

MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA
CURSO DE MESTRADO EM QUÍMICA

Cap DIEGO GOMES DA ROCHA VORIS

**ESTUDOS ETNOFARMACOLÓGICOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS
COMO INSETICIDAS E REPELENTES CONTRA O MOSQUITO
*Aedes Aegypti***

Rio de Janeiro

2018

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Cap DIEGO GOMES DA ROCHA VORIS

**ESTUDOS ETNOFARMACOLÓGICOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS
COMO INSETICIDAS E REPELENTES CONTRA O MOSQUITO
*Aedes Aegypti***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Química do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química em Engenharia Química.

Orientador: Cel Antônio Luís dos Santos Lima - D.Sc.

Rio de Janeiro

2018

c2018
INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA
Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha
Rio de Janeiro – RJ CEP: 22290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá incluí-lo em base de dados, armazenar em computador, microfilmar ou adotar qualquer forma de arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do(s) autor(es) e do(s) orientador(es).

540	Voris, Diego Gomes da Rocha
V953e	Estudos etnofarmacológicos de óleos essenciais como inseticidas e repelentes contra o mosquito <i>Aedes Aegypti</i> / Diego Gomes da Rocha Voris; orientado por Antônio Luís dos Santos Lima – Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2018.
	101p.: il.
	Dissertação (Mestrado) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2018.
	1. Curso de Química – teses e dissertações. 2. <i>Aedes aegypti</i> . 3. Repelente. I. Lima, Antônio Luís dos Santos. II. Instituto Militar de Engenharia.

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Cap DIEGO GOMES DA ROCHA VORIS

**ESTUDOS ETNOFARMACOLÓGICOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS
COMO INSETICIDAS E REPELENTES CONTRA O MOSQUITO
*Aedes Aegypti***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Química do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Química.

Orientador: Cel Antônio Luís dos Santos Lima - D.Sc.

Aprovada em 25 de janeiro de 2018 pela seguinte Banca Examinadora:

Cel. Antônio Luís dos Santos Lima – D.Sc. do IME - Presidente

Prof. José Bento Pereira Lima - D.Sc. do IOC/Fiocruz

Maj. Letivan Gonçalves de Mendonça Filho - D.Sc. do IME

Rio de Janeiro

2018

Dedico este trabalho a Deus, a minha família e a minha companheira Francine.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por ter me dado saúde, força e perseverança para concretização desse sonho.

Aos meus pais, que sempre primaram pela minha educação. Muito obrigado, Sr. Marcus e Sra. Silva Voris por sempre estarem presentes e por todos os sacrifícios que fizeram por mim.

À minha amada esposa, Francine Hauck, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, incondicionalmente. Nos momentos mais difíceis, me pondo para cima e me fazendo acreditar que chegaria ao final desta gratificante etapa. Devido a sua paciência, compreensão, amizade, alegria e especialmente amor, este trabalho pôde ser concluído.

Ao meu orientador Cel Santos Lima, pela confiança e pela infinita disponibilidade, por todos os ensinamentos e pela primorosa condução deste meu trabalho.

Estendo meus agradecimentos aos alunos, professores e funcionários do IME e IOC/Fiocruz, especialmente aos professores José Bento Lima, Josélia Lima, Letivan Filho e Luciana Dias, que com orientações, ensinamento e amizade, me ajudaram neste projeto.

A todas as pessoas, ainda que não citadas aqui, que de alguma forma contribuíram nessa jornada. Muito obrigado!

"É graça divina começar bem. Graça maior é persistir na caminhada certa. Mas a graça das graças é não desistir nunca"

Dom Hélder Câmara

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	12
LISTA DE SIGLAS.....	13
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Justificativa do trabalho.....	18
1.2 Objetivo do trabalho.....	19
1.2.1 Objetivo geral:.....	19
1.2.2 Objetivos específicos:.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 <i>Aedes aegypti</i>	21
2.1.1 O ciclo de vida do <i>A. aegypti</i>	22
2.1.2 Arboviroses transmitidas pelo <i>A. aegypti</i>	25
2.2 Medida de controle do inseto <i>A. aegypti</i>	29
2.2.1 Modo de ação dos inseticidas	30
2.3 Potencial de utilização de produtos vegetais para o controle do inseto vetor <i>A. aegypti</i>	32
2.3.1 Óleo essencial.....	32
2.3.2 Ação dos óleos essenciais como inibidores de AChE e BChE.....	33
2.3.3 Anis-estrelado.....	34
2.3.4 Pimenta da Jamaica	38
2.3.5 Noz moscada	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 Materias	44
3.1.1 Amostras.....	44
3.1.2 Larvas e Mosquitos Testes.....	44
3.1.3 Voluntários humanos	45
3.2 Métodos	45
3.2.1 Análise dos óleos essenciais.....	45
3.2.2 Análise dos óleos essenciais.....	45
3.2.3 Avaliação da Atividade Larvicida dos Óleos Essenciais sobre o mosquito <i>A. aegypti</i>	46
3.2.4 Avaliação da Atividade Adulticida dos Óleos Essenciais sobre o mosquito <i>A. aegypti</i>	47

3.2.5	Avaliação da Atividade Repelente dos Óleos Essenciais sobre o mosquito <i>A. aegypti</i>	48
3.2.6	Avaliação da Atividade Anticolinesterásica dos Óleos Essenciais.....	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	Rendimento das extrações	51
4.1.1	Anis-estrelado.....	51
4.1.2	Pimenta da Jamaica	52
4.1.3	Noz moscada	52
4.2	Características Físico-Químicas do Óleo Essencial	53
4.2.1	Densidade Específica	53
4.2.2	Perfil Cromatográfico.....	54
4.3	Avaliação da Atividade Larvicida	60
4.3.1	Anis-estrelado.....	60
4.3.2	Pimenta da Jamaica	62
4.3.3	Noz moscada	64
4.4	Avaliação da Atividade Adulticida	66
4.4.1	Anis-estrelado.....	67
4.4.2	Pimenta da Jamaica	68
4.4.3	Noz moscada	69
4.5	Avaliação da Atividade Repelente.....	71
4.5.1	Anis-estrelado.....	71
4.5.2	Pimenta da Jamaica	73
4.5.3	Noz moscada	74
4.6	Avaliação da Atividade Anticolinesterásica	75
4.6.1	Anis-estrelado.....	75
4.6.2	Pimenta da Jamaica	77
4.6.3	Noz moscada	78
5	CONCLUSÃO	82
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
7	ANEXO	98
7.1	Anexo 1.....	99
7.2	Anexo 2.....	100

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG. 2.1 Mosquito <i>A. aegypti</i> (Linnaeus 1762).....	21
FIG. 2.2 Distribuição da dengue no mundo em 2013 (Portal da Saúde 2016).....	22
FIG. 2.3 Ciclo de vida do <i>A. aegypti</i> (Neves et al. 2000).....	22
FIG. 2.4 Ovos do <i>A. aegypti</i> (Linnaeus 1762).....	23
FIG. 2.5 Larvas do <i>A. aegypti</i> (Linnaeus 1762).....	24
FIG. 2.6 Pupas do <i>A. aegypti</i> (Linnaeus 1762).....	24
FIG. 2.7 Alguns dos principais agentes inseticidas sintéticos utilizados no controle de mosquitos.....	30
FIG. 2.8 Frutos de anis-estrelado (Romero et al. 2013).....	35
FIG. 2.9 Pimenta da Jamaica: árvore, frutos e folhas (Marinho 2010).....	38
FIG. 2.10 Sementes de noz moscada (Oliveira 2007).....	42
FIG. 3.1 CG-EM.....	46
FIG. 3.2 Teste de repelência.....	49
FIG. 4.1 Perfil cromatográfico do óleo essencial do anis-estrelado.....	55
FIG. 4.2 Estruturas químicas dos principais compostos identificados no óleo essencial do anis-estrelado.....	56
FIG. 4.3 Perfil cromatográfico do óleo essencial da pimenta da Jamaica.....	57
FIG. 4.4 Estruturas químicas dos principais compostos identificados no óleo essencial da pimenta da Jamaica.....	58
FIG. 4.5 Perfil cromatográfico do óleo essencial da noz moscada.....	59
FIG. 4.6 Estruturas químicas dos principais compostos identificados no óleo essencial da noz moscada.....	60
FIG. 4.7 Atividade larvicida do anis-estrelado.....	61
FIG. 4.8 Atividade larvicida da pimenta da Jamaica.....	63
FIG. 4.9 Atividade larvicida da noz moscada.....	65
FIG. 4.10 Atividade antiacetilcolinesterásica do anis-estrelado.....	76
FIG. 4.11 Atividade antiacetilcolinesterásica da pimenta da Jamaica.....	77
FIG. 4.12 Atividade antibutirilcolinesterásica da pimenta da Jamaica.....	78
FIG. 4.13 Atividade antiacetilcolinesterásica da noz moscada.....	79
FIG. 4.14 Atividade antibutirilcolinesterásica da noz moscada.....	79

LISTA DE TABELAS

TAB. 4.1	Rendimento do óleo essencial do anis-estrelado.....	51
TAB. 4.2	Rendimento do óleo essencial da pimenta da Jamaica.....	52
TAB. 4.3	Rendimento do óleo essencial da noz moscada.....	53
TAB. 4.4	Densidade Específica dos óleos essenciais.....	53
TAB. 4.5	Composição química do óleo essencial de anis-estrelado.....	55
TAB. 4.6	Composição química do óleo essencial da pimenta da Jamaica.....	57
TAB. 4.7	Composição química do óleo essencial da noz moscada.....	59
TAB. 4.8	Atividade larvívica do óleo essencial do anis-estrelado nas larvas do <i>A. aegypti</i>	61
TAB. 4.9	Atividade larvívica do óleo essencial da pimenta da Jamaica nas larvas do <i>A. aegypti</i>	63
TAB. 4.10	Atividade larvívica do óleo essencial da noz moscada nas larvas do <i>A. aegypti</i>	65
TAB. 4.11	Atividade adultívica do anis-estrelado após 1 e 24 horas.....	67
TAB. 4.12	Atividade adultívica da pimenta da Jamaica após 1 e 24 horas.....	68
TAB. 4.13	Atividade adultívica da noz moscada após 1 e 24 horas.....	70
TAB. 4.14	Atividade repelente do anis-estrelado.....	72
TAB. 4.15	Atividade repelente da pimenta da Jamaica.....	73
TAB. 4.16	Atividade repelente da noz moscada.....	74
TAB. 4.17	Quadro resumo das atividades dos óleos essenciais.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLO

ABREVIATURAS

ACh	-	Acetilcolina
AChE	-	Acetilcolinesterase
AHJ	-	Análogo de Hormônio Juvenil
<i>A. aegypti</i>	-	<i>Aedes aegypti</i>
BChE	-	Butirilcolinesterase
BPU	-	Inibidores de síntese de quitina
C	-	Controle
CG-EM	-	Cromatografia gasosa - espectrometria de massa
CV	-	Coefficiente de variação
DDT	-	Diclorodifeniltricloroetano
DEN	-	Dengue
DEET	-	N,N-dietil-meta-toluamida
DP	-	Desvio padrão
DPPH	-	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ED	-	Dose efetiva
FIG	-	Figura
IC	-	Concentração de inibição
IE	-	Impacto de elétron
IRL	-	Índice de retenção linear
KC	-	Concentração de knockdown
LC	-	Concentração letal
L3	-	Terceiro estágio
MDA	-	Metilendioxianfetamina
P	-	Proteção
p/p	-	Peso por peso
RI	-	Índice de Retenção
RNA	-	Ácido ribonucleico
SNC	-	Sistema nervoso central

