & ROQUE, 2008).

Diversas plantas dessa família estão dentre as de maior importância econômica entre as Angiospermas e são extremamente importantes principalmente para o uso medicinal, industrial, alimentício e ornamental (STEINMANN, 2002). Além disso, muitas espécies são comumente citadas para o controle de insetos, principalmente as do gênero *Croton* (GARCEZ *et al.*, 2013).

O gênero *Croton* pertence à subfamília Crotonoideae e tribo Crotonaeae, é o segundo maior gênero da família Euphorbiaceae e compreende aproximadamente 1.200 espécies com distribuição pantropical, com expressiva concentração nas Américas e África. No Brasil são registradas aproximadamente 300 espécies de *Croton*, amplamente distribuídas nos mais diversos ambientes, destacando-se o Bioma Caatinga, Cerrado e Campos rupestres, dessa forma, estão presentes de Norte a Sul do país (MACIEL *et al.*, 2006; LIMA & PIRANI, 2008; CARNEIRO, 2009).

Várias espécies de árvores, ervas, arbustos e cipós estão inseridas ao gênero e são conhecidas popularmente como velame ou marmeleiro. Os metabólitos secundários predominantes em extratos de espécie do gênero *Croton* são os clerodanos, neoclerodanos e isopimaranos. Outros compostos químicos frequentemente relatados são os alcaloides, flavonoides, saponinas e fenilpropanóides. Já em seus óleos essenciais, destacam-se o metileugenol, α -copaeno, α -pineno, β -pineno, α -pineno, β -felandren, trans-cariofileno e anetol, o que demonstra a relevância de suas espécies para fins medicinais, industrial e inseticida (MORAIS *et al.*, 2006; BARRETO *et al.*, 2013; GARCÍA *et al.*, 2015).

No que diz respeito às propriedades medicinais, *Croton campestris* St Hil., apresenta diferentes tipos de flavonoides e tem demonstrado um forte controle ao combate às doenças venéreas, impigens e tumores, além de apresentar atividade anti-inflamatória e antidiabética (SANTOS *et al.*, 2005). *Croton urucurana* Baill., também é bastante utilizada, por exibir látex com propriedades analgésicas, cicatrizantes, antivirais e antitumorais, além de mostrar eficácia na inibição de fungos causadores de infecção de pele (GURGEL *et al.*, 2005).

No que se refere à utilização industrial, *Croton lechleri* Muell. Arg. sintetiza um látex avermelhado e composto principalmente por alcaloides, flavonoides e taninos. Esse látex é bastante utilizado pela indústria farmacêutica, principalmente como cicatrizante e não apresenta efeitos colaterais após seu uso, podendo ser comercializado na forma líquida e em cápsula (REYNEL *et al.*, 2003). Já Oliveira *et al.* (2014a), relataram grande potencial inseticida do extrato etanólico obtido da raiz de *Croton linearifolius* sobre larvas do *Ae. aegypti*.

Com relação ao *Croton argyrophyllus*, alvo desse estudo, encontra-se amplamente distribuída em ambientes semiáridos da América do Sul, a exemplo do Brasil, Colômbia, Bolívia e Venezuela (GOMES *et al.*, 2010; SILVA & FREIRE, 2010).

No Brasil, essa espécie se encontra principalmente na Região Nordeste, abrangendo o estado de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Sergipe, especialmente em vegetações de Caatinga e Cerrado, assim como em Regiões do Norte, como Roraima e Rondônia (CARNEIRO, 2009; SILVA & FREIRE, 2010).

No Sudoeste baiano, *Croton argyrophyllus* (Figura 5 A) é denominada popularmente como “velame falso”, já no estado de Pernambuco é conhecida como “marmeleiro”, “marmeleiro branco” ou ainda “alecrim-de-vaqueiro” (ALBUQUERQUE, 2007; SILVA *et al.*, 2010). Mede aproximadamente 1,6 a 5 metros de altura e apresenta fácil reconhecimento no campo, devido à coloração prateada da face abaxial de suas folhas (Figura 5 B), decorrente do adensamento dos tricomas, que são caracterizados como lepidotos e prateados, além disso,

possui folhas alternas a subopostas, que são perdidas durante os períodos de estiagem. Apresentam flores entre os meses de janeiro a março e seus frutos no mês de janeiro (SILVA *et al.*, 2009).

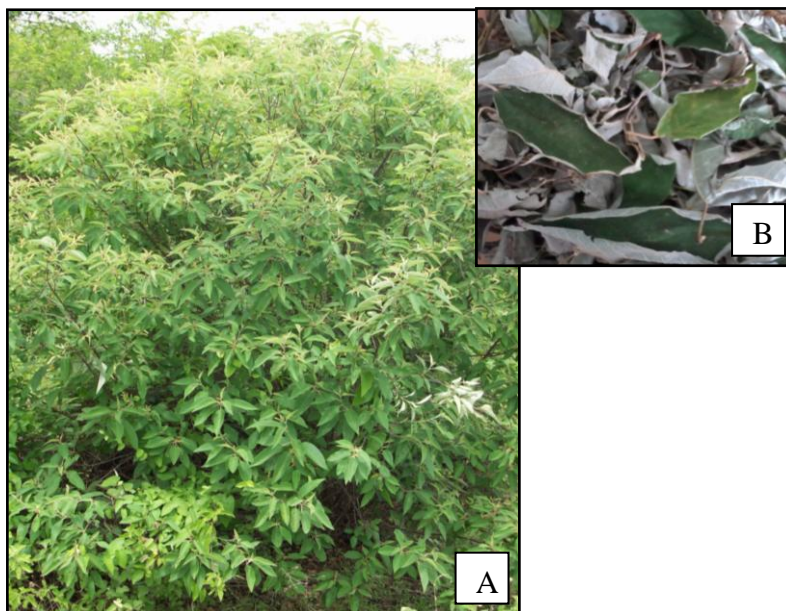


Figura 5. Aspecto geral de *Croton argyrophyllus* (A); Folhas da planta (B).
(Fonte: Cruz, R. C. D. 2015).

Segundo Pereira (2001), *Croton argyrophyllus* é comumente encontrada em áreas sob grandes perturbações, devido à sua facilidade de reprodução e dispersão, características essas que fazem dessas plantas pioneiras típicas da Caatinga e que tendem a dominar os primeiros estágios de regeneração dessas áreas. Silva *et al.* (2012b), ao estudarem o processo de regeneração natural em um remanescente de Caatinga, com diferentes históricos de uso no agreste Pernambucano, constataram que esta espécie estava entre as de maiores densidade de regeneração.

No que diz respeito ao âmbito medicinal, o chá das folhas de *Croton argyrophyllus* são utilizados popularmente para o combate de doenças cardíacas e como calmantes, já o infuso de suas folhas e flores é utilizado no tratamento de dor de cabeça e gripe (SILVA-FILHO *et al.*, 2011). Contudo, diversos mecanismos de ação dessa espécie ainda permanecem desconhecidos, conforme ressalta Ramos *et al.* (2013).

Os trabalhos a seguir foram elaborados segundo as normas da Revista Enciclopédia Biosfera (Capítulo 1) e Revista Parasitology Research (Capítulo 2).



CAPÍTULO 1



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DE EXTRATOS AQUOSOS E DO HIDROLATO OBTIDOS DAS FOLHAS DE *Croton argyrophyllus* SOBRE O *Aedes aegypti*

Rômulo Carlos Dantas da Cruz¹ Karine da Silva Carvalho¹, Sandra Lúcia da Cunha e Silva², Simone Andrade Gualberto²

¹Discentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais – PPGCA/UESB (romulo.carlos@hotmail.com) Itapetinga-Brasil

²Laboratório de Pesquisa de Inseticidas Naturais (LAPIN)/Núcleo de Pesquisa em Química Aplicada/Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Praça Primavera, 40, Bairro Primavera, Itapetinga, Bahia. Cep: 45700-000, Brasil.

Recebido em: 31/03/2015 – Aprovado em: 15/05/2015 – Publicado em: 01/06/2015

RESUMO

As plantas são compostas de substâncias bioativas com propriedades inseticidas e tem sido alvo de estudos visando o controle de insetos vetores, a exemplo do *Aedes aegypti*. Dessa forma, buscou-se avaliar o potencial dos extratos aquosos e do hidrolato obtido das folhas secas e frescas de *Croton argyrophyllus*, no que diz respeito a sua atividade larvicida sobre o *Ae. aegypti*. Foram avaliados os extratos obtidos por maceração e infusão, e o hidrolato, subproduto do processo de extração do óleo essencial por hidrodestilação, assim como o resíduo aquoso resultante, também, desse processo de extração. Para a realização dos bioensaios foram utilizadas 30 larvas de terceiro e quarto instar por repetição, as quais foram expostas a concentração de 100% (v/v) dos extratos. Em cada repetição foi utilizado 30 mL dos diferentes extratos e as larvas foram colocadas em contato com esses extratos por um período de 24 horas. O resíduo aquoso e o hidrolato, obtidos das folhas secas, com 24 horas de exposição ocasionaram 53,3% e 52,5% de mortalidade das larvas de *Ae. aegypti*, respectivamente, sendo significativamente mais ativos quando comparados aos demais extratos aquosos. Os dados obtidos demonstraram que o hidrolato e o resíduo aquoso, obtido das folhas secas de *C. argyrophyllus*, teve efeito tóxico sobre as larvas de *Ae. aegypti*, o que não ocorreu com os diferentes extratos obtidos a partir das folhas frescas.

PALAVRAS-CHAVE: dengue, inseticidas botânicos, substâncias bioativas

ASSESSMENT ACTIVITY LARVICIDE OF THE LEAVES AQUEOUS EXTRACTS AND HIDROLACT OF *CROTON ARGYROPHYLLUS* ON *AEDES AEGYPTI*

ABSTRACT

The plants are composed of bioactive substances with insecticides property and has been the target of studies for the control of insect vectors, such as the *Aedes aegypti*. Thus, we sought to evaluate the potential of aqueous extracts and hidrolact obtained from dried and fresh leaves of *Croton argyrophyllus*, as regards its larvicide activity on the *Ae. aegypti*. The extracts were evaluated by maceration and infusion, and hidrolact, byproduct of the process of extracting the essential oil by hydrodistillation and the resulting aqueous residue also that

extraction process. For the bioassays were used 30 third and fourth instar larvae per replicate, which were exposed to a concentration of 100% (v/v) of the extracts. In each repetition was used 30 mL of each extract and larvae were placed in contact with these extracts for a period of 24 hours. The aqueous residue and the hidrolact obtained from the dried leaves, with 24 hours of exposure caused 53.3% and 52.5% mortality of larvae of *Ae. aegypti*, respectively, being significantly more active when compared to other aqueous extracts. The data obtained show that the hidrolact and the aqueous residue obtained from the dried leaves of *C. argyrophyllus* has a toxic effect on *Ae. aegypti* larvae, which did not occur with different extracts obtained from the fresh leaves.

KEYWORDS: dengue, botanical insecticides, bioactive substances

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de inseticidas botânicos permite a utilização de vegetais como uma fonte alternativa viável para o controle de insetos, pois os compostos bioativos produzidos pelas plantas possibilitam que as mesmas possam se proteger contra o ataque de insetos herbívoros. Entre os insetos passíveis de serem controlados a partir desses compostos encontram-se os vetores de doenças, a exemplo do *Aedes aegypti* (LIMA et al., 2006, POHLIT et al., 2011).

O *Ae. aegypti* é um mosquito cosmopolita e vive principalmente em locais de clima quente e úmido. Sua distribuição é limitada pela altitude, sendo geralmente abaixo de 1.000 m, todavia, já foi encontrado a 2.200 m acima do nível do mar na Colômbia e Índia. Acredita-se que esse mosquito seja originário do continente africano, sendo introduzido nas Américas no início das explorações e da colonização, apresentando posteriormente, uma ampla dispersão urbana, nos países tropicais e subtropicais (WHO, 2009, LIMA et al., 2009, DUARTE et al., 2013).

Esse vetor caracteriza-se por exibir um hábito estritamente antropofílico, e apresentar grande importância do ponto de vista epidemiológico, sendo o transmissor do vírus causador da febre amarela, da febre da chikungunya e, principalmente, do vírus da dengue (BARRETO & TEIXEIRA, 2008, VASCONCELOS, 2014).

A estratégia de controle desse vetor baseia-se, principalmente, no controle entomológico, através do uso de inseticidas sintéticos. No entanto, o uso contínuo e indiscriminado desses produtos, tem ocasionado desequilíbrio ambiental, toxicidade a mamíferos, bem como a seleção de populações de insetos resistentes (BARRETO, 2005, GARCEZ et al., 2013).

HORTA et al., (2011) ao analisarem a susceptibilidade das larvas do *Ae. aegypti* ao inseticida sintético temefós, no estado de Minas Gerais, verificaram uma média de

mortalidade larval muito baixa (2,78%), comparada a da linhagem Rockefeller (99,0%), evidenciando assim, um elevado nível de resistência para essa população. LUNA et al., (2004) também verificaram que o inseticida cipermetrina, não apresentou-se altamente tóxico às larvas do *Ae. aegypti*, e assim, tais autores, recomendaram a suspensão do uso desse inseticida, bem como a sua imediata substituição.

Nesse sentido, cresce o interesse por plantas que apresentem potencial inseticida. Todavia, tais inseticidas de origem botânica, também devem visar a redução do impacto sobre a biodiversidade, mediante a baixa ou nenhuma ação tóxica sobre organismos não-alvo, assim como ao meio ambiente (OLIVEIRA et al., 2014). Desse modo, a formulação de inseticidas a partir de vegetais, poderá contribuir com programas de manejo integrado, para o controle de insetos vetores.

Diversas pesquisas voltadas para o potencial da flora têm sido realizadas, apresentando resultados promissores em relação ao controle do *Ae. aegypti* (LUNA et al., 2005, LIMA et al., 2006, FARIAS et al., 2010, SILVA et al., 2014). Para CORREA & SALGADO (2011) e GARCEZ et al., (2013) os inseticidas botânicos podem reduzir os riscos do aparecimento de populações de insetos resistentes, em virtude da sua complexidade molecular, bem como minimizar os riscos à saúde humana e ao ambiente.

LIMA et al., (2006) verificaram que hidrolatos, soluções aquosas do óleo essencial, obtidos de caules e folhas de *Croton zehntneri*, *Croton nepetaefolius* e *Croton argyrophyloides* (Euphorbiaceae), espécies endêmicas da caatinga, ocasionaram 100% de mortalidade de larvas do *Ae. aegypti*, o que demonstra o potencial inseticida desse gênero.