<i>spp</i>	-	Espécies
T	-	Tratado
TAB	-	Tabela
U	-	Unidade

SÍMBOLO

cm ²	-	Centímetro quadrado
cm ³	-	Centímetro cúbico
eV	-	Elétron-volt
g	-	Gramma
h	-	Hora
Kg	-	Quilograma
L	-	Litro
mg	-	Miligrama
min	-	Minuto
mL	-	Mililitro
mm	-	Milímetro
mM	-	Milimol
nm	-	Nanometro
n°	-	Número
ppm	-	Parte por milhão
µg	-	Micrograma
µL	-	Microlitro
°C	-	Grau Celsius

LISTA DE SIGLAS

CEP/HNMD	-	Comitê de Ética do Hospital Naval Marcilio Dias
EMBRAPA	-	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FUNASA	-	Fundação Nacional de Saúde
IBEx	-	Instituto de Biologia do Exército
IME	-	Instituto Militar de Engenharia
IOC	-	Instituto Oswaldo Cruz
ISO	-	Organização Internacional de Normalização
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
RJ	-	Rio de Janeiro
RR	-	Roraima
SP	-	São Paulo
TCLE	-	Termo de consentimento livre e esclarecido
USA	-	Estados Unidos da América

RESUMO

Aedes aegypti é o vetor responsável pela transmissão de agentes patogênicos que causam várias doenças infecciosas, como dengue, zika, febre amarela e chikungunya, que preocuparam as autoridades de saúde nos trópicos. Devido à resistência aos inseticidas e repelentes sintéticos, é necessário descobrir novos agentes para o seu manejo. O objetivo deste estudo foi verificar a atividade larvicida, adulticida e repelente dos óleos essenciais dos frutos do anis-estrelado (*Illicium verum*), dos frutos da pimenta da Jamaica (*Pimenta dioica*) e das sementes de noz-moscada (*Myristica fragrans*) contra o vetor *A. aegypti* (linhagem Rockefeller) e suas atividades inibitórias das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE). Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação e analisados por cromatografia gasosa - espectrometria de massa (CG-EM). As atividades larvicida, adulticidas e repelente dos óleos essenciais foram avaliadas contra as larvas do 3º instar e as fêmeas adultas de *A. aegypti*, conforme procedimentos da Organização Mundial da Saúde e a atividade anticolinesterase dos óleos essenciais pelo método Ellman modificado. Foram identificados os seguintes constituintes principais: anetol (91,12%) no anis-estrelado, metileugenol (55,28%) na pimenta da Jamaica e sabineno (51,95%) na noz-moscada. Todos os óleos essenciais testados exibiram atividade larvicida, adulticida e repelente contra *A. aegypti*. A maior mortalidade larval foi observada na noz-moscada com $LC_{50} = 28,2 \pm 0,6$ mg/L. A mortalidade em adultos foi observada após 1 h (knockdown) e exposição de 24 h, com o maior potencial estabelecido pelo anis-estrelado, $KC_{50} = 7,32 \pm 0,53$ µg/mg fêmea e $LC_{50} = 10,34 \pm 0,54$ µg/mg fêmea. A maior ação repelente foi verificada para a pimenta da Jamaica com $ED_{50} = 0,035 \pm 0,004$ mg/cm². Foi constatada a atividade inibidora de AChE e BChE para todos os óleos essenciais, apenas o anis-estrelado não mostrou inibição da BChE, sendo a maior atividade inibitória da pimenta da Jamaica, tanto da AChE ($IC_{50} = 1,32 \pm 0,19$ mg/mL) quanto da BChE ($IC_{50} = 3,34 \pm 0,07$ mg/mL). Os óleos essenciais foram tóxicos para larvas e adultos de *A. aegypti*, além de serem menos tóxicos para os seres humanos do que os inseticidas atualmente utilizados, abrindo a possibilidade de elaboração de um inseticida natural, seguro e ecológico para o controle do vetor.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; Óleos essenciais; Larvicida; Adulticida; Repelente; Anticolinesterase.

ABSTRACT

Aedes aegypti is the vector responsible for transmitting pathogens that cause various infectious diseases, such as dengue, zika, yellow fever and chikungunya, which have worried health authorities in the tropics. Due to resistance to synthetic insecticides and repellents, there is necessary to discover new agents for manage them. The aim of this study was to verify the larvicidal, adulticidal, repellent activities of the essential oils of the star anise fruits (*Illicium verum*), allspice fruits (*Pimenta dioica*) and nutmeg seeds (*Myristica fragrans*) against vector *A. aegypti* (strain Rockefeller) and their inhibitory activities of the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). The essential oils were extracted by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The larvicidal, adulticidal and repellent activities of essential oils were evaluated against 3rd instar larvae and *A. aegypti* adult females, according to World Health Organization procedures and the anticholinesterase activity of the essential oils by the modified Ellman method. The following major constituents were identified: anethole (91.12%) in star anise, methyleugenol (55.28%) in allspice and sabinene (51.95%) in nutmeg. All essential oils tested exhibited larvicidal, adulticidal and repellent activities against *A. aegypti*. The highest larval mortality was observed in nutmeg with $LC_{50} = 28.2 \pm 0.6$ mg/L. Adult mortality was observed after 1 h (knockdown) and 24 h exposure, with the highest potential established by the star anise, $KC_{50} = 7.32 \pm 0.53$ μ g/mg female and $LC_{50} = 10.34 \pm 0.52$ μ g/mg female. The highest repellent action was observed for allspice with $ED_{50} = 0.035 \pm 0.004$ mg/cm². The inhibitory activities of AChE and BChE for all essential oils was verified, only the star anise showed no inhibition of BChE, being the highest inhibitory activity of the allspice, both AChE ($IC_{50} = 1.32 \pm 0.19$ mg/mL) and BChE ($IC_{50} = 3.34 \pm 0.07$ mg/mL). The essential oils were toxic to larvae and adults of *A. aegypti*, as well as being less toxic to humans than the currently used insecticides, opening the possibility of elaboration of a natural, safe and ecological insecticide for vector control.

Keywords: *Aedes aegypti*; Essential oils; Larvicide; Adulticide; Repellent; Anticholinesterase.

1 INTRODUÇÃO

Diversas doenças reemergentes como a febre amarela, dengue, zika, chikungunya são consideradas nas regiões tropicais do planeta como um dos principais problemas de saúde pública mundial pois causam milhões de mortes por ano e geram grandes perdas econômicas. Essas arboviroses são transmitidas por insetos vetores da família *Culicidae*, como principal exemplo, o *A. aegypti* (Beltrán-Silva et al. 2016).

Devido a sua grande capacidade de adaptação, o mosquito *A. aegypti*, originalmente da África, espalhou-se pelo mundo a partir do século XVII. Desde esta época, existem casos documentados das doenças provocadas por ele em quase todos os continentes, menos na Antártida (Garcez et al. 2013). No Brasil existem relatos de surtos de dengue em meados do século XIX, mas, a primeira epidemia, laboratorialmente confirmada, foi registrada na cidade de Boa Vista-RR na década de 1980, seguindo um avanço da doença nas Américas. Já na região sudeste, a entrada do primeiro sorotipo da dengue ocorreu no Estado do Rio de Janeiro, em 1986, espalhando de forma desgovernada para o resto do país (Teixeira et al. 2001). A incidência dessas doenças tem aumentado rapidamente em todo mundo nas últimas décadas, incluindo-se a dengue cujas projeções apontam 390 milhões de infecções por dengue por ano, sendo 96 milhões com manifestação clínica. Um dado preocupante se for considerado que há, aproximadamente, 2,5 bilhões de pessoas vivendo em países, como Índia e México onde a dengue é endêmica (Bhatt et al. 2013). No Brasil, o maior surto de dengue foi em 2013, com aproximadamente dois milhões de casos notificados, já em 2015 foi relatado mais de 1,5 milhões de casos, cerca de 3 vezes maior do que em 2014 (587,8 mil) (Brasil 2017). Outro problema recente de saúde pública no Brasil foi a ocorrência de chikungunya e zika, arboviroses transmitidas pelo *A. aegypti*, e que apresentam um alto ritmo de incidência no país (Brasil 2017).

Apesar de avanços recentes nas pesquisas para a busca de vacinas, apenas para a febre amarela existe disponibilidade de uma vacina de longa duração, cerca de 10 anos (Rothman 2004). Com isso, a medida de controle utilizada para se evitar essas arboviroses continua sendo o combate ao seu principal vetor urbano, o *A. aegypti*. Como os mosquitos adultos habitam locais de difícil acesso, o método de controle ideal

é a eliminação das larvas (Coller & Clements 2011). As técnicas utilizadas para o controle das larvas e dos mosquitos *A. aegypti* são baseadas no emprego de peixes larvófagos das espécies *Poecilia spp*, *Xiphophorus maculatus* e *Gambusia affinis*; do bioinseticida *Bacillus thuringiensis* sorotipo H-14; dos inseticidas químicos das classes dos carbamatos (carbaril), piretróides (cipermetrina) e organofosforados (temephos) e também dos reguladores de crescimento, como AHJ (Análogos de Hormônio Juvenil) e BPU (inibidores de síntese de quitina) (Hoeveler 2016).

Contudo, com o uso prolongado e contínuo de compostos sintéticos, tem apresentado diversas desvantagens, dentre elas está a seleção de indivíduos resistentes ao inseticida, beneficiando o aumento das populações de mosquitos mais tolerantes e menos sensíveis ao produto e, com isso, promovendo uma redução gradual na eficácia dos inseticidas até a sua absoluta ineficiência, inviabilizando o controle das doenças. Além disso, outros efeitos indesejados também são observados, como a contaminação do meio ambiente e a toxicidade a outros organismos não alvos, e aos seres humanos (Niculau et al. 2013).

Para combater essa população resistente, há a necessidade da busca de novos compostos para realizar o manejo de inseticidas. Assim, as plantas podem ser uma alternativa, pois além de serem organismos que coevoluem com insetos e outros microrganismos, elas também são fontes naturais de substâncias antimicrobianas e inseticidas, já que necessitam se defender de um ataque patogênico (fungos, bactérias e vírus) e de um ataque herbívoro. Inúmeros compostos voláteis (aldeídos, ácidos e terpenos) apresentam grande importância por serem considerados compostos altamente bioativos, sendo denominados fitoalexinos (Grayer & Kokubun 2001). Dentre esses compostos voláteis, existem os fenilpropanóides e terpenos que são sintetizados por algumas espécies vegetais que podem ter propriedades atrativas (polinização e alimentação) ou/e inseticida.