Dentro desse contexto, buscou-se avaliar o potencial dos extratos aquosos e do hidrolato das folhas secas e frescas de *Croton argyrophyllus*, no que diz respeito a sua atividade larvicida sobre o *Ae. aegypti*.

MATERIAL E MÉTODOS

As etapas de coleta e identificação de *Croton argyrophyllus* (Kunth) (Euphorbiaceae), foram supervisionadas por um especialista botânico, e as exsicatas depositadas no herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana, sob voucher HUEFS 4662 (S13°55.25' W041°06.88'). A planta foi coletada na Floresta Nacional Contendas do Sincorá, no mês de maio.

Posteriormente, as folhas foram pesadas e, em seguida, divididas em duas porções de pesos idênticos, sendo uma imediatamente triturada para iniciar o processo de extração (material fresco), e a outra foi encaminhada para a estufa de circulação de ar, onde

permaneceu por um período 12 horas sob a temperatura de 40 °C. Posteriormente, as folhas pré-secas também foram trituradas e submetidas ao processo de extração.

Foram avaliados os extratos aquosos do material vegetal seco e fresco obtidos pelos processos de maceração e infusão. Avaliaram-se também o hidrolato, subproduto do processo de extração do óleo essencial por hidrodestilação, assim como o resíduo aquoso também resultante do processo de extração do óleo. Para cada extração utilizou-se 100,0 g de folhas secas e frescas, as quais foram submersas em 1,5 L de água deionizada, a temperatura ambiente (26 ± 1 °C), por 3 horas (maceração), em ebulição (100 °C), durante 30 minutos (infusão) e, durante o processo de extração do óleo essencial, em fervura sob refluxo (100 °C) durante 3 horas, originando o hidrolato, e ao final do processo o resíduo aquoso.

Para a realização dos bioensaios utilizou-se larvas de terceiro e quarto ínstar do *Ae. aegypti*, oriundas de uma colônia estabelecida no Laboratório de Pesquisa de Inseticidas Naturais, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, a partir de ovos da linhagem Rockefeller, cedidos pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes e Vetores (LAFICAVE), da Fundação Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro.

Para a realização dos ensaios larvicidas utilizou-se os extratos aquosos, assim como o hidrolato e resíduo aquoso, na concentração de 100% (v/v), com quatro repetições por tratamento. Foram utilizadas 120 larvas por tratamento, com 30 larvas por repetição e o grupo controle, no qual utilizou-se água deionizada. Em cada repetição foi utilizado 30 mL dos diferentes extratos e as larvas foram colocadas em contato com esses extratos por um período de 24 horas.

As observações foram realizadas após 1, 4, 8, 16 e 24 horas, a partir do início do experimento. Os bioensaios foram conduzidos em câmara climatizada regulada a 27 °C e 12 horas de fotofase. Os percentuais de mortalidade das larvas foram submetidos ao teste de *Tukey*, em nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O hidrolato das folhas secas de *C. argyrophyllus*, ocasionou, a partir de 1 hora de exposição das larvas, um percentual de mortalidade de 6,6%, foi significativamente mais eficaz ($p < 0,05$), quando comparado aos demais extratos (Tabela 1). A partir de 4 horas de exposição, o hidrolato, junto ao resíduo aquoso, foram significativamente mais tóxicos ($p < 0,01$). Com 24 horas de exposição tanto o hidrolato (52,5%) quanto o resíduo aquoso (53,3%) continuam sendo mais tóxicos ($p < 0,01$) quando comparado aos demais extratos, que não apresentaram toxicidade sobre as larvas do *Ae. aegypti* (Tabela 1).

TABELA 1. Percentual de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*, em relação ao tempo de exposição aos diferentes extratos aquosos obtidos a partir das folhas secas de *Croton argyrophyllus*.

Métodos de extração	Mortalidade (%) ¹				
	1 h	4 h	8 h	16 h	24 h
Hidrolato	6,6 ^a	24,2 ^a	33,3 ^a	41,7 ^a	52,5 ^a
Resíduo aquoso	0,0 ^b	10,8 ^{ab}	33,3 ^a	46,7 ^a	53,3 ^a
Infusão	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b
Maceração	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b
Controle	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b

¹Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Hidrolatos representam soluções aquosas de óleos essenciais e apresentam, geralmente, compostos voláteis hidrossolúveis, ricos em princípios ativos (BASER & BUCHBAUER, 2012). LIMA et al., (2006) verificaram a atividade larvicida de hidrolatos obtidos das folhas e caules de espécies pertencentes ao gênero *Croton* sobre o *Ae. aegypti*, e sugeriram que substâncias secundárias presentes no óleo essencial dos respectivos hidrolatos, foram os responsáveis pela ação inseticida, tais como fenilpropanóides, monoterpenos e sesquiterpenos.

A eficácia do resíduo aquoso obtido das folhas secas, quando comparado aos demais extratos aquosos (maceração e infusão), também obtidos a partir das folhas secas, pode ter ocorrido em função do método utilizado para a obtenção do óleo essencial, a hidrodestilação, ou seja, as folhas ficaram em contato direto com a água em ebulição por 3 horas, o que pode ter favorecido a liberação de substâncias bioativas nesse resíduo aquoso.

O hidrolato e os extratos aquosos obtidos das folhas frescas de *C. argyrophyllus*, não apresentaram toxicidade sobre as larvas do *Ae. aegypti*, diferentemente do observado com os extratos e com o hidrolato obtido a partir das folhas secas.

A diferença do potencial larvicida entre os hidrolatos, obtidos a partir das folhas secas e frescas, de *C. argyrophyllus* pode ter ocorrido em função do processo de secagem, visto que a redução do teor de água nas folhas, ocasionado pela secagem, tende a aumentar o percentual do óleo essencial em relação à massa total, aumentando, também, o percentual de componentes bioativos e aromáticos e, conseqüentemente, a presença destes no hidrolato.

Segundo BLANK et al., (2007) a pré-secagem de um órgão vegetal, com vistas à extração de óleos voláteis, aumenta consideravelmente o teor e o rendimento dos mesmos, pelo fato da temperatura afetar a resistência da membrana celular favorecendo assim, maior liberação do óleo essencial durante a hidrodestilação. Diversos trabalhos tem demonstrado

diferença em termos quantitativos da composição química de seus óleos quando obtidos a partir de folhas frescas e secas, tendo com essa última, verificado um aumento no percentual dos seus constituintes (BLANK et al., 2005, BARBOSA et al., 2006, BLANK et al., 2007).

CONCLUSÃO

O hidrolato e o resíduo aquoso obtidos das folhas secas de *C. argyrophyllus* apresentam maior toxicidade sobre as larvas do *Ae. aegypti*, quando comparado aos demais extratos. Contudo, os diferentes extratos obtidos a partir das folhas frescas de *C. argyrophyllus*, não se mostram tóxicos para o *Ae. aegypti*.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, F. D. F.; BARBOSA, L. C.; MELO, E. C.; BOTELHO, F. M.; SANTOS, R. H. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) NE Brown. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1221-1225, 2006.
- BARRETO, C. F. *Aedes aegypti* - resistance to the chemical insecticides and the new control alternatives. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v.1, n. 2, p. 62-73, 2005.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuição para uma agenda de pesquisa. **Estudos avançados**, v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.
- BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils**. Science, technology, and applications CRC Press, 2012. p. 994.
- BLANK, A. F.; COSTA, A. G.; ARRIGONI-BLANK, M. D. F.; CAVALCANTI, S. C.; ALVES, P. B.; INNECCO, R.; SOUSA, I. F. D. Influência da estação, tempo de colheita e secagem em Java citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) voláteis do petróleo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 557-564, 2007.
- BLANK, A. F.; FONTES, S. M.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; ALVES, P. B.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M. C.; RODRIGUES, M. O. Influência do horário de colheita e secagem de folhas no óleo essencial de *Melissa (Melissa officinalis* L.) cultivada em dois ambientes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 1, p. 73-78, 2005.
- CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 500-506, 2011.
- DUARTE, E. H.; PEREIRA, J.; OLIVEIRA, H.; LIMA, H. S.; PEREZ, A.; PILE, E. *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) em algumas ilhas de Cabo Verde: Tipologia dos

criadouros e sua relação com a presença larval. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 3, p. 359-362, 2013.

FARIAS, D. F.; CAVALHEIRO, M. G.; VIANA, M. P.; QUEIROZ, V. A.; ROCHA-BEZERRA, L. C. B.; VASCONCELOS, I. M. Extratos de sementes de leguminosas brasileiras como fontes ricas de compostos larvicida contra *Aedes aegypti* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 3, p. 585-594, 2010.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E.; SARMENTO, U. C. Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

HORTA, M. A. P.; CASTRO, F. I.; ROSA, C. S.; DANIEL, M. C.; MELO, A. L. Resistance of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to temephos in Brazil: A revision and new data for Minas Gerais state. **BioAssay**, v. 6, n. 7, p. 1-6, 2011.

LIMA, M. G. A.; MAIA, I. C. C.; SOUSA, B. D.; MORAIS, S. M.; FREITAS, S. M. Effect of stalk and leaf extracts from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 4, p. 211-214, 2006.

LIMA, W. P.; CHIARAVALLOTI NETO, F.; MACORIS, M. L. G.; ZUCCARI, D. A. P. C.; DIBO, M. R. Estabelecimento de metodologia para alimentação de *Aedes aegypti* em camundongos e avaliação da toxicidade do óleo essencial de *Tagetes minuta* sobre o *Aedes aegypti*. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 638-641, 2009.

LUNA, J. E.; MARTINS, M. F.; ANJOS, A. F.; KUWABARA, E. F.; NAVARRO-SILVA M. A. Susceptibility of *Aedes aegypti* to temephos and cypermethrin insecticides, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 6, p. 842-843, 2004.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W. Study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from Northeast Brazil. **Journal Ethnopharmacol**, v. 97, n. 2, p. 199-206 2005.

OLIVEIRA, G. P.; SILVA, S. L. C. E.; GUALBERTO, S. A.; CRUZ, R. C. D.; CARVALHO, K. S. Atividade larvicida do extrato etanólico da raiz de *Croton linearifolius* sobre *Aedes aegypti*. **Revista Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 442-448, 2014.

POHLIT, A. M.; REZENDE, A. R.; BALDIN, E. L. L.; LOPES, N. P.; NETO, V. F. Plant extract, isolated phytochemicals and plant-derived agents which are lethal to arthropod vectors of human tropical diseases – a review. **Planta Médica**, v. 77, n. 6, p. 618-630, 2011.

SILVA, S. L. C. E.; GUALBERTO, S. A.; CARVALHO, K. S.; FRIES, D. D. Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Revista Biotemas**, v. 27, n. 2, p. 79-85, 2014.

VASCONCELOS, P. F. C. Emergência do vírus Chikungunya: risco de introdução no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 9-10, 2014.

WHO (World Health Organization), 2009. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. New edition. WHO Library. 147p. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf. Acesso em: 13 mar. 2015.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA FOLHA DE *CROTON ARGYROPHYLLUS* SOBRE O *AEDES AEGYPTI* E *MUS MUSCULUS*

Rômulo Carlos Dantas da Cruz¹, Sandra Lúcia da Cunha e Silva², Ivone Antonia de Souza³ Simone Andrade Gualberto², Karine da Silva Carvalho², Frances Regiane dos Santos⁴, Mário Geraldo de Carvalho⁴

¹Discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais – PPGCA da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia UESB. (romulo.carlos@hotmail.com)/ Telefone (77) 81449177.

²Núcleo de Pesquisa em Química Aplicada/Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Praça Primavera, 40, 45700-000, Bairro Primavera, Itapetinga – BA, Brasil.

³Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco. Av. Arthur de Sá, s/n, 50740-521, Recife – PE, Brasil.

⁴Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ. Cep: 21941-902, Brasil.

Resumo

Alguns óleos essenciais obtidos de plantas podem ser utilizados como inseticida botânico, para o controle de vetores. Contudo, visando uma maior segurança no seu uso, faz-se necessário a realização de estudos toxicológicos em animais. Dessa forma, foi feita a avaliação da composição química e da atividade inseticida do óleo essencial obtido de folhas de *Croton argyrophyllus* sobre larvas e fêmeas do *Aedes aegypti*, além da toxicidade aguda sobre *Mus musculus*. Para avaliação da atividade inseticida, utilizaram-se larvas, do terceiro e quarto instar, e fêmeas adultas. A toxicidade aguda foi avaliada utilizando-se fêmeas adultas de camundongos. Paralelamente foi realizada a análise química do óleo essencial. Com relação ao efeito tóxico sobre as larvas do *Aedes aegypti* as menores CL₅₀ e CL₉₀ foram 0,31 e 0,70 mg mL⁻¹ respectivamente, e para atividade adulticida as menores CL₅₀ e CL₉₀ foram 5,92 e 8,94 mg mL⁻¹ respectivamente. A toxicidade aguda intraperitoneal apresentou DL₅₀ de 2000 mg kg⁻¹ e a oral DL₅₀ de 2500 mg kg⁻¹. Os componentes majoritários do óleo essencial foram espatulenol (22,80%), (E) cariofileno (15,41%), α-pineno (14,07%) e biciclogermacreno (10,43%). O óleo essencial é tóxico para o *Aedes aegypti*, necessitando de uma concentração letal média bem inferior a dose letal média necessária para ocasionar a toxicidade aguda.

Palavras-chave: Fitoquímica, Inseticidas botânicos, Dengue, Toxicologia

Introdução

Diversos estudos têm sido desenvolvidos visando avaliar a atividade inseticida dos óleos essenciais, formados por compostos voláteis, como os monoterpenos e fenilpropanóides, substâncias produzidas pelas plantas e que atuam como mecanismo de defesa as intempéries, como, por exemplo, a herbivoria, a competição inter e intraespecífica e o ataque de patógenos, o que confere aos óleos essenciais um potencial inseticida e repelente (Simões et al. 2010; Garcez et al. 2013).

No que diz respeito aos inseticidas botânicos, os óleos essenciais visam oferecer alternativas para o controle de insetos vetores, a exemplo do *Aedes aegypti* Linnaeus., 1762, vetor do vírus da febre amarela, dengue, chikungunya e zika, as quais poderão estar associadas à síndrome Guillain-Barré, uma doença autoimune que pode surgir após infecções por vírus ou bactérias (Tappe et al. 2014; Vasconcelos 2015).