Nas últimas décadas, óleos essenciais obtidos de diversas plantas mostraram elevado potencial inseticida. Os requisitos para um inseticida ideal compreendem: alta toxicidade contra os insetos, biodegradabilidade, eficácia em pequenas concentrações, baixa ou inexistente toxicidade para animais superiores e ausência de fitotoxicidade. Dificilmente todas essas propriedades são encontradas reunidas em uma única substância (Nath & Kumar 1999).

Nas últimas décadas, diversos estudos mostraram que os óleos essenciais, reconhecidos por suas propriedades fungicidas, bactericidas e anti-inflamatórias, dentre

outras, possuem eficácia no combate a insetos (Carson et al 2006). Por exemplo: *Cymbopogon winterianus* Jowitt (citronela), *Cymbopogon citratus* Stapf (capim-limão), *Lippia sidoides* Chamisso (alecrim pimenta), *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca), *Ocimum tenuiflorum* L. (manjeriço pequeno), *Ocimum basilicum purpurascens* Benth (manjeriço roxo), *Tagetes minuta* L. (cravo-de-defunto), *Vanillosmopsis arborea* Baker (candeeiro) e *Citrus limon* L. (limão) (Maria & Silva 2005).

Um dos modos de ação dos inseticidas sintéticos é a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) no sistema nervoso central (SNC). Insetos resistentes apresentam mutações na conformação do sítio ativo da AChE, impedindo a ligação do inseticida com a enzima, não ocorrendo a inativação da mesma, diminuindo, assim, a sensibilidade por estes inseticidas (Hemingway & Ranson 2000). Alguns estudos têm relatado a atividade anti-acetilcolinesterásica dos óleos essenciais e de seus constituintes no *Aedes albopictus* (Seo et al 2015).

O anis-estrelado (*Illicium verum* Hook. F.), pimenta da Jamaica (*Pimenta dioica* (L.) Merr.) e noz-moscada (*Myristica fragans* Houtt.) são plantas nativas da China, América Central e Indonésia, respectivamente. Elas são ricas em óleos essenciais e são usadas na medicina popular para o tratamento de várias doenças, incluindo: cólicas abdominais, vômitos, dor lombar, tosse, bronquite, flatulência, falta de apetite, no tratamento de insônia e nervosismo (Freire 2008; García-Fajardo et al. 1997; Valente et al. 2005). Estas plantas são conhecidas por suas qualidades culinárias e terapêuticas, no entanto, existem poucos estudos sobre suas propriedades inseticidas e repelentes contra o *A. aegypti*.

Dessa forma, é imprescindível a busca de novas possibilidades seguras ambientalmente, adequadas e mais efetivas no planejamento ao combate à larva do *A. aegypti*. Uma alternativa atual nessa direção é a análise e o estudo de produtos de origem vegetal com propriedades inseticidas por ser um produto natural, abundante e facilmente acessível.

1.1 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Em face da ausência de vacina contra as diversas doenças causadas por patógenos transmitidos pelo mosquito *A. aegypti*, o controle do vetor representa-se como a única

alternativa na redução desta afronta a saúde humana. Hoje em dia, o método de controle ao mosquito é o uso continuado de inseticidas químicos sintéticos que tem levado à seleção de populações resistentes.

Com relação ao imenso potencial que as plantas possuem como fonte de substâncias com atividade larvicida, a quantidade de informações ainda é muito limitada. Se considerar a imensa diversidade da flora brasileira e com base nos resultados significativos que vêm sendo demonstrados nos trabalhos que buscam substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *A. aegypti*, as espécies vegetais existentes nos diversos biomas do Brasil tornam-se, desse modo, uma fonte potencial e eficiente de promissores agentes para o controle deste mosquito com baixa toxicidade a outros organismos vivos, incluindo os seres humanos.

Assim, o trabalho em questão visa viabilizar um bioinseticida como produto alternativo que possa ser integrado ao controle químico existente e que reduza a velocidade de seleção dessas populações resistentes.

1.2 OBJETIVO DO TRABALHO

1.2.1 OBJETIVO GERAL:

Estudar quimicamente o óleo essencial das plantas pimenta da Jamaica (*Pimenta dioica* (L.) Merr.), anis-estrelado (*Illicium verum* Hook. f.) e noz moscada (*Myristica fragans* Houtt.), e avaliar suas atividades inseticidas e repelência no controle do mosquito vetor *A. aegypti*; e avaliar suas atividades anticolinesterásicas.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

a. Extrair por hidrodestilação, em aparelho Clevenger modificado, o óleo essencial dos frutos da pimenta da Jamaica e do anis-estrelado e das sementes da noz moscada;

- b. Analisar e comparar as porcentagens (massa de óleo/massa de material seco) de óleo essencial extraído dos frutos;
- c. Analisar e identificar as substâncias voláteis dos óleos essenciais através da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM);
- d. Determinar a concentração letal de *Pimenta dioica*, *Illicium verum* e *Myristica fragans* em larvas do 3º estágio de *A. aegypti*;
- e. Avaliar o efeito adulticida dos óleos essenciais em fêmeas adultas *A. aegypti*;
- f. Analisar a atividade de repelência em diferentes concentrações dos óleos essenciais em fêmeas de *A. aegypti*; e
- g. Verificar a atividade inibitória dos óleos essenciais sobre as enzimas AChE e BChE.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *AEDES AEGYPTI*

O mosquito *A. aegypti* (Figura 2.1) é o principal vetor responsável pela transmissão de diversos patógenos em todo o mundo. O nome *Aedes* é proveniente do grego (ἀηδής – aēdēs) que significa “odioso” e *aegypti* deriva-se do latim, referindo-se ao Egito, sendo uma nomenclatura taxonômica formalizada cientificamente de um mosquito conhecido popularmente como mosquito-da-dengue ou pernilongo-rajado (Ferreira 1986). Pertencente à família *Culicidae*, o inseto é reconhecido por suas manchas brancas sobre as patas e pelo escudo ornamentado com escamas branco prateado em forma de lira na superfície do tórax. É um mosquito apto a sobreviver em zonas urbanas, utilizando preferencialmente recipientes artificiais com água parada como criadouros, podendo ser tanto os abandonados pelo homem a céu aberto ou como aqueles utilizados para armazenar água para uso doméstico. Embora estudos mostrem seu desenvolvimento em água poluída. (Silva et al. 2002).



FIG. 2.1 Mosquito *A. aegypti* (Linnaeus 1762)

O *A. aegypti* foi introduzido nas Américas através de embarcações oriundas da África trazendo escravos no período colonial no século XVII, sendo hoje considerado cosmopolita, devido a sua grande capacidade de adaptação e por estar presente em quase todos os continentes, menos na Antártida. (Garcez 2013). Conforme a Figura 2.2 observa-se que a ocorrência do mosquito *A. aegypti* se manifesta em mais de 23 países do continente americano, além de regiões tropicais e subtropicais da África, da Ásia e da Oceania. Vê-se também que o mosquito está distribuído em quase todas as regiões do

território brasileiro, sendo litoral o mais suscetível a epidemias de doenças causadas pelo vetor, como a dengue, a chikungunya e a zika.

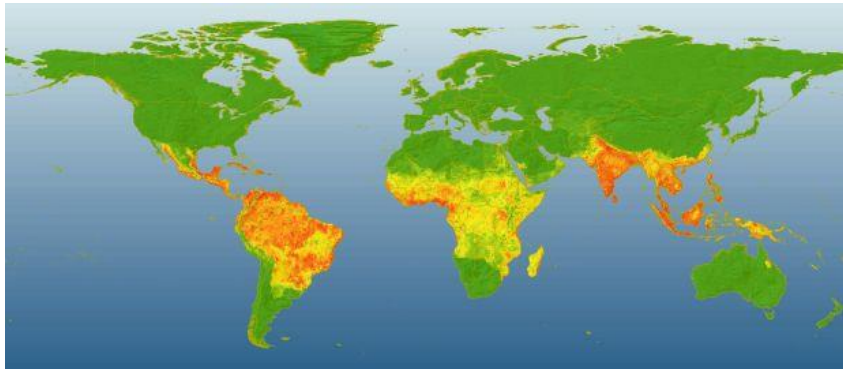


FIG. 1.2 Distribuição da dengue no mundo em 2013 (Portal da Saúde 2016)

2.1.1 O CICLO DE VIDA DO *A. AEGYPTI*

O entendimento do ciclo de vida do mosquito auxilia na melhoria das formas de combate a esse vetor. O *A. aegypti* é uma espécie encontrada em locais de maior concentração humana, incluindo domicílios, onde possa encontrar condições favoráveis à sua procriação. As fêmeas são hematófagas (alimentam por sucção de sangue de mamíferos) aos horários diurnos e voam de 100 a 200 metros para se alimentarem, podendo chegar até a 2500 metros, caso não encontrem alimento, mostrando assim um grande alcance (Neves et al. 2000). Seu ciclo de vida se desenvolve por metamorfose completa, compreendendo as seguintes fases: ovo, quatro estádios larvais, pupa e inseto adulto (Figura 2.3) (Dengue 2003).

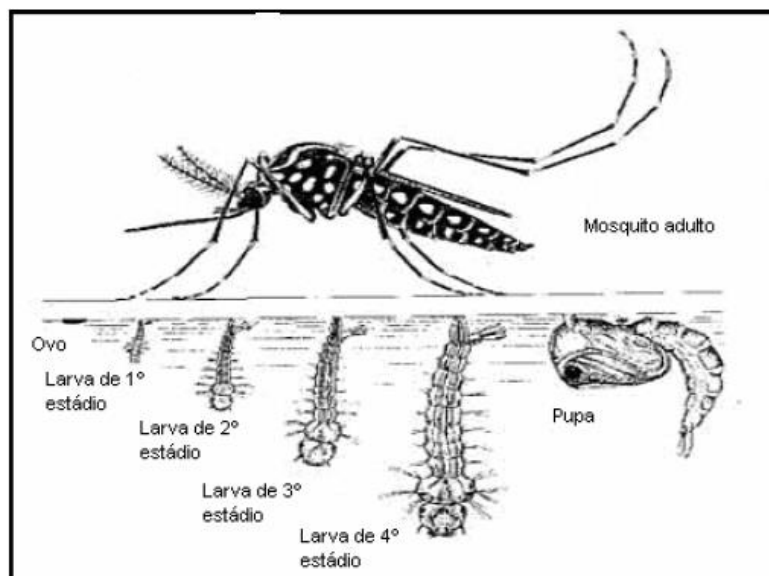


FIG. 2.3 Ciclo de vida do *A. aegypti* (Neves et al. 2000)

2.1.1.1 O OVO

O ovo do *A. aegypti* (Figura 2.4) apresenta-se branco no momento da postura, mas ficam com coloração negra brilhante nas primeiras 24 horas. O desenvolvimento embrionário, em condições favoráveis, dura 48 horas, após esse período, torna-se consideravelmente mais resistentes, sendo capaz de resistir longos períodos de dessecação.