Entre essas doenças, a dengue é considerada segundo a Organização Mundial de Saúde um dos principais problemas de saúde pública do mundo, pois 50-100 milhões de novos casos surgem a cada ano, com grande incidência principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo (WHO 2012). Nesse contexto, o controle vetorial é a principal forma de prevenção dessa doença, a qual vem desafiando e causando perplexidade à sociedade contemporânea, e os óleos essenciais podem representar uma alternativa eficaz para esse problema, frente ao controle do vetor (Teixeira et al. 2011; Pereira et al. 2014).

Na tentativa de controlar o *Ae. aegypti*, os inseticidas químicos sintéticos vêm sendo amplamente utilizados. Contudo, o uso continuado desses produtos tem selecionando populações de insetos resistentes, o que demanda a necessidade de buscar métodos alternativos de controle, a exemplo dos inseticidas botânicos, uma ferramenta a mais a ser utilizada em programas de controle integrado desse vetor e, nesse contexto, os óleos essenciais são considerados eficientes, pois apresentam uma grande variedade de substâncias tóxicas e tende a retardar o desenvolvimento de resistência nos insetos (Garcez et al. 2013; Pereira et al. 2014).

Como sintetizadoras de óleos essenciais destacam-se as espécies do gênero *Croton* L., as quais apresentam compostos de metabólitos secundários que variam desde hidrocarbonetos terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, entre outros, sendo na grande maioria constituídos de derivados fenilpropanóides ou terpenóides, principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos (Simões et al. 2010; Oliveira et al. 2014).

Estudos conduzidos com plantas desse gênero tem mostrado potencial no controle de insetos, como ratificado por Morais et al. (2006), ao analisarem os óleos essenciais obtidos de folhas de *Croton zehntneri* Pax e Hoffm., *Croton argyrophylloides* Muell Arg., *Croton nepetaefolius* Baill. e *Croton sonderianus* Muell Arg. sobre larvas do *Ae. aegypti*. Além do potencial inseticida, atividades farmacológicas também já foram comprovadas, segundo Batatinha et al. (1995), *C. zehntneri* apresenta um amplo uso popular, tendo suas folhas utilizadas na forma de chás, visando o controle de irritabilidade, ansiedade e

convulsões. Esses autores, ao avaliarem a atividade do óleo essencial de folhas dessa espécie no sistema nervoso central de roedores, constataram que o óleo ao ser administrado pela via oral apresentou ação anticonvulsivante, além disso, apresentou uma baixa toxicidade aos animais.

Croton argyrophyllus Kunth., alvo desse estudo, é conhecida vulgarmente como “velame falso” e/ou “marmeleiro”. Encontra-se em países da América do Sul, como o Brasil, a Colômbia, a Bolívia e a Venezuela, distribuída principalmente em vegetações de Caatinga e Cerrado. Suas folhas e flores apresentam importantes propriedades medicinais, o infuso das mesmas é comumente utilizado no tratamento da gripe, dor de cabeça e como tranquilizante (Albuquerque 2007; Silva et al. 2010).

Contudo, diversas plantas apresentam efeitos tóxicos e seu uso inadequado, sem o conhecimento toxicológico, pode originar efeitos adversos e muitas vezes retardados e/ou assintomáticos o que torna imprescindível à avaliação da toxicidade desses vegetais, obtendo uma maior segurança no uso de seus metabólitos com potencial farmacológico (Tapp et al. 2009). Esse mesmo raciocínio deve ser seguido com relação aos inseticidas botânicos, a serem utilizados no controle de insetos vetores.

Pelo exposto, evidencia-se que as plantas têm despertado à atenção das civilizações humanas, que passam a usufruir imensamente das mesmas, visando à utilização dos produtos vegetais (Fonseca e Pereira 2013), seja com fins medicinais ou como inseticidas. Nesse contexto, os produtos de origem vegetais estão sendo cada vez mais pesquisados, visando oferecer alternativas para a cura de doenças e o controle de insetos vetores, haja vista que tais produtos podem oferecer baixo impacto ambiental e, ao mesmo tempo, uma maior segurança no seu uso, além de preços mais acessíveis, o que responde ao novo perfil de consumidores, os quais ampliam a busca por produtos naturais que sejam mais viáveis economicamente e estejam aliados ao engajamento socioambiental (Barreto 2005; Ramos e Tachizawa 2009).

A partir dessas considerações, objetivou-se avaliar a composição química e atividade inseticida do óleo essencial obtido de folhas de *Croton argyrophyllus* Kunth., 1817 sobre larvas e fêmeas do *Aedes aegypti* Linnaeus., 1762 além da toxicidade aguda sobre *Mus musculus* Linnaeus., 1758.

Materiais e métodos

Material vegetal

As folhas de *C. argyrophyllus* foram coletadas na Floresta Nacional Contendas do Sincorá, situada no município de Contendas do Sincorá, Bahia (coordenadas geográficas: S 13°55'15.9" W 041°06'53.9"), no turno matutino, no mês de maio de 2014. As etapas de coleta e identificação da espécie foram supervisionadas por um especialista botânico, e as exsicatas depositadas no herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS 4662).

Extração e rendimento do óleo essencial

As folhas foram postas em estufa de circulação de ar, regulada a 40 °C por 12 horas. Em seguida, 100 gramas desse material, após ter sido triturado, foram colocados em um balão de fundo redondo de 3000 mL, no qual foi adicionado 1,5 L de água deionizada. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação em um destilador de Clevenger modificado, por 3 horas, a uma temperatura de 100 °C. Posteriormente, o óleo foi seco, através da adição de sulfato de sódio anidro, filtrado e acondicionado em um frasco de vidro de cor âmbar, a uma temperatura de -4 °C ± 1 °C, até a realização dos ensaios biológicos e da análise química. O rendimento do óleo essencial foi calculado pelo método de base livre de umidade (BLU), de acordo com a metodologia proposta por Santos et al. (1998).

Análise química do óleo essencial

A composição química do óleo essencial foi analisada com um Cromatógrafo a gás acoplado a um Espectrômetro de Massas (Shimadzu CG-EM, GC-17A/ QP2010 Plus), equipado com coluna capilar *Factor Four-VF-5ms* (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme), utilizando hélio como gás de arraste a uma vazão de 1 mL min⁻¹ e pressão de 12 psi. A programação da temperatura do forno foi de 60 °C a 260 °C (3 °C min⁻¹), depois 10 °C/min até 290 °C, com temperatura do injetor a 220 °C, interface a 310 °C e fonte de íons a 220 °C. Injetou-se 1 µL de solução da amostra em diclorometano a uma razão de *split* 1:30. Os espectros de massas foram obtidos na faixa de varredura de 40-500 u.m.a com energia de impacto de elétrons de 70 eV. As análises quantitativas foram feitas utilizando um cromatógrafo de fase gasosa (HP 5890 Series II) equipado com um

detector de ionização de chama (DIC), nas mesmas condições experimentais e temperatura do detector de 280 °C.

As substâncias do óleo essencial foram identificadas por meio de seus índices de retenção (IR), calculados para cada constituinte através da injeção de uma série de padrões de hidrocarbonetos lineares (C₈-C₂₀) nas mesmas condições da amostra, e comparados com o valor tabelado por Adams (2007), bem como através da comparação com o banco de dados da biblioteca (Nist08).

Ensaio biológicos

Avaliação da atividade adulticida e larvicida

Para a realização dos ensaios biológicos com o *Ae. aegypti*, foram utilizadas larvas do terceiro e quarto instar (4 à 5 dias de vida) e fêmeas adultas (4 dias de emergência), oriundas da colônia estabelecida no Laboratório de Pesquisa de Inseticidas Naturais (LAPIN/ NUPESQ), local de realização dos bioensaios, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), a partir de ovos da linhagem *Rockefeller*, cedidos pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (LAFICAVE), da Fundação Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro. Para a realização dos ensaios biológicos, foi utilizada a metodologia adaptada de *World Health Organization* (1970). Os experimentos foram conduzidos em sala climatizada, com temperatura média de 27 °C e umidade relativa média de 70%.

Para o ensaio larvicida utilizaram-se 30 larvas por repetição, totalizando 120 larvas por tratamento. As larvas foram coletadas com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* de silicone e expostas a cinco concentrações do óleo essencial (4,3; 2,1; 1,0; 0,5 e 0,3 mg mL⁻¹). O óleo essencial foi solubilizado com uma solução de Tween 80 e água deionizada, a 1,80% para o ensaio larvicida e 0,01% para o ensaio adulticida, essas proporções também foram utilizadas para a obtenção das soluções estoque dos grupos controle. As observações de mortalidade das larvas foram realizadas após 2, 4, 8 e 16 horas, a partir do início do experimento.

Para os ensaios adulticida as fêmeas foram acondicionadas em recipientes plástico (5 cm de altura x 7,1 cm de largura), e expostas às concentrações de (20,0; 10,0; 5,0; 2,5 e 1,2 mg mL⁻¹). Cada tratamento foi formado por quatro repetições, com 20 fêmeas por repetição totalizando 80 fêmeas por tratamento. Após 1 hora do início do experimento foi

fornecido alimento aos adultos que consistiu de uma solução aquosa de sacarose a 10%, colocada sob a parte superior dos recipientes, que abrigavam as fêmeas. As observações da mortalidade das fêmeas foram realizadas após 1, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas, a partir do início do experimento.

Para o cálculo das concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀), referentes ao efeito adulticida e larvicida sobre o *Ae. aegypti* utilizou-se a análise de regressão *PROBIT*. A comparação da CL₅₀ e CL₉₀ foi feita através do intervalo de confiança ao nível de 95% de significância.

Avaliação da atividade toxicológica aguda sobre *Mus musculus*

Para o teste de toxicidade aguda, inicialmente obteve-se a aprovação do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), com o número de registro (23076.049863/2015-91). Os experimentos foram conduzidos no Biotério do Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), no período de janeiro a fevereiro de 2015.

Nos ensaios biológicos foram utilizadas fêmeas adultas de camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), pesando entre 30 e 45 gramas e idades entre 90 e 120 dias. Os animais foram divididos em quatro grupos (n=6 animais por dose, sendo 3 animais de cada grupo administrados por via intraperitoneal e 3 pela via oral).

Todos os camundongos foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em condições controladas de iluminação (12 horas de fotofase) e temperatura de 22 ± 2 °C. A alimentação foi suspensa 12 horas antes do ensaio e a água foi liberada *ad libitum*. O óleo essencial foi solubilizado com Tween 80 e água destilada a 1,6%, essa mesma formulação foi utilizada para o grupo controle. Posteriormente, as soluções foram administradas por via intraperitoneal e oral nos camundongos. Para administração por via oral a solução foi introduzida no trato digestório dos animais, através de cânula metálica acoplada a seringa (gavagem). O manejo e cuidado com os animais seguiram os princípios éticos da experimentação animal segundo critérios estabelecidos pelo CEUA.

Para avaliação da toxicidade aguda e determinação da dose letal 50 (DL₅₀) foi utilizada a metodologia preconizada pela Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (Organization for Economic Co-operation and Development-OECD), adotando-se o guia OECD 423/2001, que determina utilizar doses fixas de 2000, 300, 50 e 5 mg kg⁻¹. Após aplicar as doses, foi estimada a categoria toxicológica do óleo essencial, seguindo as especificações do guia.

Os sinais clínicos observados pelas vias de administração foram feitos individualmente, após a administração no período de 60 minutos e, posteriormente, diariamente durante 24 horas, no total de 14 dias. Os sinais clínicos observados foram às diversas reações comportamentais relacionadas com o Sistema Nervoso Central (SNC) (efeitos estimulantes e depressores) e com o Sistema Nervoso Autônomo (SNA). O peso corporal e a mortalidade dos animais também foram observados.

A associação entre o peso dos camundongos e o período de observação foi avaliada a partir do cálculo do coeficiente da correlação de *Pearson*, sendo a sua significância verificada pelo teste t de *Student*, a 5% de probabilidade.

Resultados

O óleo essencial obtido de folhas de *C. argyrophyllus* apresentou efeito tóxico para as larvas do *Ae. aegypti*. Foi observada uma redução das concentrações letais 50 e 90 na medida em que aumentava o tempo de exposição (Tabela 1). Com 16 horas de exposição as concentrações letais 50 (0,31 mg mL⁻¹) e 90 (0,70 mg mL⁻¹) foram significativamente menores, comparadas às demais concentrações letais (Tabela 1).

Tabela 1 Concentração letal 50 e 90 do óleo essencial obtido de folhas de *Croton argyrophyllus*, sobre larvas de terceiro e quarto instar do *Aedes aegypti*, em relação a hora de exposição.

Horário de avaliação	Concentração Letal 50 e 90 (mg mL ⁻¹)			
	CL ₅₀	Intervalo de Confiança	CL ₉₀	Intervalo de Confiança
2	1,41	1,34 – 1,49	3,64	3,34– 4,00
4	0,93	0,89 – 0,98	2,31	2,13– 2,52
8	0,59	0,56 – 0,62	1,32	1,22– 1,43
16	0,31	0,28 – 0,33	0,70	0,65– 0,77

No que diz respeito às concentrações letais 50 e 90 do ensaio adulticida, foi observado que com 1 hora de exposição a CL₅₀ foi de 8,36 mg mL⁻¹ (8,05-8,67) e a CL₉₀ de 13,39 (12,70-14,23), sendo significativamente maiores comparadas as demais concentrações letais (Tabela 2). Nos demais períodos de exposição dos adultos (12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas), as CL₅₀ e CL₉₀ não diferiram entre si (Tabela 2), portanto com 12 horas de exposição já se atinge as concentrações mínimas necessárias para ocasionar 50% e 90% de mortalidade das fêmeas adultas do *Ae. aegypti*.

Tabela 2 Concentração letal 50 e 90 do óleo essencial obtido de folhas de *Croton argyrophyllus*, sobre fêmeas adultas do *Aedes aegypti*, em relação a hora de exposição.

Horário de avaliação	Concentração Letal 50 e 90 (mg mL ⁻¹)			
	CL ₅₀	Intervalo de Confiança	CL ₉₀	Intervalo de Confiança
1	8,36	8,05 – 8,67	13,39	12,70– 14,23
12	6,28	6,07 – 6,50	9,48	9,03– 10,03
24	6,12	5,91 – 6,33	9,11	8,67– 9,63
36	6,12	5,91 – 6,33	9,11	8,67– 9,63
48	6,12	5,91 – 6,33	9,11	8,67– 9,63
60	6,12	5,91 – 6,33	9,11	8,67– 9,63
72	5,92	5,72 – 6,13	8,94	8,51 – 9,63

A análise química do óleo essencial obtido de folhas de *C. argyrophyllus* resultou na identificação de 45 compostos, sendo o espatulenol (22,80%), (E) cariofileno (15,41%), α - pineno (14,07%) e biciclogermacreno (10,43%) os componentes majoritários (Tabela 3).