FIG. 2.4 Ovos do *A. aegypti* (Linnaeus 1762)

Ele mede aproximadamente 1 mm de comprimento, com contorno fusiforme e alongado, sendo depositado individualmente, próximo à lâmina da água nas paredes dos criadouros (Dengue 2003). Conforme dados da FUNASA (2002), a eclosão dos ovos acontece com até 450 dias quando colocado em contato com a água. Devido a sua grande resistência à dessecação, torna-se um problema sua erradicação, já que podem ser transportados a grandes distâncias em recipientes secos, o que o torna o principal meio de dispersão e proliferação do inseto (dispersão passiva).

2.1.1.2 A LARVA

A larva possui aspecto vermiforme, sifão grosso, curto e coloração mais escura que o corpo. Ela se alimenta de substâncias orgânicas, bactérias, fungos e protozoários presentes na água e movimenta-se com rapidez e em forma de serpente, como um “S”. A fase de larva (Figura 2.5) possui 4 estádios evolutivos, sendo que a duração desta fase é em média 7 dias, dependendo da alimentação e da temperatura do ambiente (25 a 29°C), pode chegar a 10 dias ou mais de duração. Nessa fase, devido a sua grande

vulnerabilidade, a larva é o alvo preferencial das ações de combate do Programa Nacional e Combate do Dengue (PNCD) (Dengue 2003).

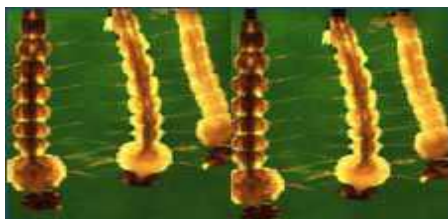


FIG. 2.5 Larvas do *A. aegypti* (Linnaeus 1762)

2.1.1.3 A PUPA

A pupa possui a forma de vírgula e é o último estágio da fase aquática (Figura 2.6). A duração da fase é de 2 a 3 dias, e seu corpo escurece conforme se aproxima o momento da emergência do adulto. Durante este período a pupa não se alimenta, apenas respira, possui grande mobilidade quando perturbada e raramente é afetada pela ação de larvicidas (Dengue 2003).



FIG. 2.6 Pupas do *A. aegypti* (Linnaeus 1762)

2.1.1.4 O ADULTO

Na fase adulta, seu corpo é escuro, possui um desenho em forma de lira no mesonoto e faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais. Tanto macho quanto a fêmea alimentam-se de sulcos e néctar vegetais (carboidratos) até a fase do acasalamento. Eles podem acasalar após 24 horas de emergirem e pode acontecer durante o voo ou quando pousados sobre alguma superfície. Apenas uma única

inseminação é capaz de fecundar todos os ovos que a fêmea produzirá durante sua vida. A partir desse momento, a fêmea se alimentará de repasto sanguíneo que fornece as proteínas necessárias para a maturação e desenvolvimento dos ovos. Geralmente, a busca por esse alimento acontece nas primeiras horas da manhã e ao anoitecer. A cada repasto sanguíneo a fêmea faz uma postura, o que acontece geralmente no fim da tarde, sendo que o intervalo entre a postura e a alimentação é de 3 dias (Silva et al. 2002; Dengue 2003).

2.1.2 ARBOVIROSES TRANSMITIDAS PELO *A. AEGYPTI*

O mosquito *A. aegypti* é principal vetor responsável pela transmissão de diversos patógenos responsáveis por doenças reemergentes como a febre amarela urbana, dengue, chikungunya e zika que são consideradas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta como um dos principais problemas de saúde pública mundial (Beltrán-Silva et al. 2016).

2.1.2.1 DENGUE

A dengue é a mais frequente das infecções arbovirais humanas, causado por um vírus do gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae* e que inclui cinco tipos imunológicos: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e o mais recente DENV-5 (Mustafa et al. 2015). Em geral, vírus constituídos por RNA, como os Flavivírus, costumam apresentar muitas mutações, porém não é o caso do vírus da dengue, pois pouco se modificou nos últimos anos (Tauil 2001).

A doença manifesta-se sob duas formas principais. A forma benigna tem sintomas semelhantes aos de uma gripe forte, conhecida também como forma clássica (também chamada febre de dengue) e uma forma mais grave e letal, conhecida como dengue hemorrágica (Braga & Valle 2007).

Porém a incidência da dengue, tem crescido drasticamente em todo mundo nas últimas décadas. Estima-se que ocorram 390 milhões de infecções por dengue a cada

ano, dentre os quais 96 milhões com manifestação clínica (Bhatt et al. 2013). Diversos fatores contribuíram para o aumento dos casos de dengue nos últimos 50 anos, sendo que o maior avanço aconteceu nos países em desenvolvimento. Um desses fatores foi o crescimento desordenado das cidades que permitiu condições favoráveis à multiplicação do vetor, como por exemplo, a falta de estrutura de fornecimento de esgoto, água e coleta de lixo. Outro fator associado ao crescimento de casos de dengue é o aumento do turismo e migrações, que ajudam na importação de novos sorotipos (Bricks 2004).

No Brasil, a doença mostra um padrão sazonal, com maior incidência nos primeiros meses do ano, período mais úmido e quente, característico dos climas tropicais. Os primeiros surtos de dengue no país foram relatados em meados do século XIX, mas, a primeira epidemia foi registrada na cidade de Boa Vista-RR na década de 1980, seguindo um avanço da doença nas Américas. Já na região sudeste, a dengue foi significativa no Estado do Rio de Janeiro em 1986. Estima-se que pelo menos 1 milhão de pessoas foram afetadas, disseminando de forma desgovernada para outras regiões, como o Nordeste, Centro-Oeste e o Norte (Teixeira et al. 2001).

O desenvolvimento de uma vacina para uso em larga escala e longa duração contra a dengue é considerado prioritário pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Contudo, o desenvolvimento dessa vacina tem desapontado a comunidade científica, pois certos problemas e exigências, tais como a obrigatoriedade de imunizar contra todos os quatro sorotipos, com alta eficácia, para impedir o mecanismo fisiopatológico que ocorre a dengue hemorrágica, já que uma vez acometido por algum sorotipo, um segundo ou terceiro vai aumentando a probabilidade de adquirir a forma mais grave da doença (Rodrigues et al. 2005).

2.1.2.2 FEBRE AMARELA

A doença é causada pelo vírus da febre amarela, pertencente ao mesmo gênero do vírus da dengue, *Flavivirus*. Existem dois diferentes ciclos epidemiológicos de transmissão, o urbano e o silvestre, porém com as mesmas características sob o ponto de vista clínico, imunológico, etiológico e fisiopatológico. No ciclo silvestre, os primatas não humanos (macacos) são os hospedeiros principais e amplificadores do vírus e os mosquitos são os vetores com hábitos estritamente silvestres, sendo os gêneros *Sabethes*

e *Haemagogus* os mais importantes na América Latina. O homem, nesse ciclo, participa como um hospedeiro acidental ao entrar em áreas de mata. Já no ciclo urbano, o homem é o único hospedeiro com grande importância epidemiológica e os vetores são os mosquitos urbanos infectados, sendo o *A.aegypti* o principal (Monath & Vasconcelos 2015).

Os sintomas na maior parte dos casos incluem febre, náuseas, dores de cabeça e musculares. Sua origem está na África, de onde se espalhou para as Américas através do comércio de escravos no século XVII. A febre amarela era uma das mais perigosas doenças infecciosas nos séculos XVIII e XIX. Sendo o primeiro vírus humano a ser isolado em 1927 (Oldstone 2009).

Uma vacina de longa duração (dez anos), eficaz (95%) e segura contra a doença já está disponível no mercado, sendo exigida a vacinação em viajantes que residem ou viajam para zonas endêmicas de febre amarela (Rothman 2004).

De acordo com a OMS (2016), em cada ano a doença causa 200 mil infecções e 30 mil mortes, das quais quase a totalidade no continente africano (90%). No Brasil, o ciclo da doença que ocorre atualmente é o silvestre, com transmissão por meio de vetor (mosquitos dos gêneros *Sabethes* e *Haemagogus* no ambiente silvestre). O último registro do ciclo urbano de febre amarela no Brasil foi em 1942, em Sena Madureira-AC, e todos os casos confirmados desde então decorrem do ciclo silvestre de transmissão (Monath & Vasconcelos 2015). A maior quantidade de casos ocorre na região do cerrado e na floresta amazônica, sendo o Estado de Roraima e Mato Grosso, os principais estados com registro da doença. Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, entre 1990 e 2010 ocorreram cerca de 600 casos, com 260 terminando em mortes.

2.1.2.3 CHIKUNGUNYA

A Chikungunya é uma infecção causada por um arbovírus do gênero *Alphavirus*, sendo pela primeira vez identificada em 1952 na Tanzânia. Após descoberta, houve alguns surtos periódicos na Ásia e África na década de 60. Depois de um longo período sem novos registros da doença, ela ressurgiu em 2005 e causou grandes surtos em diversos países africanos e asiáticos (Lahariya & Pradhan 2006).

A doença causa febre acompanhada de fortes dores articulares que podem durar semanas ou meses, e ocasionalmente anos, sendo a taxa de mortalidade extremamente baixa, e causa maiores complicações em idosos e pessoas com outro problema médico crônico (Schilte et al 2013).

De acordo com OMS, a doença está amplamente distribuída no mundo, causando cerca de 3 milhões de infecções por ano, onde países do Oceano Índico, das Ilhas do Pacífico e nas Américas acontecem as maiores epidemias nos últimos anos (Seppa 2015).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, os primeiros casos foram confirmados em Oiapoque, estado de Amapá, em 13 de setembro de 2014. Sete dias depois, foram também confirmados casos em Feira de Santana, estado da Bahia. Em 18 de outubro de 2014, um total de 682 casos foram notificados. Atualmente, 18 estados registraram a circulação do vírus, sendo que foram notificados mais de 20 mil casos da doença em 2015 com 6 óbitos em pessoas com idade avançada.

2.1.2.4 ZIKA

A Zika vírus é um arbovírus do gênero *Flavivirus*, sendo isolado pela primeira vez em 1947, na floresta Zika, em Uganda, motivando sua denominação. Existem duas linhagens conhecidas: uma Asiática e outra Africana.

Embora o primeiro registro de infecção humana seja de 1952 no leste da África, a Zika permaneceu desconhecido até 2007, quando aconteceu um grande surto nas ilhas da Micronésia, na Ilha de Yap (Duffy et al. 2009). Atualmente há registros de circulação em diversos países da África, Ásia e Oceania, com casos mais recentes nas Américas, como no Brasil, onde a primeira confirmação foi em Natal-RN no início de 2015. (Zanluca et al. 2015).

Conforme o Ministério da Saúde, estima-se que em 2015 houve entre 440.000 e 1.300.000 casos de Zika no Brasil. Os sintomas da Zika, quando sintomática, já que apenas 18% das infecções geram manifestações clínicas, são vômitos, tosse, febre aguda, autolimitante, não associada a complicações graves e sem registro de mortes, o que leva a uma baixa taxa de hospitalização.