Tabela 3 Monoterpenos e sesquiterpenos identificados no óleo essencial obtido de folhas de *Croton argyrophyllus*.

Constituintes de <i>C. argyrophyllus</i>	Constituintes (%) ^a	IRL ^b	IK ^c
Monoterpenos hidrocarbonados			
α - Tujeno	0,70	926	930
α - Pineno	14,07	936	939
Canfeno	0,23	951	954
Sabineno	0,73	974	975
β - Pineno	1,05	980	979
Mirceno	0,57	990	990
α - Felandreno	1,02	1009	1002
δ -3 Careno	0,30	1011	1011
α - Terpineno	0,36	1019	1017
α -o Cimeno	1,49	1027	1026
β - Felandreno	0,52	1031	1029
(E)- β - Ocimeno	1,08	1047	1050
γ - Terpineno	0,61	1059	1059
Terpinoleno	0,16	1087	1088
Monoterpenos oxigenados			
1,8 Cineol	5,18	1036	1031
Linalol	0,44	1102	1096
Trans- Pinocarveol	0,17	1145	1139
Cis-Verbenol	0,18	1149	1141
Borneol	0,16	1177	1169
Terpineno-4-ol	0,69	1185	1177
α - terpineol	0,53	1200	1188
Sesquiterpenos hidrocarbonados			
α - Copaeno	0,12	1130	1126
α - Ylangeno	0,47	1378	1375
β - Elemeno	1,74	1392	1390
(E)-Cariofileno	15,41	1428	1419
Aromadendreno	0,57	1443	1441
α - humuleno	2,50	1461	1454
9-epi-(E) Cariofileno	0,56	1465	1466
γ - Gurjuneno	0,54	1480	1477
Germacreno-D	5,69	1488	1485

Continuação, **Tabela 3**

Constituintes de <i>C. argyrophyllus</i>	Constituintes (%) ^a	IRL ^b	IK ^c
β- Selineno	1,01	1494	1490
Biciclogermacreno	10,43	1504	1500
Gemacreno-A	0,53	1514	1509
δ- Cadineno	0,90	1523	1523
Viridifloreno	0,40	1613	1592
Sesquiterpenos oxigenados			
Espatuleno	22,80	1592	1578
Ledol	0,65	1603	1602
Epóxido de Humuleno II	0,82	1619	1608
Cis-cadin-4-7-ol	0,88	1642	1636
Cariofila-4(12),8 (13)-dien-5 α-ol	0,36	1646	1640
α- Muurolol	0,23	1655	1646
α- Cadinol	0,63	1664	1654
Selin-11-en-4- α-ol	0,32	1668	1659
(Z)-α-Santalol	1,25	1680	1675
(Z)-α-Trans-Bergamotol	0,72	1698	1690
Total identificado	99,77%		
Monoterpenos hidrocarbonados	22,89%		
Monoterpenos oxigenados	7,35%		
Sesquiterpenos hidrocarbonados	40,87%		
Sesquiterpenos oxigenados	28,66%		
Rendimento do óleo essencial	0,48%		

^aSubstâncias listadas por ordem de eluição em coluna capilar *Factor Four*/VF-5ms; ^bÍndices de retenção com coluna capilar *Factor Four*/VF-5ms; ^cÍndices de Kovats em coluna capilar DB-5 (ADAMS, 2007).

No que diz respeito à avaliação da toxicidade aguda do óleo essencial obtido de folhas de *C. argyrophyllus*, administrado em camundongos pela via intraperitoneal e oral, diversos sinais clínicos foram manifestados pelas fêmeas, sendo os efeitos proporcionais às doses administradas (Tabela 4).

Tabela 4 Efeitos comportamentais e mortalidade em camundongos administrados intraperitoneal e oralmente com óleo essencial obtido de folhas de *Croton argyrophyllus*, em relação às diferentes dosagens.

Sinais Clínicos	Via intraperitoneal (mg kg ⁻¹)					Via oral (mg kg ⁻¹)				
	5	50	300	2000	GC ¹	5	50	300	2000	GC ¹
1. Sistema Nervoso Central										
Ausência de coordenação motora	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Convulsão tônica crônica	-	-	-	++	-	-	-	-	++	-
Parada cardiorrespiratória	-	-	-	++	-	-	-	-	+	-
Refluxo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.1 Efeitos estimulantes										
Agressividade	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Ambulação aumentada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aumento da respiração	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Autolimpeza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bocejo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ereção de cauda	+	+	+	+++	++	+	+	-	-	+
Espasmos	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Frêmito vocal	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Inversão de macha	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Irritabilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movimento circular	-	-	++	+++	-	-	-	-	-	-

Continuação, Tabela 4

Sinais Clínicos	Via intraperitoneal (mg kg ⁻¹)					Via oral (mg kg ⁻¹)				
	5	50	300	2000	GC ¹	5	50	300	2000	GC ¹
Movimento das vibrissas	+	+	++	-	-	+	+	-	-	++
Movimento estereotipado	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
Reação de fuga	+	+	+	+++	+	+	+	++	-	+
Sacudir a cabeça	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saltos acrobáticos	-	-	++	-	-	-	-	+++	++	-
Tremores grosseiros	-	-	-	+++	-	-	-	-	+	-
1.2 Efeitos depressores										
Ambulação diminuída	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ataxia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catatonía	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cauda em straub	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda do reflexo auricular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ptose palpebral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prostração	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Resposta ao toque diminuída	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sedação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2. Sistema Nervoso Autônomo										
Cianose	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Contorções	-	-	+	+	-	-	-	-	+++	-
Diarreia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dispneia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Distensão abdominal	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Diurese	++	+++	+++	-	++	+	++	++	++	++
Edema de focinho	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Excreção fecal	++	++	-	-	++	+	++	++	-	++
Piloereção	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
Taquipneia	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Salivação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3. Mortalidade (%)	0,0	0,0	33,3	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	33,3	0,0

¹Grupo Controle; Resultado negativo (-), Resultado positivo (+), Resultado positivo moderado (++) e Resultado positivo intenso (+++).

Na Tabela 4, observou-se que o óleo essencial administrado pela via intraperitoneal, na dose de 2000 mg kg⁻¹ ocasionou maior número de sinais clínicos e mais intensos nos camundongos. Os sinais clínicos observados foram: ereção de cauda, espasmos, inversão de macha, movimentos circulares, reações de fuga e tremores grosseiros. Além desses, outros efeitos foram observados sob o SNC (ausência de coordenação motora, convulsão tônica crônica e parada cardiorrespiratória, seguida de óbito), assim como sob o SNA (cianose, contorções, edema de focinho e taquipneia). Por essa via, ocorreu mortalidade somente nas concentrações de 2000 (100,0%) e 300 mg kg⁻¹ (33,3%).

No que diz respeito à administração pela via oral somente na dose de 2000 mg kg⁻¹, foram observados convulsões tônica crônica e parada cardiorrespiratória (Tabela 4). Com relação aos efeitos estimulantes, nessa mesma dose, as fêmeas apresentaram sinais clínicos

menos frequente e mais moderados, comparados aos efeitos apresentados pelos animais administrados pela via intraperitoneal na dose de 2000 mg kg⁻¹ (Tabela 4). Sinais clínicos relacionados ao SNA, também foram manifestados pelas fêmeas administradas oralmente na dose 2000 mg kg⁻¹, tais como: cianose, contorções, distensão abdominal, diurese, edema de focinho, piloereção e taquipneia. Esses efeitos foram mais frequentes e mais intensos nessa dose quando comparada as doses de 300, 50 e 5 mg kg⁻¹ (Tabela 4). Diferentemente da administração pela via intraperitoneal, na via oral ocorreu mortalidade somente na dose de 2000 mg kg⁻¹ (33,3%), conforme demonstrado na Tabela 4.

Não houve mortalidade dos animais tanto na via oral quanto na via intraperitoneal, nas doses em que as fêmeas apresentaram sinais de excreção fecal e diurese, o que não ocorreu nas doses em que os animais apresentaram somente diurese, com 33,33% de mortalidade ou na ausência de ambos, com 100% de mortalidade (Tabela 4). Os saltos acrobáticos manifestados pelos camundongos administrados pela via oral e intraperitoneal nas doses de 2000 e 300 mg kg⁻¹, também podem ter influenciado na redução de mortalidade das fêmeas (Tabela 4). Não foi observado nenhum sinal de efeito depressor do óleo essencial sobre os camundongos (Tabela 4).

Os animais do grupo controle administrados pela via oral e intraperitoneal apresentaram sinais clínicos semelhantes aos efeitos observados nas fêmeas administradas pelas duas vias e submetidas às doses de 50 e 5 mg kg⁻¹, onde não apresentaram mortalidade (Tabela 4).

A análise da toxicidade aguda intraperitoneal do óleo essencial obtido de folhas de *C. argyrophyllus* revelou uma DL₅₀ estimada de 2000 mg kg⁻¹, enquanto a toxicidade aguda oral foi de DL₅₀ 2500 mg kg⁻¹, sendo portanto classificadas nas categorias 4 (média toxicidade) e 5 (ausência de toxicidade), respectivamente, de acordo com a escala do sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS).

No que diz respeito à massa corpórea, pela via intraperitoneal na dose de 2000 mg kg⁻¹ foi observado que o peso dos camundongos diminuiu ao longo do tempo de observação ($\hat{y} = -0,6x + 30,7$ e $R^2 = 1$) (Fig. 1 a), essa correlação apresentou-se como negativa, forte ($r = -1$) e significativa ($p < 0,05$). Vale ressaltar, que por essa via e nessa dosagem 100% dos camundongos foram a óbito já no segundo dia de observação (Fig. 1 a). Na dose de 300 mg kg⁻¹ o peso dos camundongos também diminuiu em relação ao

período de observação ($\hat{y} = -0,78x + 39,56$ e $R^2 = 0,96$) (Fig. 1 b). A correlação encontrada para essa dose foi negativa, forte ($r = -0,98095$) e significativa ($p < 0,05$).

Já nas doses de 50 mg kg^{-1} , 5 mg kg^{-1} e o grupo controle, o peso dos animais aumentou em relação ao período de observação ($\hat{y} = 0,22x + 29,61$ e $R^2 = 0,67$; $\hat{y} = 0,17x + 29,79$ e $R^2 = 0,88$ e $\hat{y} = 0,19x + 38,50$ e $R^2 = 0,81$, respectivamente) (Fig. 1 c, d, e), apresentando correlações positivas, fortes ($r = 0,82256$; $r = 0,93880$ e $r = 0,90862$, respectivamente) e significativas ($p < 0,05$).

Com relação à via oral à medida que o tempo de observação avança o peso dos camundongos diminui nas doses de 2000 e 300 mg kg^{-1} ($\hat{y} = -0,98x + 28,77$ e $R^2 = 0,97$; $\hat{y} = -0,67x + 42,90$ e $R^2 = 0,97$, respectivamente) (Fig. 1 a, b). Essas correlações apresentam-se como negativas, fortes ($r = -0,98626$ e $r = -0,98883$, respectivamente) e significativas ($p < 0,05$). No que diz respeito às doses de 50 mg kg^{-1} , 5 mg kg^{-1} e o grupo controle, o peso dos animais aumentou com o período de observação ($\hat{y} = 0,42x + 34,01$ e $R^2 = 0,90$; $\hat{y} = 0,37x + 31,96$ e $R^2 = 0,94$ e $\hat{y} = 0,16x + 41,07$ e $R^2 = 0,27$, respectivamente), (Fig. 1 c, d, e), apresentando correlações positivas, fortes ($r = 0,95274$, $r = 0,97203$ e $r = 0,52308$, respectivamente) e significativas ($p < 0,05$).

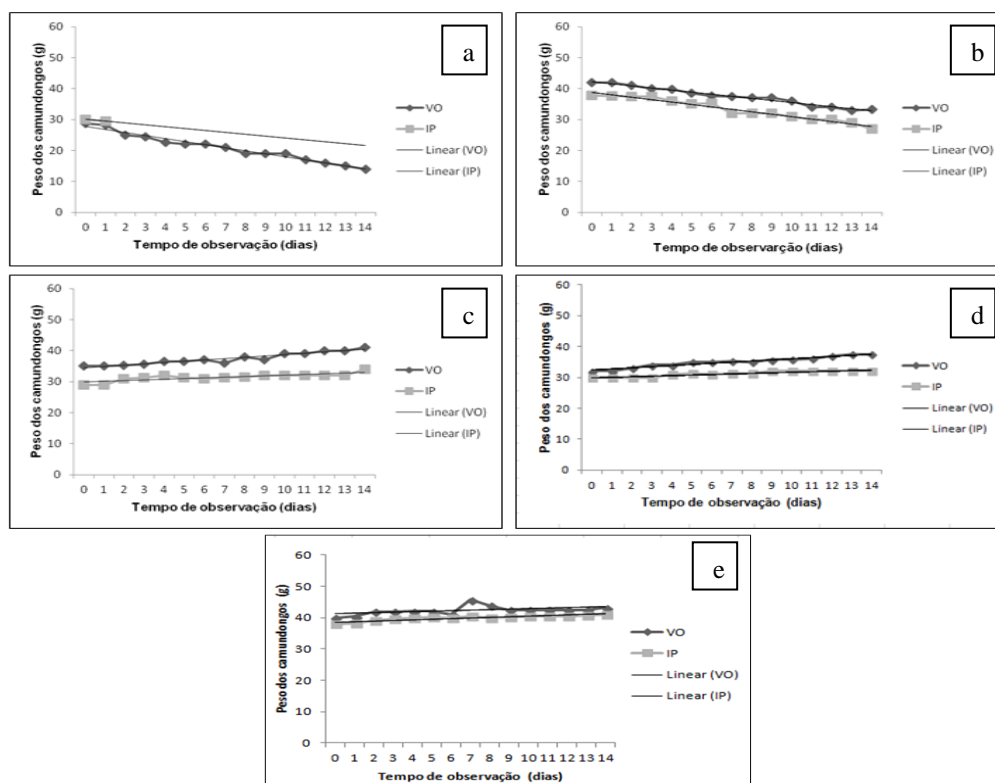


Fig. 1 Peso médio dos camundongos fêmeas que foram administrados com o óleo essencial obtido de folhas de *Croton argyrophyllus* na dose de 2000 mg kg^{-1} (a), 300 mg kg^{-1} (b), 50 mg kg^{-1} (c), 5 mg kg^{-1} (d) e o grupo controle (e); via oral (VO) e intraperitoneal (IP).

Discussão

O potencial inseticida de óleos essenciais tem despertado o interesse da comunidade científica, pois pode contribuir com programas de manejo integrado para o controle de insetos vetores, a exemplo do *Ae. aegypti*, visto que os inseticidas de origem botânica são biodegradáveis e podem apresentar um baixo impacto ambiental, além de retardar os mecanismos de resistência nos insetos.

Morais et al. (2006), após conduzirem estudos com os óleos essenciais obtidos de folhas de plantas do gênero *Croton*, constataram atividade larvicida sobre o *Ae. aegypti* após 24 horas de exposição, e diversas substâncias bioativas foram identificadas, sendo consideradas as principais responsáveis pela atividade larvicida o metileugenol e α -copaeno presentes em *C. nepetaefolius* que apresentou CL_{50} de $0,08 \text{ mg mL}^{-1}$, α -pineno e β -pineno para *C. argyrophyloides* com CL_{50} de $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$, α -pineno, β -felandreno e trans-cariofileno em *C. sonderianus* com CL_{50} de $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$ e o componente anetol presente em *C. zehntneri* com CL_{50} de $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$, sendo esta última considerada a espécie mais promissora para o controle das larvas.

As substâncias α -copaeno, α -pineno, β -pineno e β -felandreno, também foram identificadas no óleo essencial obtido de folhas de *C. argyrophyllus*, as quais podem ter contribuído para o elevado potencial tóxico CL_{50} ($0,31 \text{ mg mL}^{-1}$) e CL_{90} ($0,70 \text{ mg mL}^{-1}$) às larvas do *Ae. aegypti*, após 16 horas de exposição, o que demonstra a mínima quantidade necessária desse óleo, para expressar sua atividade larvicida.

No que diz respeito à avaliação da atividade adulticida, Misni et al. (2011), relataram que o óleo essencial obtido de folhas de *Piper aduncum* L. apresentou CL_{50} de 56 mg mL^{-1} e CL_{90} de 123 mg mL^{-1} sobre fêmeas adultas do *Ae. aegypti*, após 24 horas de exposição, com base nesses resultados tais autores indicam que o óleo essencial dessa planta é promissor e apresenta potencial para ser usado em pulverizadores contra o *Ae. aegypti*.

Diferentemente dos resultados apresentados por Misni et al. (2011), com uma 1 hora de exposição das fêmeas do *Ae. aegypti* ao óleo essencial obtido de folhas de *C. argyrophyllus* já obteve-se uma CL_{50} de $8,36 \text{ mg mL}^{-1}$ e CL_{90} de $13,39 \text{ mg mL}^{-1}$. Além disso, com 12 horas já foram registradas as concentrações mínimas necessárias para ocasionar 50% e 90% de mortalidade das fêmeas adultas (CL_{50} de $6,28 \text{ mg mL}^{-1}$ e CL_{90} de $9,48 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente). Dessa forma, as concentrações letais adquiridas por Misni

et al. (2011), são consideradas elevadas quando comparadas as do óleo essencial de *C. argyrophyllus*.

Os óleos essenciais podem atuar em enzimas digestivas, neurológicas e ainda interagir com o tegumento dos mosquitos. As substâncias lipofílicas são as principais responsáveis por essas ações e apresentam maior penetração no corpo dos insetos, o que tende a aumentar o potencial inseticida dos óleos essenciais e reduzir seu tempo de ação (Isman 2006; Lima et al. 2009).

Entre os compostos lipofílicos presentes nos óleos essenciais responsáveis por tais efeitos destacam-se os sesquiterpeno oxigenados, os quais são apontados como os principais responsáveis pela atividade inseticida sobre o *Ae. aegypti* (Costa et al. 2010). Vale ressaltar que no óleo essencial obtido de folhas de *C. argyrophyllus*, foram identificados diversos sesquiterpeno oxigenados, tendo o espatulenol como majoritário, e de acordo com Cantrell et al. (2005), essa substância é altamente tóxica à adultos do *Ae. aegypti*.

De acordo com Lopez e Pascual-Villalobo (2010), as substâncias γ -terpineno e linalol também são responsáveis pela atividade inseticida dos óleos essenciais, pois inibem a atividade da acetilcolinesterase, enzima de fundamental importância do SNC, sendo que a sua inibição resulta em imobilidade e morte dos insetos. Vale ressaltar que essas substâncias também foram identificadas no óleo essencial obtido de folhas de *C. argyrophyllus*.

Ramos et al. (2013), ao conduzirem estudos do efeito anti-inflamatório do óleo essencial obtido de folhas frescas também de *C. argyrophyllus*, coletadas no estado de Sergipe, detectaram a presença de 42 substâncias, sendo os compostos bicilogermacreno (14,60%), espatulenol (8,27%), (*E*)-cariofileno (6,79%), β -elemeno (6,19%), β -felandreno (5,75%), mirceno (4,81%), e óxido de cariofileno (3,68%), considerados os mais abundantes. Já Araujo et al. (2014), ao analisarem a composição química do óleo essencial obtido de folhas frescas dessa mesma espécie, coletadas no estado de Alagoas identificaram 24 compostos, sendo bicilogermacreno (27,78%), seguido por δ -elemeno (8,67%), β -elemeno (8,50%), prenopsan-8-ol (8,50%), *E*-cariofileno (6,27%), trans-4-dauca (11), 7-dieno (5,97%) e espatulenol (4,83%) os majoritários.

Na presente pesquisa, foram identificadas 45 substâncias, e entre elas o espatulenol (22,80%), (*E*)-cariofileno (15,41%), α -pineno (14,07%), bicilogermacreno (10,43%), germacreno-D (5,69) e 1,8 cineol (5,18), como majoritários. Convém ressaltar, que nesse

estudo, o óleo essencial foi obtido de folhas de *C. argyrophyllus* submetidas à estufa, o que pode justificar a diferença entre os resultados obtidos por Ramos et al. (2013) e Araujo et al. (2014). Além da variação de substâncias, o óleo essencial obtido de folhas de *C. argyrophyllus* submetidas à estufa apresentou um rendimento de 0,48%, superior quando comparado ao rendimento de 0,33% do óleo essencial obtido de folhas frescas da mesma planta quando estudada por Araujo et al. (2014).

Ao submeter as folhas à estufa, visando a extração de óleos essenciais pode aumentar consideravelmente o rendimento dos mesmos, e também, o percentual de componentes bioativos, pelo fato da temperatura afetar a resistência da membrana celular das folhas, favorecendo assim, uma maior liberação do óleo essencial durante a hidrodestilação (Blank et al. 2007). Além disso, o local de coleta das folhas, assim como as condições do solo e os diferentes fatores ambientais, possivelmente exerceram a variação quantitativa e qualitativa das substâncias identificadas, bem como do rendimento dos óleos essenciais, estudados nos diferentes trabalhos.

Quanto à avaliação da toxicidade aguda em camundongos, Lima et al. (2014), relataram que sinais clínicos ligados ao SNC e SNA manifestados por camundongos após serem submetidos a óleos voláteis, são decorrentes de alterações do equilíbrio dos neurotransmissores excitatórios e inibitórios, o que induz um descontrole da condução dos impulsos nervosos.

Portanto, os efeitos estimulantes observados nos camundongos administrados pelas vias intraperitoneal e oral, principalmente nas doses de 2000 e 300 mg kg⁻¹ podem ter ocorrido a partir de substância(s) química(s) excitante(s), como os monoterpenos a exemplo do linalol, α -tujona e borneol, os quais podem interagir com sítios específicos no SNC (Passos et al. 2009), estimulando a liberação de neurotransmissores excitatórios e/ou inibição da recaptção dos mesmos, sendo que a inibição da recaptção aumenta a concentração dos neurotransmissores em contatos com os receptores, o que leva ao aumento da atividade de conexão entre os neurônios (Silva 2002; Rang 2004; Bastos et al. 2011).

No que diz respeito à redução de peso, os camundongos administrados pelas duas vias, nas doses de 2000 e 300 mg kg⁻¹, reduziram o peso a medida que o tempo de observação avançava. Vale ressaltar que as fêmeas submetidas a essas doses foram as que mais manifestaram sinais clínicos, além de serem mais intensos quando comparados às demais doses. De acordo com Mariz et al. (2006), efeitos comportamentais intensos,

podem interferir e desestruturar a musculatura lisa abdominal de camundongos, ocasionando de tal forma complicações gastrointestinais, e, desse modo, prejudicar a ingestão de alimentos.

A perda significativa de peso evidencia sinais de toxicidade, pois esse parâmetro representa um dos principais efeitos que antecedem a mortalidade de roedores, conforme verificado por Mariz et al. (2006), ao analisarem o extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. quando administrado oralmente em ratos ocasionou a perda considerável de peso, seguida de óbito. O mesmo ocorreu com camundongos administrados com o óleo essencial obtido de folhas de *C. argyrophyllus*, mas, somente com animais administrados pela via intraperitoneal nas doses de 2000 mg kg⁻¹ com redução de peso de ($\hat{y} = -0,6x + 30,7$ e $R^2 = 1$) e mortalidade de (100%), 300 mg kg⁻¹ com uma diminuição de peso de ($\hat{y} = -0,78x + 39,56$ e $R^2 = 0,96$) e mortalidade de (33,3%), e com camundongos administrados pela via oral na dose de 2000 mg kg⁻¹ que teve uma redução de peso de ($\hat{y} = -0,98x + 28,77$ e $R^2 = 0,97$) e mortalidade de (33,3%).

Já nas doses de 50 mg kg⁻¹, 5 mg kg⁻¹ e o grupo controle os camundongos administrados tanto oralmente quanto intraperitonealmente não manifestaram perda de peso, assim como ausência de mortalidade. Provavelmente, devido a uma menor intensidade dos efeitos comportamentais manifestados pelos animais, o que tende a não interferir no processo alimentar dos roedores. Sachetti et al. (2009), ao avaliarem a toxicidade aguda do óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke. e sua atividade neurotóxicas em ratas, não relataram efeitos comportamentais de toxicidade, e também não foram observadas diferenças significativas no peso corporal dos roedores.

Dessa forma, pode-se sugerir que efeitos comportamentais poucos expressivos, ausência de perda de peso e ausência de mortalidade em uma determinada dose, pode indicar uma maior segurança quanto ao uso de um determinado produto vegetal. Essas considerações podem ser observadas claramente nas doses de 50 e 5 mg kg⁻¹ do óleo essencial obtido de folhas de *C. argyrophyllus*, que demonstram uma maior segurança, quando se pensa na formulação de um possível inseticida botânico sobre o *Ae. aegypti*.

É importante salientar que somente nas doses em que os camundongos manifestaram sinais de excreção fecal e/ou diurese permaneceram vivos ou tiveram mortalidade reduzida. Conforme Pucci et al. (2010), plantas que estimulam a diurese apresentam a propriedade de eliminar líquidos do organismo, e, dessa forma, atuam na

desintoxicação de vários órgãos intestinais, principalmente os rins, o que pode evitar a presença de sinais clínicos intensos, ou ausência dos mesmos, em roedores tratados.

As folhas de *Echinodorus grandiflorus* Cham. sintetizam óleo essencial composto principalmente por (E) -cariofileno, linalol e α -humuleno (Pimenta et al. 2006). Cardoso et al. (2003), após administrarem oralmente os camundongos com o infuso dessas folhas observaram atividade diurética e, portanto, ausência de toxicidade nos animais. Essas mesmas substâncias presentes nas folhas de *E. grandiflorus* foram identificadas no óleo essencial de folhas de *C. argyrophyllus*, sendo o (E) -cariofileno uma das substâncias majoritárias, que pode, provavelmente, estar ocasionando tal efeito ou agindo em sinergismo com os demais componentes.

Oliveira et al. (1991), ao administrarem oralmente os infusos obtidos de folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. em camundongos observaram um aumento da frequência urinária e de defecação dos roedores, o que levou a diminuição dos sinais clínicos dos animais, não apresentando diferença quando comparados com o grupo controle, além disso verificaram-se uma elevada segurança no uso dessas plantas. Os triterpenos são os principais componentes das folhas dessas espécies e podem estar presentes em seus extratos aquosos, estimulando a excreção fecal juntamente com sais biliares, induzindo a eliminação de toxinas do corpo do animal, o que confere sua resistência (Furtado et al. 2011; Shah et al. 2011; Calou et al. 2014).

Além disso, os saltos acrobáticos também chamam à atenção, pois os camundongos administrados pela via intraperitoneal na dose de 300 mg kg⁻¹ e pela via oral na dose de 2000 mg kg⁻¹ efetuaram, e tiveram mortalidade reduzida (33,3% e 33,3%, respectivamente), assim como os animais administrados pela via oral na dose de 300 mg kg⁻¹ que também efetuaram e não houve mortalidade (Tabela 4). Assim, pode-se sugerir que esse sinal clínico implica no aumento do metabolismo do seu fígado, o que tende a contribuir com a biotransformação de substâncias tóxicas em bioinativas, mantendo, dessa forma, uma considerada resistência do animal. Nessas dosagens houve uma relação negativa entre o peso e o período de observação, o que pode estar relacionado, também, a um aumento do metabolismo. De acordo com Henry (2008), o fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo de toxinas, o que impede a permeância de compostos tóxicos no corpo do animal.

Processos de biotransformação já foram identificados em substâncias presentes no óleo essencial de *Croton cajucara* Benth. sendo comum esses compostos apresentarem

carbonila (α,β)-insaturada, a qual interage com receptores que induzem o metabolismo de agentes tóxicos e posteriormente com enzimas do organismo, tornando substâncias nocivas em inativas, em consequência da exposição de camundongos à substâncias tóxicas (Souza-Brito et al. 1998).

O óleo essencial obtido de folhas de *C. argyrophyllus* não apresentou sinais clínicos depressivos nos camundongos, diferente dos resultados apresentados por Batatinha et al. (1995), que ao avaliarem a toxicidade aguda do óleo essencial obtido de folhas de *C. zehntneri* sugeriram que seus compostos agem exclusivamente na inibição da atividade do SNC, manifestando efeitos depressores nos camundongos. As substâncias majoritárias presentes no óleo essencial de folhas de *C. zehntneri* são anetol e estragol, as quais não foram identificadas no óleo essencial de folhas de *C. argyrophyllus*. Batatinha et al. (1995), além de indicarem mais estudos, confirmaram uma baixa toxicidade para o óleo essencial de *C. zehntneri*.