Devido à rápida disseminação do zika em todo o mundo, em 1 de fevereiro de 2016, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a zika como a Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional após supostos vínculos entre infecção por zika e malformações congênitas, incluindo microcefalia e condições neurológicas tais como Guillain -Barré syndrome (GBS) (Basile et al., 2017). Desde o início do surto da zika no Brasil, houve 5.280 casos suspeitos de microcefalia, a maioria deles no Nordeste, com 108 óbitos. Até início de 2016, 1.345 dos casos suspeitos notificados foram investigados e classificados, com 508 casos confirmados de microcefalia. Em contraste, durante o período entre 2010 e 2014, a média anual de casos de microcefalia relatados no Brasil foi de 163 (Heukelbach et al. 2016).

2.2 MEDIDA DE CONTROLE DO INSETO VETOR *A. AEGYPTI*

Apesar de avanços recentes nas pesquisas para a busca de vacinas, ainda não foram obtidas nenhuma que imunize contra os quatro sorotipos da dengue, além da Zika e da Chikungunya, apenas para a febre amarela existe disponibilidade de uma vacina de longa duração, cerca de 10 anos (Rothman 2004). Dessa forma, a medida de controle necessária para se evitar essas arboviroses continua sendo o combate ao seu principal vetor urbano, o *A. aegypti*. A luta contra os mosquitos é baseada em três linhas de ações: saneamento do meio ambiente, eliminação dos focos de procriação do mosquito, e o combate direto por meio de agentes físicos, biológicos e químicos (Lozovei & Marcondes 2001). O controle físico pode ser barreiras mecânicas ou o uso de proteção individual contra picadas. Já o controle biológico consiste no uso de organismos vivos capazes de eliminar, competir e parasitar as larvas ou o mosquito adulto, como por exemplo, o emprego de peixes larvófagos das espécies *Poecilia spp* e *Gambusia affinis* e da bioinseticida *Bacillus thuringiensis* sorotipo H-14. Como os mosquitos adultos habitam locais de difícil acesso e o alto grau de adaptação ao ambiente urbano, o método de controle ideal é a eliminação das larvas (Coller & Clements 2011).

A medida de controle usando inseticidas químicos sintéticos (Figura 2.7) constitui a principal método adotado pelos Programas de Saúde Pública, onde se destacam as classes dos carbamatos, piretróides e organofosforados (Lefevre et al. 2013). O uso contínuo destes inseticidas tem sido eficaz no processo de erradicação, contudo, com o

uso prolongado e continuado de inseticidas, tem desencadeado a seleção de indivíduos resistentes e a perda da eficiência, e gradativamente, a população se torna menos sensível e mais tolerante ao produto. Além de outros efeitos indesejados, como o odor desagradável, a toxicidade a outro organismo não alvo e aos seres humanos, principalmente as pessoas que sofrem de problemas respiratórios e alérgicos, e também poluição ambiental (Niculau et al. 2013).

No Brasil, o mais utilizado foi o Temephos, da classe dos organofosforados, que possui um tempo de ação prolongado, mas por ser tóxico, acaba causando danos à saúde da população. Hoje em seu lugar, está sendo utilizado um análogo de hormônio juvenil, o Pyriproxifen. Outro inseticida usado o diclorodifeniltricloroetano (DDT), o mais eficiente dentre os inseticidas organoclorados, utilizado desde 1940, tem como características: ser relativamente barato, moderadamente tóxico, com elevado poder residual, baixa absorção cutânea, porém não é biodegradável, é acumulativo no tecido adiposo de animais endotérmicos e mostrou-se em estudos ser carcinogênico em camundongos (Lozovei & Marcondes 2001).

De acordo com a EMBRAPA, o Brasil é o maior consumidor de pesticida do mundo. Só no ano de 2015 foram consumidas 30 mil toneladas de inseticidas, com o faturamento de quase 600 milhões de reais.

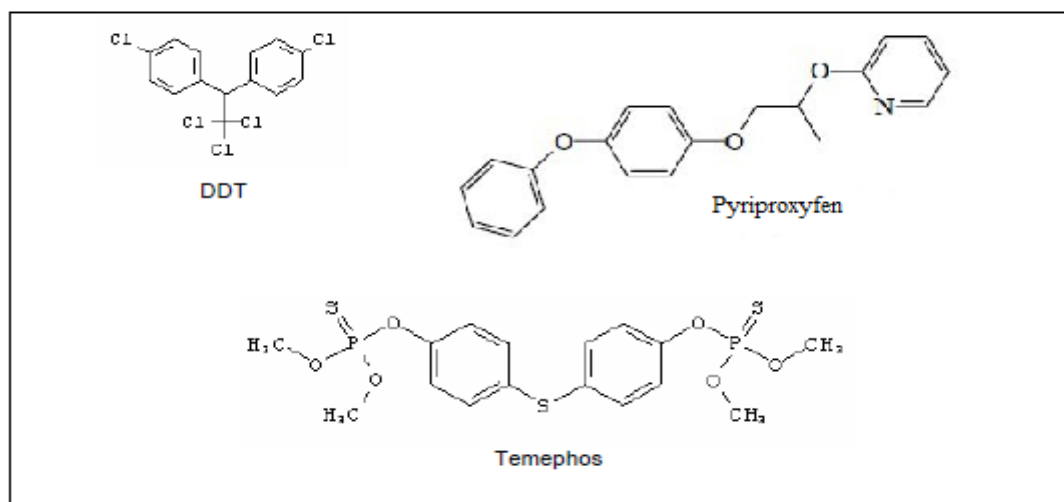


FIG. 2.7 Alguns dos principais agentes inseticidas sintéticos utilizados no controle de mosquitos

2.2.1 MODO DE AÇÃO DOS INSETICIDAS

De modo geral, o mecanismo de ação dos inseticidas sobre os insetos é o mesmo sobre os animais superiores, mesmo tendo um organismo menos complexo que os mamíferos. A maioria dos inseticidas sintéticos atua sobre o sistema nervoso central e os sintomas apresentados possuem quatro estágios: excitação, convulsão, paralisia e morte. A classificação dos inseticidas de acordo com os sintomas provocado nos insetos é difícil de ser feita. A natureza do inseto, a quantidade de inseticida consumido pelo organismo, o modo de penetração muda bastante a resposta da ação inseticida.

A condução dos impulsos nervosos é feita por uma célula nervosa (neurônio pré-sináptico), transmitidos para outras células nervosas (neurônio pós-sináptico), por meio de uma enzima neurotransmissora, a Acetilcolina (ACh). Após a condução do impulso, a ACh precisa ser hidrolisada para voltar ao seu estado de repouso, para novamente ser excitada. A enzima responsável por esse retorno é a AChE, presente nas terminações nervosas, nas hemácias e nos músculos estriados. Outra enzima que constitui o grupo das colinesterases é a BChE, encontrada no plasma, no fígado, no pâncreas e no intestino delgado (Metzler et al. 2001).

Os inseticidas atuam unindo-se a AChE, inibindo a sua ação, resultando em acúmulo de ACh nas junções nervosas (ou sinapses), o que impede a interrupção da propagação do impulso nervoso, causando hiperexcitabilidade, devido à transmissão descontrolada e contínua de impulsos nervosos, causando convulsões, tremores, colapso do sistema nervoso central e morte. Outro sintoma é a paralisção dos músculos, impedindo a respiração, e levando a morte devido à falta de oxigênio no cérebro. A diferença na atuação dos carbamatos e organofosforados é a capacidade de reversibilidade, pois nos organofosforados, a ligação é mais forte e irreversível, enquanto nos carbamatos, por ser reversível, pode ocorrer à recuperação do inseto (Braga & Valle 2007).

Insetos resistentes a organofosforados apresentaram mutações na AChE, uma mudança na conformação no sítio ativo, impossibilitando a ligação dos inseticidas ao sítio ativo da enzima de forma eficaz, não ocorrendo a inativação da mesma, resultando na diminuição da sensibilidade da enzima por estes inseticidas (Hemingway & Ranson 2000).

2.3 POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DE PRODUTOS VEGETAIS PARA O CONTROLE DO INSETO VETOR *A. AEGYPTI*

A busca por metodologias menos agressivas aos seres humanos e naturais tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Uma possibilidade aos inseticidas químicos é o uso de compostos de origem vegetal e substâncias naturais efetivas no controle da larva e do mosquito adulto do *A. aegypti* e que não seja tóxica para o meio ambiente.

O uso de extrato vegetal como inseticida em ampla escala comercial iniciou aproximadamente em 1850, destacando-se a nicotina (*Nicotiana tabacum*), o piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) e a rotenona (*Lonchocarpus spp*). Atualmente, mais de 2 mil espécies de plantas são conhecidas por ter alguma ação no controle de insetos (Ferreira et al. 2001).

Segundo Roel (2001), as vantagens do uso de inseticidas botânicos quando comparados aos sintéticos, dado que são feitos de recursos renováveis, biodegradável, possuem diversas substâncias que agem simultaneamente. Além do mais, é de fácil obtenção, representando um menor custo de produção. Contudo, para serem viáveis comercialmente, necessita apresentar uma seletividade contra inimigos naturais e baixa toxicidade ao ambiente.

2.3.1 ÓLEO ESSENCIAL

As plantas são organismos que coevoluem com insetos e outros microrganismos e são fontes naturais de substâncias antimicrobianas e inseticidas, já que necessitam se defender de um ataque patogênico (fungos, bactérias e vírus) e de um ataque herbívoro. Normalmente os compostos químicos que as espécies vegetais produzem podem ser: metabólitos primários que são essenciais à manutenção das funções vitais da planta, e metabólitos secundários que são compostos sem função evidente na conservação do ciclo de vida da planta, mas importante para a interação com o meio ambiente (Grayer & Kokubun 2001). Dentre esses metabólitos secundários, existem os óleos essenciais que são encontrados em pequenas quantidades em estruturas especializadas, como nas

células parenquimáticas, nos pelos glandulares, e estocados nas folhas, sementes, flores e outros. Apenas algumas espécies vegetais os sintetizam, possuem baixo peso molecular, usualmente com odores agradáveis, que podem ter propriedades atrativas (polinização e alimentação) ou/e como forma de proteção da planta (inseticida) (Bakkali et al. 2008). A sua extração é realizada normalmente por destilação por arraste a vapor (hidrodestilação).

Os óleos essenciais são fontes em potencial de substâncias ativas biologicamente, que apresentam em sua composição uma mistura de 4 a 50 componentes voláteis, destacando-se como as principais classes químicas envolvidas os fenilpropanóides, monoterpenos e sesquiterpenos. Fatores como o clima, a temperatura e o cultivo influenciam plantas da mesma espécie tenham diferentes proporções de seus constituintes (Ferreira et al. 2001).

Recentes pesquisas confirmam que alguns óleos essenciais não somente repelem, mas também possuem ação inseticida para diferentes tipos de insetos, tais como moscas (*Drosophila melanogaster* e *Musca domestica*), mosquitos (*Anopheles stephensi*, *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus*, *A. aegypti*, *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex quinquefasciatus*), barata (*Blatta germanica* e *Periplaneta americana*) (Simas et al. 2004; Govindarajan et al. 2017), as pragas de produtos armazenados *Sitophilus granarius* L., *S. oryzae* L., *Tribolium castaneum* Herbst., *T. confusum* Jacquelin du Val., *Rhyzopertha dominica* Fabricius., *Oryzaephilus surinamensis* L. (Polatoğlu et al. 2016).