No que se refere a $DL_{50}=2000 \text{ mg kg}^{-1}$ (média toxicidade) para as fêmeas de camundongo administradas por via intraperitoneal e $DL_{50}=2500 \text{ mg kg}^{-1}$ (ausência de toxicidade) para fêmeas administradas por via oral com o óleo essencial obtido de folhas de *C. argyrophyllus*, Hiruma-Lima et al. (2000), ao analisarem a toxicidade aguda do óleo essencial obtido de cascas de caule de *C. cajucara*, utilizando diferente metodologia, onde o método de cálculo da DL_{50} foi adotado de Litchfield e Wilcoxon (1949), encontraram valores de DL_{50} de 9,26 e 680 mg kg^{-1} para as administrações oral e intraperitoneal respectivamente em camundongos, e consideraram que o óleo essencial dessa espécie também apresenta baixa toxicidade, assim como o óleo essencial obtido de folhas de *C. zehntneri* estudado por Batatinha et al. (1995). Pelo exposto, evidencia-se que os óleos essenciais dessas espécies apresentam categorias de média a baixa toxicidade, mesmo quando extraídos de órgãos diferentes e submetidos a métodos distintos para a determinação da DL_{50} .

A partir dos resultados obtidos e das considerações descritas o óleo essencial obtido de folhas de *C. argyrophyllus*, apresenta uma boa margem de segurança para o seu uso como inseticida botânico a ser utilizado no controle de larvas e adultos de *Ae. aegypti*, pois as concentrações letais que se apresentaram tóxicas em larvas e fêmeas do mosquito foram inferiores as doses letais médias necessárias para ocasionar a toxicidade aguda por via intraperitoneal e por via oral nos camundongos.

Conclusão

O óleo essencial obtido de folhas de *C. argyrophyllus* apresenta-se tóxico às larvas e adultos de *Ae. aegypti* nas concentrações utilizadas, as quais são bem inferiores as doses necessárias para apresentar toxicidade aguda em camundongos, o que mostra uma maior segurança na utilização desse óleo essencial, quando se pensa na formulação de um inseticida botânico para o controle do *Ae. aegypti*. Sua composição química apresentou os componentes espatulenol, (E) cariofileno, α - pineno e biciclogermacreno como substâncias majoritárias.

Agradecimentos À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e ao Biotério do Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) por fornecerem os laboratórios para realização dos bioensaios. Ao Sr. Antonio Correia Freire pelos auxílios nas atividades de campo. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (nº PET 0050/2013) e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro pelos financiamentos concedidos.

Conformidade com as normas éticas O bioensaio realizado no estudo envolvendo animais estava de acordo com o Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA), seguindo os padrões éticos da instituição em que este foi realizado. Esta pesquisa não teve experimentos envolvendo seres humanos.

Conflito de interesse Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Referências

Adams RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4^a ed. Allured publishing corporation, Illions, pp 362

Albuquerque UP (2007) Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of ne Brazil: a quantitative approach. J Ethnopharmacol 114(3):325-354. doi:10.1016/j.jep.2007.08.017

Araujo SS, Santos MIS, Dias AS, Ferro JNS, Lima RN, Barreto EOE, Estevam CS (2014) Chemical composition and essential oil cytotoxicity analysis of *Croton* leaves *argyrophyllus* Kunth. J Essent Oil Res 26(6):446-451. doi:10.1080/10412905.2014.956233

Barreto CF (2005) *Aedes aegypti* - resistance to the chemical insecticides and the new control alternatives. Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos 1(2):62-73

Bastos IVGA, Silva GKC, Rodrigues GCR, Melo CM, Xavier HS, Souza IA (2011) Estudo fitoquímico preliminar e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico bruto de *Caesalpinia echinata* Lam. Rev Bras Farm 92(3):219-222

Batatinha MJM, Souza-Spinosa H, Bernardi MM (1995) *Croton zehntneri*: possible central nervous system effects of the essential oil in rodents. J Ethnopharmacol 45(1):53-57. doi:10.1016/0378-8741(94)01195-6

Blank AF, Costa AG, Arrigoni-Blank MDF, Cavalcanti SC, Alves PB, Innecco R, Sousa, IFD (2007) Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. Rev Bras Farmacogn 17(4):557-564. doi:org/10.1590/S0102-695X2007000400014

Calou IBF, Lima LAR, Ferreira JAN, Cerqueira GS (2014) A atividade gastroprotetora da *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*. Revista Saúde & Ciência Online 3(2):33-42

Cantrell CL, Klun JA, Bryson CT, Kobaisy M, Duke SO (2005) Isolation and identification of mosquito bite deterrent terpenoids from leaves of American (*Callicarpa americana*) and Japanese (*Callicarpa japonica*) beautyberry. J Agr Food Chem 53(15):5948-5953. doi:10.1021/jf0509308

Cardoso GLC, Pereira NA, Lainetti R (2003) Avaliação das atividades antinociceptiva, antiinflamatória e diurética de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*, [Cham. e Schl] Mitch, Alismataceae). Rev Bras Farm 84(1):5-7

Costa JGM, Santos PFD, Brito SA, Rodrigues FF, Coutinho HD, Botelho MA, Lima SGD (2010) Composição química e toxicidade de óleos essenciais de espécies de *Piper* frente a larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Lat Am J Pharm 29(3):463-467. doi:10915/7934

Fonseca CA, Pereira DG (2013) Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. Infarma-Ciências Farmacêuticas 16(8):51-54

Furtado DR, Machado CT, França LM, Pinto BA, Cartágenes MDSS, Freire SM, Borge SMO (2011) Efeito de *cymbopogon citratus* stapf em ratos hiperlipidêmicos. Revista de Ciências da Saúde 13(1):11-19

Garcez WS, Garcez FR, Silva LMGE, Sarmiento UC (2013) Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. Rev Virtual Quim 5(3):363-393. doi:10.5935/1984-6835.20130034

Henry JB (2008) Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. Edição da ISBN Manole 852, Rio de Janeiro, pp 1734

Hiruma-Lima CA, Gracioso JS, Rodríguez JA, Haun M, Nunes DS, Souza Brito ARM (2000) Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol* 69(3):229-234. doi:10.1016/S0378-8741(99)00127-0

Isman, MB (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol* 51(2):45-66. doi:10.1146/annurev.ento.51.110104.151146

Lima CMP, Soares RPF, Bastos, IVGA, Grangeiro ARS, Gurgel APAD, Silva ACP, Souza IA (2014) Avaliação da toxicidade aguda do extrato das cascas de *Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr. *Ver Bras Plantas Med* 16(4):832-838. doi:org/10.1590/1983-084x/10_118

Lima RK, Cardoso MG, Moraes JC, Melo BA, Rodrigues VG, Guimarães PL (2009) Insecticidal Activity of Long-pepper essential oil (*Piper hispidinervum* C. DC.) on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Amaz* 39(2):377-382. doi:org/10.1590/S0044-59672009000200016

Litchfield JA, Wilcoxon F (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther* 96(2):99-113

Lopez MJ, Pascual-Villalobos MD (2010) Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Indust Crops Prod* 31(2):284-288. doi:10.1016/j.indcrop.2009.11.005

Mariz SR, Cerqueira GS, Araújo, WC, Duarte JC, Melo AF, Santos HB, Medeiros IA (2006) Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. *Rev Bras Farmacogn* 16(2):372-378. doi:org/10.1590/S0102-695X2006000300015

Misni N, Othman HT, Sulaiman S (2011) The effect of *Piper aduncum* Linn. (Family: Piperaceae) essential oil as aerosol spray against *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse. *Trop Biomed* 28(2):249-258. doi:20113306809

Morais SM, Cavalcanti ES, Bertini LM, Oliveira CL, Rodrigues JR, Cardoso JH (2006) Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton species* against *Aedes aegypti* L. *J Am Mosquito Contr* 22(1):161-164. doi:org/10.2987/8756-971X(2006)22[161:LAOEOF]2.0.CO;2

Oliveira G P, Silva SLCE, Gualberto AS, Cruz RCD, Carvalho KS (2014) Atividade larvicida do extrato etanólico da raiz de *Croton linearifolius* sobre *Aedes aegypti*. *Revista Enciclopédia Biosfera* 10(18):442-448

Oliveira MG, Monteiro MG, Macaubas C, Barbosa VP, Carlini EA (1991) Pharmacologic and Toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. *J Ethnopharmacol* 34(1):29-41. doi:10.1016/0378-8741(91)90186-H

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (2001) *Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method*. Guideline: 423.

http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL423.pdf. Acessado em: 13 Jan. 2016

Passos CS, Arbo MD, Rates SMK, Poser GLV (2009) Terpenóides com Atividade Sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). *Rev Bras Farmacogn* 19(1):140-149. doi:10.1590/S0102-695X2009000100024

Pereira ÁIS, Pereira ADGS, Sobrinho L, Palma O, Cantanhede EDKP, Siqueira LFS (2014) Antimicrobial activity in fighting mosquito larvae *Aedes aegypti*: Homogenization of essential oils of linalool and eugenol. *Educ quím* 25(4):446-449. doi:10.1016/S0187-893X(14)70065-5

Pimenta DS, Figueiredo, MR, Kaplan MAC (2006) Essential oil from two populations of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli (Chapéu de couro). *An Acad Bras Ciênc* 78(4):623-628. doi:org/10.1590/S0001-37652006000400002

Pucci LL, Cunha LC, Leonice MT, Paula JR, Bozini MC, Freitas PC (2010) Avaliação da Toxicidade Aguda Oral e da Atividade Diurética da *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth.(congonha-de-bugre). *Lat Am J Pharm* 29(1):30-37

Ramos CAO, Tachizawa ÉT (2009) Environmental management and corporate social responsibility: business strategies focused on the Brazilian reality. *Conhecimento & Diversidade* 1(3):123-126

Ramos JMO, Santos CA, Santana DG, Santos DA, Alves PB, Thomazzi SM (2013) Chemical constituents and anti-inflammatory activity potential of the essential oil from *Croton* leaves *argyrophyllus*. *Rev Bras Farmacogn* 23(4):644-650. doi:org/10.1590/S0102-695X2013005000045

Rang HP (2004) *Farmacologia*. 5^a ed. Elsevier, Rio de Janeiro, pp 904

Sachetti CG, Fascineli ML, Sampaio JÁ, Lameira AO, Caldas ED (2009) Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). *Rev Bras Farmacogn* 19(4):937-941. doi:org/10.1590/S0102-695X2009000600025

Santos AS, Andrade EHA, Zoghbi MGB, Luz AIR, Maia JGS (1998) Sesquiterpenes on Amazonian Piper Species. *Acta Amaz* 28(2):127-130. doi:org/10.1590/1809-43921998282130

Shah G, Shri R, Panchal V, Sharma N, Singh B, Mann AS (2011) Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *J Adv Pharm Res Techno* 2(1):3-8. doi:10.4103/2231-4.040,79796

Silva JS, Sales MF, Gomes APS, Carneiro-Torres, DS (2010) Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Bot Bras* 24(2):441-453. doi:org/10.1590/S0102-33062010000200015

Silva P (2002) *Farmacologia*. 6^a ed. Guanabara, Rio de Janeiro pp 334

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (2010) Farmacognosia: da planta ao medicamento, 6^a ed. UFSC, Florianópolis, pp 1104

Souza-Brito ARM, Rodríguez JA, Hiruma-Lima CA, Haun M, Nunes DC (1998) Antiulcerogenic activity of transdehydrocrotonin from *Croton cajucara*. *Planta Med* 64(2):126-129. doi:10.1055/s-2006-957.388

Tappe DRJ, Gabriel M, Emmerich PGS, Held G, Smola S, Schmidt-Chanasit J (2014) First case of laboratory-confirmed Zika virus infection imported into Europe in november 2013. *Euro Surveill* 19(4):23-43. doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.4.20685

Tapp R, Eliel M, Dolan DD, Altschuler RA, Gauvin DV, Baird TJ (2009) Comparison of pigmented and albino guinea pigs for use in ototoxicity modeling. *J Pharmacol Toxicol* 60(2):210-258. doi:10.1016/j.vascn.2009.04.094

Teixeira MG, Costa MDCN, Barreto, ML (2011) Dengue fever continues to challenge and to puzzle. *Cad Saúde Pública* 27(5):828-829. doi.org/10.1590/S0102-311X2011000500001

Vasconcelos PFC (2015) Doença pelo *vírus Zika*: um novo problema emergente nas Américas?. *Rev Pan-Amaz Saude* 6(2):9-10. doi:org/10.5123/S2176-62232015000200001

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2012) Global Strategy For Dengue Prevention and Control 2012-2020. Disponível em: <http://www.who.int/denguecontrol/9789241504034/en/>. Acessado em: 18 set. 2015.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA- ANVISA. RE nº 34 de 16 de agosto de 2010. **Dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos saneantes desinfestantes**. 2010. Disponível em: http://www.cvs.saude.sp.gov.br/zip/U_rdc-anvisa-034_160810pdf.pdf. Acessado em: 24 nov. 2015.

AGRELLO, S. R. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Notificación de su presencia en Uruguay. **Revista médica Urug**, v. 13, n. 2, p. 118-21, 1997.

ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of ne Brazil: a quantitative approach. **Journal Ethnopharmacol**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.

ALVES, J. J. A.; ARAÚJO, M. A.; NASCIMENTO, S. S. Degradação da Caatinga: uma investigação ecogeográfica. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 3, p. 126-135, 2009.

ANJOS, B. T. C.; ALMEIDA, S. E.; SCHMITT, F.; GLAESER, J. C.; VIER, R. P. Revisão Bibliográfica: Características e Diagnóstico da Febre Amarela. **Revista NewsLab**, v. 121, p. 90-98, 2014.

BARATA, E. A. M. F. População de *Aedes aegypti* (L) em área endêmica de dengue, sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 3, n. 35, p. 237-242, 2001.

BARRETO, C. F. *Aedes aegypti* - resistance to the chemical insecticides and the new control alternatives. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v.1, n. 2, p. 62-73, 2005.

BARRETO, M. B.; GOMES, C. L.; FREITAS, J. V. B. D.; PINTO, F. D. C. L.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; TORRES, D. S. C. Flavonoids and terpenoids from *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 675-679, 2013.

BARRETO, M. L. & TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuição para uma agenda de pesquisa. **Estudos avançados**, v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.

BESERRA, E. B.; CASTRO, J. R.; FRANCISCO, P. Biologia comparada de populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti*(L.) (Diptera: Culicidae) da Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 1, p. 81-85, 2008.

BOTREL, P. P.; PINTO, J. E. B. P.; FERRAZ, V.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FIGUEIREDO, F. C. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* EpL. Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010.

BRAGA, I. A. & VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviço de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279-293, 2007.

BRASIL. COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. 2014. Parecer Técnico N° 3964. [Cited 2014 9 set.] Avaliado em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/19374.html>. Acesso em: 23 jun. 2015.

BRASIL, D. D. S. B.; MULLER, A. H.; GUILHON, G. M. S.; ALVES, C. N.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, J. K. R. D.; MAIA, J. G. Essential oil composition of *Croton palanostigma* Klotzsch from north Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1188-1192, 2009.

BROWN, G. G.; CONSTANTINO, R.; LOUZADA, J.; LUIZÃO, F.; MORAIS, J.; ZANETTI, R. A importância da meso e macrofauna do solo na fertilidade e como bioindicadores. **Boletim informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 1, p. 39-43, 2009.

BUSATO, M. A.; CORRALO, V. S.; GUARDA, C.; ZULIAN, V. LUTISKIN, J. A.; BORDIN, S. M. S. Evolução da infestação por *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) nos municípios do oeste do estado de Santa Catarina. **Revista de Saúde Pública**, Florianópolis, v. 7, n. 2, p. 107-118, 2014.

CAMPOS, A. R.; ALBUQUERQUE, F. A. A.; RAO, V. S. N.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. **Rivista de Fitoterapia**, v. 73, n. 2, p. 116-120, 2002.

CARNEIRO, T. D. S. Diversidade de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no bioma Caatinga. **Revista de Feira de Santana**, v. 1, n. 1, p. 387, 2009.

CHIESA, F. A. F. & MOYNA, P. Alcalóides esteroidales. 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**. 5a ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS. 2004. 234 p.

CLARO, L. B.; TOMASSINI, H. C.; ROSA, M. L. Prevenção e controle do dengue: uma revisão de estudos sobre conhecimentos, crenças e práticas da população [Dengue prevention and control: a review of studies on knowledge, beliefs, and practices]. **Cadernos de saúde pública**, v. 20, n. 6, p. 1447-57, 2004.

CONSOLI, R. & OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora Fiocruz, 1994. 225 p.

CORRÊA, J. C. R. & SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 500-506, 2011.

COSTA, M. A. F. & COSTA, M. F. B. **Biossegurança de OGM: (uma visão integrada)**. Rio de Janeiro: Soluções Editoriais Publit, 2009. 183 p.

DONALÍSIO, M. R. & FREITAS, A. R. R. Chikungunya in Brazil: an emerging challenge. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 1, p. 283-285, 2015.

DONALÍSIO, M. R. & GLASSER, C. M. Vigilância epidemiológica e controle de vetores do dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 259-272, 2002.

DÓRIA, G. A.; SILVA, W. J.; CARVALHO, G. A.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C. H. A study of the larvicidal activity of two *Croton* species from northeastern Brazil against *Aedes aegypti*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 6, p. 615-620, 2010.

DUFFY, M. R.; CHEN, T. H.; HANCOCK, W. T.; POWERS, A. M.; KOOL, J. L.; LANCIOTTI, R. S.; HAYES, E. B. Surto de vírus zika em Yap Island, estados federados da Micronésia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009.

FÉ, N. F. **Subgerência de Entomologia**, 2014. Avaliado em: <https://br.groups.com/neo/groups/pgrss/conversations/messages/894>. Acesso em: 22 jul. 2015.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. 1 ed. São Paulo, Brasil, 2002. 864 p.

GAMA, R. A.; ALVES, K. D. C.; MARTINS, R. F.; EIRAS, Á. E.; RESENDE, M. C. D. Efeito da densidade larval no tamanho de adultos de *Aedes aegypti* criados em condições de laboratório. **Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 1, p. 64-66, 2005.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E.; SARMENTO, U. C. Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

GARCÍA, A. Á. & CARRIL, E. P. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca Biología**, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GARCÍA, D. J.; ESCALONA-ARRANZ, J. C.; CARVALLO, M. G.; ROJAS-VARGAS, J.; MACHADO-GARCÍA, R.; ACOSTA, J. D. L. V. Aislamiento y caracterización de metabolitos de hojas de *Croton linearis* Jacq. **Revista Cubana de Química**, v. 27, n. 3, 289-301, 2015.

GIULIETTI, A. M.; CONCEIÇÃO, A.; QUEIROZ, L. P. Diversidade e caracterização das fanerógamas do semi-árido brasileiro. **Associação Plantas do Nordeste**, v.1, p. 488, 2006.

GOELDI, E. A. **Sistema Mosquitos não Pará. Memórias do Museu Goeldi. Pará**, (1905). Avaliado em: <http://www.examiner.com/article/mosquitoes-have-become-deet-immune>. Acesso em: 22 jul. 2015.

GOMES, A. P. S.; VENDAS, M. F.; MELO, A. L. Novidades taxonômicas los *Croton* sect. *Argyroglossum* Baill. e *C. sect. Lasiogyne* Klotzsch (Crotonoideae-Euphorbiaceae). **Acta Botânica**, n. 24, p. 905-908. 2010.

GOMES, E. C. S.; BARBOSA, J.; VILAR, F. C. R.; PEREZ, J. O.; VILAR, R. C.; FREIRE, J. L. O.; LIMA, A. N.; DIAS, T. J. Plantas da Caatinga de uso terapêutico: levantamento etnobotânico. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, v. 5, n. 2, p. 074-085, 2008.

GONÇALVES, L. A.; BARBOSA, L. C. A.; AZEVEDO, A. A.; CASALI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 1, p. 8-14, 2003.

GRASSI-KASSISSE, D. M.; WOLF-NUNES, V.; MIOTTO, A. M.; FARIAS-SILVA, E.; BRITO, A. R. M. S.; NUNES, D. S.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Sensitivity to β -adrenoceptor agonists of adipocytes from rats treated with an aqueous extract of *Croton cajucara* Benth. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 55, n. 2, p. 253-257, 2003.

GURGEL, L. A.; SIDRIM, J. J. C.; MARTINS, D. T.; CECHINEL FILHO, V.; RAO, V. S. Em atividade antifúngica in vitro de sangue de dragão de *Croton urucurana* contra dermatófitos. **Jornal de Etnofarmacologia**, v. 97, n. 2, p. 409-412, 2005.

HARBACH, R. E. **Mosquito Taxonomic Inventory**. 2011. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info>. Acesso em: 18 de jun. 2015.

HINO, P.; SANTOS, C. C. D.; SANTOS, M. O. D.; CUNHA, T. N. D.; SANTOS, C. B. D. Evolução temporal da dengue no município de Ribeirão Preto, São Paulo, 1994 a 2003. **Ciências da Saúde Coletiva**, v. 15, n. 1, p. 233-8, 2010.

HORTA, M. A. P.; CASTRO, F. I.; ROSA, C. S.; DANIEL, M. C.; MELO, A. L. Resistance of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to temephos in Brazil: A revision and new data for Minas Gerais state. **BioAssay**, v. 6, n. 7, p. 1-6, 2011.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

LEAL, I. R.; SILVA, J. D.; TABARELLI, M. A.; LACHER, J. R. T. E. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 139-146, 2005.

LEITE, G. L. D. & ASSOCIADO, I. I. Entomologia Básica. **Tórax**, v. 17, n. 2, p. 20, 2011.

LEWINSOHON, T. M. & PRADO, P. I. Biodiversidade Brasileira: Síntese do Estado Atual do Conhecimento. **BioAssay**, v. 6, n. 7, p. 1-6, 2011, 2000.

LIMA, L. R. & PIRANI, J. R. Revisão taxonômica de *Croton sect. Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neo tropical**, v. 8, n. 2, p. 177-231, 2008.

LIMA, M. G. A.; MAIA, I. C. C.; SOUSA, B. D.; MORAIS, S. M.; FREITAS, S. M. Effect of stalk and leaf extracts from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 4, p. 211-214, 2006.

MACHADO, B. F. M. T. & JUNIOR, A. F. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MACIEL, M. A. M.; CORTEZ, J. K. P. C.; GOMES, F. E. S. O gênero *Croton* e aspectos relevantes de diterpenos clerodanos. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 2, n. 03, p. 12-23, 2006.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARRELLI, Mauro Toledo. Controle de vetores utilizando mosquitos geneticamente modificados. **Revista Saúde Pública**, v. 43, n. 5, p. 869-74, 2009.

MARTINS, L. M. A. Alternativas para o controle biológico do agente transmissor da dengue-*Aedes aegypti* L. **Acervo da Iniciação Científica**, v. 12, n. 1, 2013b.

MARTINS, V. E.; ALENCAR, C. H.; FACÓ, P. E.; DUTRA, R. F.; ALVES, C. R.; PONTES, R. J.; GUEDES, M. I. Distribuição espacial e características dos criadouros de *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti* em Fortaleza, Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 73-77, 2010.

MARTINS, V. P.; SILVEIRA, D. A.; RAMALHO, I. L. *Aedes albopictus* no Brasil: aspectos ecológicos e riscos de transmissão da dengue. **Entomotropica**, v. 28, n. 2, p. 75-86, 2013a.

MELO, E. C.; CORREIA, M. F.; ARAGÃO, M. S. Expansion of irrigated agriculture and changes in processes of surface-atmosphere interaction: a num. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 7, n. 5, p. 960-968, 2014.

MENEZES, E. L. A. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola**. Editora: Seropédica, Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, 2005. 58 p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Quarto relatório nacional para a convenção sobre diversidade biológica: Brasil**. Brasília: MMA, 2011. 248 p.

MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. D. F.; AMORIM, E. D.; STRATTMANN, R. R.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. D. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da Caatinga. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, p. 999-1005, 2005.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S.; BERTINI, L. M.; OLIVEIRA, C. L.; RODRIGUES, J. R.; CARDOSO, J. H. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton species* against *Aedes aegypti* L. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fortaleza, v. 22, n. 1, p. 161-164, 2006.

MOURA, F. M. L.; BAPTISTA, R. I. A. A.; SANTOS, V. V. M.; MOURA, A. P. B L.; COSTA, M. M. Use of plants Caatinga biome in control of pathogens of interest food area - A review. **Acta Veterinária Brasilica**, v. 7, n. 2, p.125-136, 2013.

NEVES, E. D.; FUNCH, L. S.; VIANA, B. F. Comportamento fenológico de três espécies de *Jatropha* (Euphorbiaceae) da Caatinga, semi-árido do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n. 1, p. 155-166, 2010.

OLIVEIRA, G. P.; SILVA, S. L. C. E.; GUALBERTO, S. A.; CRUZ, R. C. D.; CARVALHO, K. S. Atividade larvicida do extrato etanólico da raiz de *Croton linearifolius* sobre *Aedes aegypti*. **Revista Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 442-448, 2014a.

OLIVEIRA, N. D.; SOUZA, D. G.; VIVAS, W. L. P.; SANTANA, W. T. Percentual de positividade sobre o índice de infestações do *Aedes aegypti* em município sergipano. **Sempesq**, v. 2, n. 16, p. 12-15, 2014b.

OLIVEIRA, S. L., CARVALHO, D.; CAPURRO, M. L. Mosquito transgênico: do *paper* para a realidade. **Revista da Biologia**, v. 6, p. 38-43, 2011.

OSTERA, G. R. & GOSTIN, L. O. Biosafety concerns involving genetically modified mosquitoes to combat malaria and dengue in developing countries. **Revista Jama**, v. 305, n. 9, p. 930-931, 2011.

PAEPORN, P.; SUPAPHATHOM, K.; SATHANTRIPHOP, S.; MUKKHUN, P.; SANGKITPORN, S. Insecticide. Susceptibility of *Aedes aegypti* in tsunami-affected areas in Thailand. **Dengue Bulletin**, v. 29, p. 210-213, 2005.

PALENCIA, D. S. Fauna de larvas de mosquitos (Diptera, Culicidae) da área urbana do município de Armação dos Búzios, Rio de Janeiro. **Revista Eletrônica de Biologia (REB)**, v. 5, n. 2, p. 13-30, 2012.

PEREIRA, I. M. Regeneração natural em um remanescente de Caatinga sob diferentes níveis de perturbação, no agreste paraibano. **Acta Botânica Brasílica**, v. 15, n. 3, p. 43-426, 2001.

PEREIRA, R. J. E. & CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PINHEIRO, J. N.; MOREIRA, J., & ROSSATO, A. E. *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (chá-verde) e seus aspectos químicos, farmacológicos e terapêuticos. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 22, n. 1/4, p. 32-41, 2010.

PORSCH, J.; KUBO, R. R.; BALLIVIÁN, J. M. P.; SANTOS, P. P. Saberes da natureza e conhecimento etnobotânico indígena: o caso da comunidade Kaingang na terra indígena do Guarita. **Cadernos de Agroecologia**, v. 8, n. 2, p. 12-33, 2013.

POWELL, J. R. & TABACHNICK, W. J. História da domesticação e propagação do *Aedes aegypti*-A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n.16, p. 11-17, 2013.

RAMOS, J. M. O.; SANTOS, C. A.; SANTANA, D. G.; SANTOS, D. A.; ALVES, P. B.; THOMAZZI, S. M. Constituintes químicos e atividade anti-inflamatória potencial do óleo essencial das folhas de *Croton argyrophyllus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 23, n. 4, p. 644-650, 2013.

RESENDE, M. D. V.; SIMEÃO, R. M.; FERNANDES, J. S. C.; STURION, J. A. Melhoramento genético e seleção em erva-mate (*Ilex paraguariensis*): contribuição e

experiências de um século de melhoramento do chá-da-índia (*Camellia sinensis*). **Boletim de Pesquisa Florestal**, v.16, n. 37, p. 67-79, 1998.

REYNEL, C.; PENNINGTON, T.; PENNINGTON, R.; FLORES, C.; DAZA, A. Árboles útiles de la Amazonía Peruana y sus usos. **Revista ICRAF**, v. 13, n. 34, p. 148, 2003.

RODRIGUES, M. T. Herpetofauna da Caatinga. In: LEAL, M.; TABARELLI, J. M. C. SILVA. Ecologia e conservação da Caatinga. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA J. M. C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife: Editora Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, 2003. 181-236 p.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 31-42, 2010.