Há registro também na literatura de diversos óleos essenciais que apresentam atividade inseticida sobre o *A. aegypti*, como por exemplo: *Cymbopogon winterianus* Jowitt (citronela), *Cymbopogon citratus* Stapf (capim-limão), *Lippia sidoides* Chamisso (alecrim pimenta), *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca), *Ocimum tenuiflorum* L. (manjeriço pequeno), *Ocimum basilicum purpurascens* Benth (manjeriço roxo), *Tagetes minuta* L. (cravo-de-defunto), *Vanillosmopsis arborea* Baker (candeeiro) e *Citrus limon* L. (limão) (Maria & Silva 2005).

2.3.2 AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS COMO INIBIDORES DE ACHE E BCHE

As plantas com atividade psicoativa atuam sobre a consciência, cognição, emoções e devido a esses efeitos têm sido utilizadas há milhares de anos pela humanidade. O

estudo etnofarmacológicos de produtos natural que possuem atividade sobre o sistema nervoso central tem ajudado a compreender as bases neuroquímicas de distúrbios psicomotoras, transformando-se em um campo muito promissor para o desenvolvimento de fármacos.

Esses distúrbios têm relação com a inibição das enzimas AChE e BChE. Um desses problemas é a doença de Alzheimer, causa mais comum de demência senil, onde existe um declínio cognitivo devido à perda extensiva de neurônios colinérgicos. Algumas drogas inibidoras de colinesterase funcionam aumentando os níveis do neurotransmissor ACh, que ajuda na comunicação entre os neurônios. Numerosos óleos essenciais demonstraram essa mesma atividade, dentre eles: *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *Cymbopogon schoenanthus* Spreng., espécies de *Melaleuca* (Loizzo et al. 2008). Isto é devido aos seus constituintes, pois muitos foram identificados como inibidores, incluindo os monoterpenos geranial, linalol e neral; sesquiterpenos tumerona e cariofileno; e fenilpropanóides eugenol e metil-eugenol (Dohi et al. 2009).

Estudos sobre a relação atividade-estrutura entre monoterpenóides e AChE evidenciaram que os hidrocarbonetos apresentam forte inibição comparados com cetonas e álcoois, na seguinte ordem: cetonas < álcoois < hidrocarbonetos (Miyazawa & Yamafuji 2005). Enquanto os grupos funcionais oxigenados diminuem a intensidade de inibição da AChE. Outro estudo verificou que os óleos de *Salvia lavandulifolia* Vahl. e *Salvia officinalis* L. inibem a AChE *in vitro* e influenciam positivamente a função cognitiva e colinérgica *in vivo* (Perry et al. 2002).

2.3.3 ANIS-ESTRELADO

2.3.3.1 CARACTERIZAÇÃO

O nome científico do anis-estrelado (Figura 2.8) é *Illicium verum* Hook. f. e pertence à família *Magnoliaceae*. É também conhecido como badiana, badiana-de-cheiro, funcho-da-china e anis-verdadeiro. Ele possui um odor aromático forte e agradável e um sabor idêntico ao da erva-doce, embora seja mais quente e picante (Grossman et al. 2005). Sua árvore pode chegar a alcançar até 12 metros de altura, com

tronco ereto e homogêneo, com casca lisa. As folhas são coriáceas, pontiagudas e de coloração verde muito intenso, flores hermafroditas brancas ou amarelas com 15 a 20 pétalas e perfumada, agrupadas em inflorescência do tipo umbrela. O fruto é pardo na forma de estrela irregular com 8 pontas que pode medir até 3 centímetros. No interior de cada ponta do fruto possui uma semente que é oval e marrom-amarelada (Negraes 2003). As flores florescem de março a maio, e os frutos amadurecem de setembro a outubro.

É uma espécie nativa do Vietnã e do sudeste da China e distribuída principalmente nas áreas subtropicais e tropicais da China. Esta planta é cultivada para perfumes, medicamentos e como uma especiaria culinária (Wang et al. 2011).



FIG. 2.8 Frutos de anis-estrelado (Romero et al 2013)

2.3.3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

O óleo essencial do fruto é um líquido amarelo, límpido com odor herbáceo e doce. Os constituintes e rendimentos variam de acordo com a época da colheita, fator sazonal, o local de origem e se a planta é fresca ou seca. Normalmente, o teor de componentes voláteis nos frutos secos é 5-8%, já nos frutos frescos é de 2,5 a 3,5%. Sua constituição é em maior parte por taninos e óleo fixos. O óleo essencial é constituído principalmente de trans-anetol (85-95%), felandreno, α -pineno, safrol, 4-terpineol, metilchavicol, 1,4 cineol, anisaldeído, limoneno, linalol. (Wang et al. 2011).

2.3.3.3 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

O anis-estrelado tem uma longa história como planta medicinal nos países da Ásia, especialmente na China. Diferentes formulações são utilizadas no país, incluindo drogas em pó, natural e óleos essenciais. As indicações clínicas incluem cólicas abdominais, vômitos, dor lombar, tosse, bronquite, flatulência e falta de apetite. Além disso, pode ser usado em chás tradicionais para o tratamento de insônia e nervosismo e como um sedativo (Yang et al. 2010).

Seu efeito sobre o sistema hormonal o torna um produto interessante também para aplicações cosméticas, melhorando a oleosidade natural e tonicidade em peles femininas, acima dos 40 anos. É galactagogo, por isso aumenta a formação de leite na mulher após o parto para aumentar o leite materno (Wang et al. 2011).

De acordo com Lee (2003), o fruto possui propriedades digestivas, podendo ser utilizado como carminativo, cólicas intestinais, útil em problemas de obesidade e calmante.

Também foi encontrada forte atividade antioxidante em estudo do óleo essencial e de seus extratos em diferentes métodos (DPPH, linoleato de β -caroteno e peroxidação do ácido linoléico) (Padmashree et al. 2007).

2.3.3.4 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

Planta muito utilizada como condimento e fitoterápico, mas consumida em excesso pode causar alguns transtornos, principalmente para crianças muito pequenas. Problemas neurológicos e enjoo foram relatados. Em doses elevadas, o óleo essencial pode ser tóxico, com efeitos narcóticos, anestesia, convulsões e delírio (Yang et al, 2010).

2.3.3.4.1 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

O anis-estrelado pode ser utilizado como defensivo agrícola contra diversos fungos fitopatogênicos, dentre eles: *Corynespora cassicola*, *Fusarium spp*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria solani* e *Septoria lycopersici* (Romero et al. 2013).

O óleo essencial do fruto também inibiu o crescimento micelial dos fungos, *Bipolaris maydis*, *Botryodiplodia theobromae*, *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia spp*, caracterizando assim, atividade antifúngica. (Huang et al. 2010).

2.3.3.4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O extrato etanólico do óleo essencial do anis-estrelado mostrou atividade antimicrobiana substancial contra diversos isolados clínicos resistentes às drogas, incluindo *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (Yang et al. 2010).

2.3.3.4.3 ATIVIDADE INSETICIDA

Outra importante atividade desse óleo essencial é a inseticida. Muitos trabalhos mostram esse fator em diversos insetos, dentre ele: *Blatella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blatellidae), *Tribolium castaneum* (Herbst.) (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae) (Knio et al. 2008; Grossman et al. 2005).

2.3.3.4.4 ATIVIDADE ANTIVIRAL

O anis-estrelado é rico em ácido xiquímico, que pode ser encontrado em algumas espécies de planta, principalmente do gênero *Illicium*. O laboratório Roche® tem a tecnologia para extração desta substância do óleo essencial do anis-estrelado, e a partir deste composto isolado elabora o medicamento Tamiflu®. Esse remédio é um antiviral

que ficou conhecido e teve um grande crescimento de vendas no período da “gripe aviária” e agora mais recentemente na “gripe suína” (Ghosh et al. 2012).

2.3.4 PIMENTA DA JAMAICA

2.3.4.1 CARACTERIZAÇÃO

O nome botânico da pimenta da Jamaica (Figura 2.9) é *Pimenta dioica* (L.) Merr. e pertence à família Myrtaceae que compreende mais de 140 gêneros e 3.000 espécies. É também conhecida como pimenta inglesa, allspice, pimento, malaqueta e newspice. Ela possui um sabor aromático e um gosto que lembra uma mistura de canela, noz-moscada e cravo. Sua árvore chega a medir até 15 metros de altura, com casca acinzentada e lisa, folhas coriáceas e elípticas alongadas, flores numerosas e tetrâmeras com pétalas esbranquiçadas e fruto baga, piriforme, contendo de uma a duas sementes. Elas são hermafroditas, mas funcionalmente dioicas (Marinho 2010).



FIG. 2.9 Pimenta da Jamaica: árvore, frutos e folhas (Marinho 2010)

As plantas florescem durante março a junho e o fruto amadurece 3 a 4 meses depois. Nativa de florestas localizadas a 700 metros do nível do mar no México,

Jamaica, Belize, Cuba, Honduras, Nicarágua, El Salvador, a pimenta da Jamaica necessita de condições ambientais muito específicas para florescer. Na Jamaica, a árvore é cultivada de forma espontânea por morcegos e pássaros que se alimentam do seu fruto, e com isso, em voo, deixam cair as sementes sobre extensas áreas, formando florestas inteiras com árvores de pimenta, inclusive, em regiões montanhosas (Zhang & Lokeshwar 2012).

2.3.4.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

De acordo com Cunha (2005), a composição química dos óleos essenciais influencia significativamente no potencial farmacológico de cada espécie, podendo sofrer alterações em consequência de fatores intrínsecos (genéticos ou fisiológicos) ou/e extrínsecos (edáficos ou ambientais) à biologia vegetal.

Existem dois tipos no mercado de óleos essenciais da pimenta da Jamaica: o óleo destilado das folhas e o óleo obtido dos frutos, com fino sabor e odor. O fruto seco possui 2 a 5% de óleo essencial e a quantidade extraída está relacionada com o período de colheita (Guenther 1950).

Normalmente, o fruto contém como componente majoritário (65 a 85%) o eugenol, mas também possui éter metil eugenol, felandreno, cariofileno, cineol, ácido palmítico, óleos fixos, amido, oxalato de cálcio e taninos. Já as folhas foram verificadas em estudos que o eugenol também é o componente majoritário, porém com porcentagem menor (30 a 48%), e contendo também mirceno, geraniol, humuleno, cineol, tanino, oxalato de cálcio (Oussalah 2007).

2.3.4.3 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

Esta espécie vegetal tem larga utilização na medicina popular em vários países, sobretudo da América Central. Na Jamaica, os frutos são usados no tratamento de estomatites, resfriados e hemorragias. Na Costa Rica, as folhas são utilizadas no combate à diabetes, além de problemas digestivos. Na Guatemala, utilizada em dores

reumáticas e aplicadas externamente em escoriações. Já em Cuba, o fruto é usado em tratamentos de dispepsia, diarreia e flatulência, além da utilização como chá depurativo, estimulante tônico e bebida refrescante (Duke 1985).

De acordo com as pesquisas de Dearlove et al (2008), os frutos da pimenta da Jamaica foram eficazes na inibição da glicação das proteínas, indicando um potencial método para o combate da diabetes. Já Suarez e al (2000), verificou que as folhas da planta têm efeito depressor no sistema nervoso central, ao mesmo tempo em que possui efeitos analgésicos, podendo ser utilizado no tratamento de hipertensos. Por outro lado, Ramos et al (2003) encontrou em extrato das partes aéreas da pimenta propriedades antioxidantes pelo método de tiocianato férrico e atividade antirradicais livres pelo método DPPH.

2.3.4.4 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

2.3.4.4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Atividade antimicrobiana completa foi encontrada contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Marzouk et al. 2007). Já o óleo essencial do fruto foi verificado inibição contra *Pseudomonas putida*, *E.coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. Enquanto o óleo essencial das folhas mostrou forte atividade antibactericida contra Coagulase negative, *Staphylococci* e *Pseudomonas spp* (Oussalah et al. 2006).

2.3.4.4.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

No fruto da pimenta da Jamaica foi encontrado atividade de inibição completa de diversos fungos, como: *Fusarium oxysporum*, *F. verticilloides*, *penicillium brevicompactum*, *P. expansum*, *Aspergillus flavus* e *A.fumigatus* em 1 µl/ml de concentração. Também foi mostrada atividade antifúngica do fruto contra *Aspergillus*

niger, *Candida blanki*, *Candida tropicalis*, *Candida cylindracea*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. Já contra *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida albicans* obteve-se uma inibição parcial (Kamble & Patil 2008; Oussalah et al. 2006; Oussalah et al. 2007).

2.3.4.4.3 OUTRAS ATIVIDADES TOXICOLÓGICAS

O óleo do fruto da pimenta da Jamaica mostrou uma boa atividade nematicida em 2mg/ml contra o nemátodo do pinheiro, *Burasa-phelenchus xylophilus* (Park et al. 2007). Já o óleo das folhas foi encontrado atividade toxicológica contra o crustáceo *Artemia salina l.* (Artemiidae) (Kamble & Patil 2008).

2.3.5 NOZ MOSCADA

2.3.5.1 CARACTERIZAÇÃO

O nome científico da noz moscada (Figura 2.10) é *Myristica fragans Houtt.* e pertence à família *Myristicaceae* que inclui 21 gêneros com cerca de 400 espécies. É uma planta nativa de ilhas vulcânicas da extremidade meridional das ilhas Molucas, as lendárias “Ilhas das Especiarias”, localizada atualmente na província da Indonésia de Maluku. Durante muitos séculos os habitantes sobreviveram do comércio dessa semente e do cravo-da-índia, iniciado desde o tempo do Império Romano, seguido pelos comerciantes venezianos, portugueses e holandeses, tudo isso devido ao seu alto valor comercial e da necessidade de conservar os alimentos (Uchibayashi 2001).

É uma árvore tropical adaptada ao clima quente e úmido, de porte alto, 10 a 15 metros de altura, sempre perene, com várias ramas disposta ao longo do tronco principal, robusta (a madeira é ótima para confecção de móveis) e de forte perfume. Ela possui sexos separados (dióica), com polinização cruzada, onde uma árvore macho poliniza até 20 árvores fêmeas. No interior do fruto, a semente grossa, a noz-moscada, é

revestida por uma espécie de estrutura entrelaçada e laranja-avermelhada, o macis. Seu sabor lembra uma mistura de canela com pimenta-do-reino, embora seja mais aromática e sutil, sendo bastante utilizada na cozinha devida sua versatilidade, ou seja, servindo desde pratos salgados até doces (Teixeira et al. 2008).



FIG. 2.10 Frutos de noz moscada (Oliveira 2007)

2.3.5.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

O óleo essencial da semente é um líquido incolor ou ligeiramente amarelo, límpido com odor forte, almiscarada, picante e estimulante. Quando exposto a luz e ao ar, ransifica-se parcialmente, ficando mais viscoso. É constituído por terpenos, como o alfa-pineno, terpinenol, linalol e geraniol, e por fenilpropanóides, como a miristicina, safrol e elemicina. Seu rendimento também varia de acordo da origem e época de colheita, sendo o teor de voláteis nas sementes é de 4,5 a 8% (Oliveira 2007).

2.3.5.3 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

Esta espécie vegetal tem diversas utilizações na medicina popular desde a antiguidade, pois já era utilizada na Índia para problemas intestinais e era empregada no embalsamento no Egito. Na Idade Média, tornou-se reconhecida como remédio para o tratamento de hemorroidas e tônico estomacal (Teixeira et al. 2008).

Atualmente, o chá da semente é utilizado devido suas propriedades curativas de distúrbios do aparelho respiratório e digestivo, além de potente atividade estimulante ou calmante, dependendo das condições de preparo.

A especiaria é fonte de minerais como o cobre e manganês, usados pelo organismo como co-fatores para atividades de enzimas antioxidantes. Já a presença do potássio, também presente na noz moscada, contribui para o controle dos batimentos cardíacos e da pressão arterial. Além disso, também atua como ativador de glutathione S transferase, prevenindo a formação de tumores (Oliveira 2007).

2.3.5.4 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

Porém a ingestão deste condimento em quantidades não normais pode causar intoxicações no indivíduo, caracterizadas por quadros alucinatórios, excitatórios e distúrbio no aparelho digestivo. De acordo com Teixeira et al. (2008), os componentes responsáveis por esses efeitos psicoativos são a miristicina, elemicina e safrol, que são precursores metabólicos de compostos do tipo MDA (metilendioxi-anfetamina).

2.3.5.4.1 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

De acordo com Valente et al. (2005), o óleo essencial da noz moscada mostrou atividade antifúngica contra diversos fungos, como: *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. glaucus*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum musae* e *C. gloeosporioides*.

2.3.5.4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O óleo da semente da noz moscada mostrou uma boa atividade antimicrobiana frente aos seguintes patógenos de importância alimentar: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* (EHEC) (Probst 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 AMOSTRAS

Os frutos do anis-estrelado (*Illicium verum*) e da pimenta da Jamaica (*Pimenta dioica*) e as sementes de noz moscada (*Myristica fragrans*) foram adquiridos em um mercado varejista da cidade do Rio de Janeiro-RJ em outubro 2016.

3.1.2 LARVAS E MOSQUITOS TESTES

Larvas e mosquitos de *A. aegypti* da linhagem Rockefeller foram utilizados nesse trabalho e criados no Laboratório de Entomologia da Fiocruz localizado no Instituto de Biologia do Exército (IBEx). Esta cepa Rockefeller foi originalmente estabelecida no Rockefeller Institute em Nova York, NY (1959) e, desde então, empregada em diversos laboratórios ao redor do mundo como referência para uniformidade, fecundidade e susceptibilidade a inseticidas (Kuno 2010).

As larvas dos experimentos foram mantidas em bandejas com água desclorada à temperatura de 26 ± 2 °C no insetário do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). A dieta das larvas consistiu de ração de gato (Friskies[®], Purina, São Paulo, SP) triturada. Para os mosquitos adultos, utilizaram-se gaiolas de papelão que permaneceram em ambiente com as condições de temperatura 25 ± 2 °C e umidade $70 \pm 10\%$ controladas. Foi oferecida solução de sacarose 10% para alimentação *ad libitum*. A produção de ovos foi estimulada através da oferta de sangue de porquinho-da-índia da espécie *Cavia porcellus* às fêmeas, que está autorizada pelo Comitê de ética no uso de animais (licença

LW-20/14 de 31 de março de 2014 – ANEXO I). Três dias após o repasto sanguíneo, as fêmeas depositaram os ovos em papel-filtro umedecido. Para eclosão de larvas, os ovos foram expostos à água desclorada.

3.1.3 VOLUNTÁRIOS HUMANOS

A autorização ética foi aprovada pelo Comitê de Ética do Hospital Naval Marcílio Dias (CEP/HNMD), localizado na cidade do Rio de Janeiro-RJ, Brasil (CAAE n° 64201417.0.0000.5256). Voluntários adultos saudáveis de ambos os sexos, 18-60 anos de idade, peso 50-100 kg, que não possuíam histórico de reação alérgica às picadas de artrópodes ou doença dermatológica foram recrutados. Antes de assinar um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – ANEXO II), os voluntários foram entrevistados e instruídos sobre a metodologia, de prováveis desconfortos, sendo o pesquisador o responsável por quaisquer danos ou despesas decorrentes de reações relacionados ao ensaio. Em qualquer momento, o voluntário teve a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A extração da fração volátil do material botânico foi efetuada através da hidrodestilação por 4 horas em aparelho do tipo Clevenger modificado, adaptado a um balão de fundo redondo com capacidade de 1 litro (Castro et al. 2006)

3.2.2 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais do anis-estrelado, da pimenta da Jamaica e da noz moscada foram analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas com quadrupolo (CG-EM) em aparelho Termo TRACE 1300-TSQ 8000 (Figura 3.1). Seus espectros de massa foram obtidos por ionização por impacto de elétrons (IE), com energia equivalente a 70eV, nas seguintes condições: coluna capilar RTX-5MS, injetor a 260°C, coluna a 60°C, modo de injeção split, programação de temperatura de 60°C/5min a 300°C/1min (10°C/min), interface a 240°C sendo hélio o gás de arraste (1mL/min). Os valores de índice de retenção lineares (IRL) dos compostos voláteis foram determinados através da interpolação linear dos marcadores de hidrocarbonetos *n*-alcanos (C6-C22). A identificação dos componentes voláteis foi obtida pela comparação dos espectros de massa com a biblioteca de dados do equipamento (NIST 11-v.2011) e também pelos tempos de retenção obtidos experimentalmente com os descritos na literatura.



FIG. 3.1 CG-EM

3.2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O MOSQUITO *A. AEGYPTI*

A atividade larvicida foi avaliada de acordo com a metodologia da OMS (WHO 2005). Os óleos essenciais foram diluídos em acetona para as diferentes concentrações testadas. Vinte larvas de terceiro estágio (L3) foram selecionadas por meio de uma pipeta plástica tipo Pasteur e separadas em copos plásticos descartáveis com capacidade

de 50mL. Foram utilizadas no mínimo nove concentrações para cada substância avaliada, anis-estrelado (0,010mg/mL até 0,050mg/mL), noz moscada (0,010 mg/mL até 0,050 mg/mL), pimenta da Jamaica (0,050 mg/mL até 0,130mg/mL).

Foram realizadas três réplicas para cada concentração de óleo essencial em quatro dias distintos. A mortalidade foi registrada após 24 horas de exposição das larvas aos óleos essenciais, considerando mortas as larvas que não responderem a um toque com um bastão. Para o cálculo dos valores da concentração letal foi utilizada a análise probit com o programa Statgraphics centurion XV, version 16.1.03 (Statpoint technologies, Warrenton, VA, USA).