ROSA, R. S. N. A.; MENEZES, H. A.; BRITSKI, W. J. E. M.; COSTA, F.; GROTH. Diversidade, padrões de distribuição e conservação dos peixes da Caatinga. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA J. M. C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife: Editora Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, 2003. 135-180 p.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULIETTI, A. M.; VIRGÍLIO, J.; GAMARRA, R. C. F. L. **Vegetação & flora da Caatinga**. Editora: Associação Plantas do Nordeste, Recife, 2002. 123 p.

SANTOS, P. M.; SCHRIPSEMA, J.; KUSTER, R. Flavonoides *O*-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 321-325, 2005.

SARMENTE, S. R. Inseticidas naturais, bioinseticidas e feromônios: solução para a Dengue?. **Sociedade Brasileira de Parasitologia**, v. 2, n. 57, p. 61-8, 2007.

SÁTIRO, L. N. & ROQUE, N. A família Euphorbiaceae nas Caatingas arenosas do médio rio São Francisco, Ba, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 22, n. 1, p. 99-118, 2008.

SCARIOT, A. Panorama da biodiversidade no Brasil. In: GANEM, R. S. **Conservação da biodiversidade: legislação e políticas públicas**. Brasília: Câmara dos Deputados, Edições Câmara. 2010. 111-130 p.

SIANI, A. C.; NAKAMURA, M. J.; TAPPIN, M. R. R.; MONTEIRO, S. S.; GUIMARÃES, A. C.; RAMOS, M. F. S. Composição química de óleo-resinas burseraceae não-voláteis da América do Sul e preliminar solubilidade avaliação da sua mistura comercial. **Revista de Análise Fitoquímica**, v. 23, n. 5, p. 529-539, 2012.

SILVA, C. G. V. Bioatividades de extratos etanólico de *Croton* sobre *Plutella xylostella* (L) e ação fumigante e composição química de óleos essenciais de *Croton grevioides* (BAILL) sobre *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). **Entomologia Agrícola**, v. 1, n. 1, p. 16-56, 2007.

SILVA-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S. Structure elucidation of casbane diterpenes from *Croton argyrophyllus*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 370-373, 2011.

SILVA, J. S.; FÁTIMA, M. Z.; SCOPEL, I. A influência do clima urbano na proliferação do mosquito *Aedes aegypti* em Jataí (GO), na perspectiva da Geografia Médica. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 3, n. 5, p. 33-49, 2008.

SILVA, J. S.; SALES, M. F.; CARNEIRO-TORRES, D. S. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 879-901, 2009.

SILVA, J. S.; SALES, M. F.; GOMES, A. P. S.; CARNEIRO-TORRES, D. S. Sinopse das espécies de *Croton L.* (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 441-453, 2010.

SILVA, M. I. G.; MELO, C. T. V.; VASCONCELOS, L. F.; CARVALHO, A. M. R.; SOUZA, F. C. F. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of northeast Brazil: a review of the literature. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 193-207, 2012a.

SILVA, O. E. & POLETO, C. Monitoramento do *Aedes albopictus* em pequenas comunidades. **Uningá Review**, v. 10, n. 1, p. 25-32, 2012.

SILVA, S. L. C. E.; GUALBERTO, S. A.; CARVALHO, K. S.; FRIES, D. D. Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Revista Biotemas**, v. 27, n. 2, p. 79-85, 2014.

SILVA, S. O.; FERREIRA, R. L. C.; SILVA, J. A. A.; LIRA, M. A.; JUNIOR, F. T. A.; CANO, M. O. O.; TORRES, J. E. L. Regeneração natural em um remanescente de Caatinga com diferentes históricos de uso no agreste pernambucano. **Revista Árvore**, v.36, n. 3, p. 441-450, 2012b.

SILVA, T. S. & FREIRE, E. M. X. Abordagem etnobotânica sobre plantas medicinais citadas por populações do entorno de uma unidade de conservação da Caatinga do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 427-435, 2010.

SIMAS, K. N. Produtos naturais para o controle da transmissão da Dengue. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 46-49, 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, 6a ed., Ed. da UFSC: Florianópolis, 2010. 120-134 p.

SOUZA, P. C. V.; CARVALHO, A. F. F. U.; LIMA, G. P. G.; FREIRE, G. P. FARIAS, D. F. Óleos essenciais de espécies de *Croton* contra *Aedes aegypti* L. (Diptera:Culicidae): Atividade Inseticida e Desenvolvimento de Formulações Repelentes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 1, p. 193-207, 2010.

SOUZA, R. C.; CHIVA, E. Q.; LAMBERTI, M. P. Relação entre as condições ambientais e o número de focos de mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no município de Uruguaiana, RS. **Revista Biodiversidade Pampeana**, v. 6, n. 2, p. 44-48, 2008.

STEINMANN, V. W. Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae em México. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 61-93, 2002.

TAPPE, D. R. J.; GABRIEL, M.; EMMERICH, P.; GÜNTHER, S.; HELD, G.; SMOLA, S.; SCHMIDT-CHANASIT, J. First case of laboratory-confirmed Zika virus infection imported into Europe in november 2013. **Euro Surveill**, v. 19, n. 4, p. 23-43, 2014.

TAPP, R.; ELIEL, M.; DOLAN, D. D.; ALTSCHULER, R. A.; GAUVIN, D. V, BAIRD, T. J. Comparison of pigmented and albino guinea pigs for use in ototoxicity modeling. **Jornal Pharmacol Toxicol Meth**, v. 60, n. 2, p. 210-258, 2009.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.

TEIXEIRA, M. G.; COSTA, M. C. N.; BARRETO, M. L. E o dengue continua desafiando e causando perplexidade. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, n. 5, p. 828-829, 2011.

VASCONCELOS, P. F. C. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas?. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 2, p. 9-10, 2015.

VASCONCELOS, P. F. C. Emergência do vírus Chikungunya: risco de introdução no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 9-10, 2014.

VELLOSO, A. L.; SAMPAIO, E. V.; GIULIETTI, A. M.; BARBOSA, M. R. V.; CASTRO, A. A. J. F.; QUEIROZ, L. P. D.; GONDIM, R. S. **Ecorregiões propostas para o bioma da Caatinga. Ambiental The Nature Conservancy do Brasil**. Recife: Editora da CDU, 2. Ed. 2002. 75 p.

WEAVER, S. C. & REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, p. 328. 2010.

WEBSTER, G. L. Classification of the Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 81:3-32. **Anais do Jardim Botânico de Missouri**, v. 81, n. 1, p. 3-32, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global strategy for dengue prevention an control.** 2012. Disponível em: <http://www.who.int/denguecontrol/9789241504034/en/> >. Acesso em: 13 mar. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Principles and Methods for Evaluating the Toxicity of Chemicals. Parte 1 EHC 6, 1978.

ZANELLA, F. C. V. & MARTINS, C. F. Abelhas da Caatinga: biogeografia, ecologia e conservação. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA J. M .C. (eds.). **Ecologia e conservação da Caatinga.** Recife: Editora Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, 2003. 75-134 p.

ZANLUCA, C.; MELO, V. C. A. D.; MOSIMANN, A. L. P.; SANTOS, G. I. V. D.; SANTOS, C. N. D. D.; LUZ, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015.

ANEXOS

ANEXO I

Normas da Revista Enciclopédia Biosfera

Este edital apresenta as normas para submissão de trabalhos a serem publicados na **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, edição Nº **22/2015**.

1) A Enciclopédia Biosfera é um periódico científico com acesso livre e irrestrito através do site www.conhecer.org.br

2) Podem ser apresentados trabalhos científicos que apresentem resultados. Não são aceitos artigos de revisão bibliográfica.

3) Serão selecionados trabalhos de forma a contemplar o mínimo de 50% de trabalhos inéditos.

4) Por ser uma enciclopédia, são aceitos artigos em quaisquer áreas do conhecimento.

5) Cada autor poderá apresentar até cinco trabalhos por edição, mesmo na condição de autor ou co-autor e cada trabalho poderá ter até 5 pesquisadores.

6) Os trabalhos podem ser enviados por e-mail, na forma de anexo, ao e-mail **biosfera@conhecer.org.br**. é necessário o envio da autorização para publicação sem ônus ao Centro Científico Conhecer, assinada por todos os autores do trabalho, escaneada (modelo no final deste edital). O recebimento dos trabalhos deve acontecer do **dia 01 de janeiro de 2015 até o dia 08 de março de 2015**.

Único: O centro Científico Conhecer envia e-mail de confirmação do recebimento de cada artigo. O e-mail de contato com os autores, informado no artigo, é a **única forma de contato com os autores** a ser utilizada pelo Centro Científico Conhecer.

7) Seleção dos trabalhos: Os trabalhos serão avaliados pela Comissão Técnico-Científica. A confirmação da aprovação ocorrerá até o dia **12 de maio de 2015, para os trabalhos que não forem solicitadas correções**, através do e-mail de contato informado no trabalho. **Para os trabalhos que foram solicitadas correções**, o resultado é informado até o **dia 01 de junho de 2015**.

8) A Comissão Técnico-Científica poderá tomar as seguintes deliberações:

a) Reprovar o trabalho sem observações, nos casos de plágio ou qualidade técnica julgada como insuficiente.

b) Reprovar o trabalho com observações que são informadas aos autores que terão a oportunidade de adequar o trabalho, nos casos de erro no uso de normas da ABNT ou falhas de pequeno comprometimento.

c) Aprovar o trabalho.

9) Do recurso: A decisão sobre os trabalhos aceitos pela Comissão Técnico-Científica, são irrecorríveis.

10) Publicação: Os trabalhos serão publicados em formato PDF, sem restrições, no sitio da revista digital ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, de ISSN Nº 1809-0583. A inscrição do trabalho implica em autorização para sua publicação integral, sem qualquer ônus ao Centro Científico Conhecer. O autor deverá entregar junto à inscrição a declaração de autorização para publicação, em anexo. Cada autor receberá do Centro Científico Conhecer um certificado comprovando a sua publicação. **Os trabalhos serão publicados dia 06 de junho de 2015**.

11) Envio dos certificados de publicação: Será emitido um certificado para cada autor de cada trabalho aceito. No ato do envio do(s) trabalho(s), o(s) autor(es) deve(rão) informar um endereço para o envio do(s) seu(s) certificado(s) de publicação pelo Centro Científico Conhecer.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DE TRABALHOS

- 1) Forma de apresentação: O Trabalho deverá ser apresentado de forma completa – Digitado em formato DOC (**não sendo aceito formato DOCX, PDF ou outro**), contendo Título, nome(s) completo(s) do(s) autor(es) (sem abreviações), e-mail do autor principal, incluindo instituição de origem, cidade e país.
 - 2) O trabalho deve ter: resumo em língua portuguesa, palavras-chave (em ordem alfabética), Título em língua estrangeira, resumo em língua estrangeira (abstract), palavras-chave em língua estrangeira (keywords). O resumo deve ter o máximo de 250 palavras.
 - 3) O trabalho deve apresentar as seções: introdução, objetivos (que podem estar inseridos na introdução), material e método, resultados e discussão, conclusão (se for o caso), referências. A formatação seguirá as normas de: corpo do texto justificado, espaçamento simples, margem superior e esquerda de 3 cm, margem inferior e direita de 2 cm, Escrito em no mínimo 7 páginas e com limite máximo de 30, em papel tamanho A4, com fonte Arial tamanho 12. As páginas não devem ser numeradas.
 - 4) Figuras: Deverão ser apresentadas em formato jpg, com resolução mínima de 300 dpi. Orientamos para que o trabalho tenha preferencialmente tamanho máximo de 1.000Kb. As figuras devem informar a fonte.
 - 5) As situações não previstas devem seguir o que é determinado pelas normas da ABNT. É fundamental observar exemplo de trabalho dentro destas normas.
 - 6) São aceitos trabalhos nos idiomas: **português, espanhol e inglês**.
 - 7) São aceitos artigos nas formas:
 - a - Pesquisa científica com resultados;
 - b - Estudo de caso;
 - 8) Para todas as publicações: devem conter, pelo menos, 50% das referências citadas sendo dos últimos cinco anos.
 - 9) TRABALHOS QUE NÃO ESTIVEREM DENTRO DA FORMATAÇÃO INDICADA NO EDITAL PODERÃO SER RECUSADOS SUMARIAMENTE.
 - 10) As submissões de trabalhos devem ser feitas durante o período de vigência do edital, obedecendo as regras do mesmo.
 - 11) Trabalhos resultantes de pesquisa com pessoas ou animais devem informar o parecer do comitê de ética e número de registro. (esta informação pode ser enviada anexa ao trabalho). Orientações para desenvolvimento do texto:
 - Trabalho científico deve ser escrito de forma impessoal.
 - Referências no texto devem constar na lista final e vice-versa.
 - NÃO SÃO ACEITOS ARTIGOS DE OPINIÃO.
 - Todos os artigos submetidos recebem resposta dos avaliadores e orientações para que os autores possam melhorar seus trabalhos (quando é o caso). Parte de textos de terceiros que não é citada de forma correta é considerado como plágio e o artigo é recusado.
 - 12) Orientamos para a utilização das normas NBR 6023 e NBR 10520 da ABNT.
- Atenciosamente,

Profa. Ivonete Parreira
Presidente da Comissão Editorial e Científica

ANEXO II

Normas da Parasitology Research

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen. Costs of Colour Illustrations

- Online publication of color illustrations is always free of charge.
- For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs of EUR 950 / US\$ 1150 (+ local tax) per article, irrespective of the number of figures in it.

Title Page

- The title page should include:
- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references. **Keywords** Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

- Manuscripts should be submitted in Word.
- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

- Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.
- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full. Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

Nomenclature

The International Code of Zoological Nomenclature (ICZN) must be observed. Genus and species names should be in italics. Authors of scientific names of the genus and species group should not be italicized. At first mention, a specific name should be cited with nomenclatural author and year, e.g. *Catenula lemmnae* (in italics) Dugès, 1832. When three or more joint authors have been responsible for a name, then the citation of the name of the authors may be expressed by use of the term "et al." following the name of the first author, provided that all authors of the name are cited in full elsewhere in the same work, either in the text or in a bibliographic reference. Authors unfamiliar with the taxonomy of the group to which a species belongs should consult an expert to ensure that it is properly identified and that the correct name is used.

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list. Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

- **Journal article**
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8 Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted: Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329
- **Article by DOI**
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
- **Book**
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- **Book chapter**
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- **Online document**
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- **Dissertation**
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California
Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list. This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color. Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer’s online platform SpringerLink.

- Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author.

In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License. Offprints Offprints can be ordered by the corresponding author. Color illustrations Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article. Online First- The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.