3.2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ADULTICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O MOSQUITO *A. AEGYPTI*

A atividade adulticida foi realizada pela aplicação tópica de óleo essencial em fêmeas adultas com o objetivo de determinar a toxicidade intrínseca de inseticida em cada mosquito, seguindo o método padrão estipulada pela OMS (WHO 1996), com modificações. Nos testes, foram utilizadas fêmeas de 5 a 7 dias não alimentadas com sangue que foram anestesiadas após permanecerem quatro minutos em recipiente refrigerado a -18°C e, após serem pesadas, foram colocadas sobre um papel filtro seco sobre uma placa de refrigeração mantendo, assim, a anestesia durante a manipulação. Aplicou-se uma gotícula de 0,3 µl de óleo essencial dissolvido em acetona sobre a parte superior do pronoto de cada fêmea adulta imobilizada, utilizando pelo menos cinco concentrações diferentes numa faixa de mortalidade de 0 a 100%. Na condição controle aplicou-se uma gotícula de acetona (solvente utilizado para a produção das soluções de óleos essenciais). As dosagens foram expressas em microgramas de material vegetal por miligrama de peso corporal de cada mosquito. Após cada série de solução de óleo essencial, o papel filtro foi substituído para evitar a exposição dos sujeitos de teste a outras amostras de teste. Após os ensaios, as fêmeas foram colocadas em copos plásticos, com a temperatura e a umidade monitoradas a 26±2 °C e 70±10%, respectivamente, e com 10% de sacarose para alimentação. Depois de um período de 1 hora, foi registrada a taxa de knockdown e após 24 horas, verificou-se a taxa de mortalidade. Para cada avaliação foram utilizadas 20 fêmeas em nove repetições (180

fêmeas por dose de cada exposição de óleo essencial). Para calcular os valores da concentração letal de knockdown e em 24h foi utilizada a análise probit com o programa Statgraphics centurion XV, version 16.1.03 (Statpoint technologies, Warrenton, VA, USA).

3.2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REPELENTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O MOSQUITO *A. AEGYPTI*

A atividade repelente foi realizada por meio de testes de repelência conforme metodologia descrita pela OMS com modificações (WHO 2009). O método consiste na exposição dos braços de voluntários (7 homes e 7 mulheres saudáveis, não alérgicos a insetos) a fêmeas adultas de *A. aegypti*, apenas alimentadas com solução de sacarose, ou seja, sem repasto sanguíneo (Figura 3.2). Antes de iniciar o teste, os voluntários lavaram os braços e as mãos com sabão neutro e água destilada, e secaram por 10 minutos. Deve-se evitar o uso de perfumes e não fumar 12h antes e durante os testes. Após a secagem, aplicou-se 1mL de solução de etanol a 70% em uma área de 25 cm² no dorso da mão. Esta área tratada foi exposta dentro de uma gaiola (30cm X 30cm) contendo 120 fêmeas sadias do mosquito *A. aegypti* com 5 a 7 dias de idade e contou-se o número de mosquitos que pousam durante um período de 30 segundos. Durante o teste, o voluntário evitou o movimento do braço. Para que o teste prossiga, a taxa de aterragens ≥ 10 no período de 30 segundos. Após o tratamento com álcool, o mesmo antebraço foi aplicado um volume de 0,2mL do óleo essencial e colocado na gaiola por mais 30 segundos, observando as aterragens dos mosquitos. Este procedimento é repetido para cada dose repelente incremental adicional. Testes sucessivos devem ser realizados um após o outro sem demora e a dose repelente a cada teste, calculada como a soma das doses aplicadas para chegar à dose acumulativa para cada teste. Na conclusão da experiência dose-resposta, 1mL de álcool a 70% é aplicado no outro antebraço e deixado secar. Este antebraço foi inserido na gaiola durante 30 segundos para verificar que o número de pousos é aproximadamente ≥ 10 por 30 segundos, como foi observado no início da experiência. Se a taxa for < 10 fêmeas em 30 segundos, os resultados desta experiência foram descartados. Cada teste foi feito em 2 replicatas com o mesmo voluntário. A proteção (P) foi expressa como uma proporção do número de aterragens

de mosquitos no braço tratado (T) em relação ao número de aterragens no braço de controle (C) do mesmo indivíduo: $P = 1 - (T / C) = (C-T) / C$, onde C é a média dos pousos nos dois braços não tratados (o braço de teste aplicado diluente antes do tratamento repelente e o outro braço no final da experiência). Os dados são analisados utilizando a análise de regressão do plano probit a partir da qual podem ser estimados os valores ED₅₀ e ED₉₀ e os seus limites de confiança.

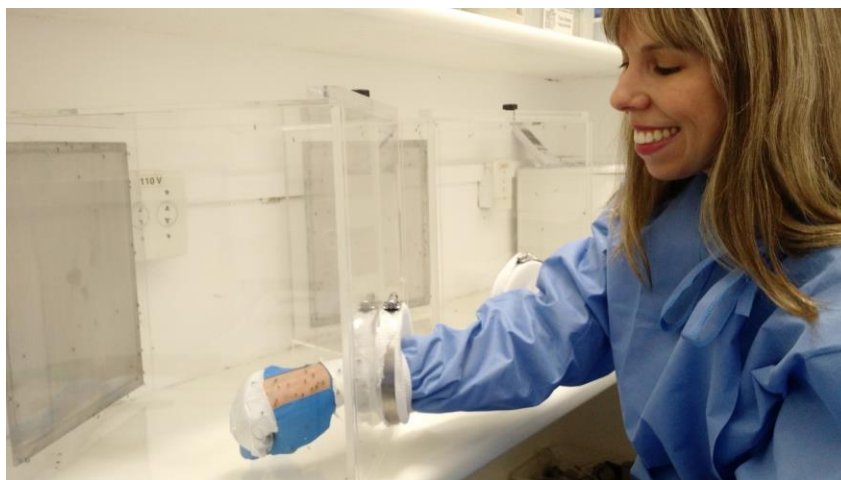


FIG. 3.2 Teste de repelência

3.2.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A atividade anticolinesterásica foi determinada para os óleos essenciais do anis-estrelado, noz moscada e pimenta da Jamaica usando um leitor de microplacas (espectrofotômetro) SpectraMAX 340PC Molecular Device® com base no método de Ellman (Ellman 1961), com modificações para placa de 96 poços (Lima 2009). Foram avaliadas as velocidades de hidrólise do substrato (butiriltilocolina ou acetiltiocolina) pela enzima [BChE de equino (0,05 U/mL) ou AChE do *Electrophorus electricus* (0,01 U/mL)], em função da concentração da amostra, sendo pelo menos cinco concentrações testadas. As concentrações finais utilizadas da butiriltilocolina, acetiltiocolina e reagente de Ellman (DTNB) foram 1mM, 0,5mM e 0,25mM, respectivamente. A mistura foi incubada por um período de 10 minutos a 37°C. Imediatamente após a adição do substrato, a leitura da absorbância pelo aparelho foi iniciada, permanecendo por 5

minutos. A atividade (absorbância/min) da enzima (BChE e AChE) junto com a amostra foi estabelecida por meio da comparação com o controle (mistura sem a presença da amostra) e expressada como variação do desvio ótico em 412nm. Utilizou-se o programa Softmax Pro 6.4 no cálculo dos valores da absorbância/min. Para calcular os valores de inibição foi utilizado o programa GraphPadPrism 5 pelo método de regressão não linear. Para cada óleo essencial, os resultados equivalem à média \pm desvio padrão de dois ou três experimentos, sendo realizado em tréplica. Também foi realizado o teste em branco, correspondente à hidrólise espontânea (sem enzima) e o teste da maior concentração (5%) de metanol (solvente).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES

4.1.1 ANIS-ESTRELADO

O óleo essencial extraído por hidrodestilação dos frutos do anis-estrelado apresentou um odor intenso doce e coloração amarela clara. Sua porcentagem variou 2,6% (p/p) a 3,1% (p/p) (Tabela 4.1), tendo como média $2,9\% \pm 0,19$ (p/p). Esse valor está coerente com o trabalho de Freire (2008), que obteve 2,8% (p/p) pelo mesmo método. Porém, Giehl (2016) realizou a extração por método de Soxhlet, utilizando o hexano como solvente, conseguiu um rendimento de 7,9% (p/p), ou seja, quase três vezes mais do que pelo método de hidrodestilação.

Os valores de rendimento de extração apresentaram baixa variância entre as repetições, visto que seu coeficiente de variação (CV) é de 6,70. O CV é a medida utilizada para expressar a instabilidade de uma variável, quanto menor o CV, mais homogêneo são os dados e menor a variação do acaso, sendo que CV menor que 10% são considerados baixos (Garcia 1989).

TAB. 4.1. Rendimento do óleo essencial do anis-estrelado

Repetições	Rendimento (% p/p)
1	2,8
2	3,0
3	2,6
4	3,2
5	2,7
6	2,8
7	3,1
8	3,0
9	2,9
10	2,7
média	2,9
desvio padrão	0,19
Coeficiente de Variação	6,70

4.1.2 PIMENTA DA JAMAICA

A extração do óleo essencial dos frutos da pimenta da Jamaica evidenciou um líquido incolor com aroma e sabor de canela, cravo e noz moscada. O percentual de óleo essencial ficou entre 1,3% (p/p) a 1,8 (p/p) (Tabela 4.2), com uma média de 1,6% \pm 0,23 (p/p). Esse resultado é um pouco acima do encontrado por De Oliveira et al. (2009), que conseguiu um rendimento entre 0,97% (p/p) a 1,41% (p/p). Enquanto Barros Junior (2011), em sua pesquisa, extraiu um volume máximo de óleo essencial com um rendimento de 2,8% (p/p). Provavelmente, a diferença é decorrente da origem ou do clima onde foi plantada a pimenta da Jamaica.

Pode-se notar que o CV dos rendimentos da extração é 14,95%, mas de acordo com Garcia (1989), valores entre 10% a 20% são considerados normais.

TAB. 4.2 Rendimento do óleo essencial da pimenta da Jamaica

Repetições	Rendimento (% p/p)
1	1,3
2	1,5
3	2,0
4	1,7
5	1,7
6	1,3
7	1,3
8	1,6
9	1,7
10	1,8
média	1,6
desvio padrão	0,23
Coeficiente de Variação	14,95

4.1.3 NOZ MOSCADA

Já a semente da noz moscada apresentou um líquido ligeiramente amarelado com cheiro picante, forte, almiscarado e estimulante. Em relação ao rendimento, a noz moscada teve o maior dentre as três extrações com o percentual entre 5,9% (p/p) a 7,3 (p/p) (Tabela 4.3), com uma média de 6,8% \pm 0,42 (p/p). Entretanto, Oliveira (2007) encontrou um rendimento superior (8% p/p), mas ele destaca que o rendimento da

extração encontrado em sua pesquisa bibliográfica é entre 4,5 a 5,6% e que as sementes moídas (em pó) apresentam rendimentos em média 40% menores que as sementes inteiras.

Verifica-se que o CV é o menor de todos os apresentados (6,17), confirmando, assim, a homogeneidade dos rendimentos obtidos.

TAB. 4.3 Rendimento do óleo essencial da noz moscada

Repetições	Rendimento (% p/p)
1	7,1
2	7,2
3	5,9
4	6,5
5	6,6
6	7,3
7	7,2
8	6,8
9	6,9
10	6,9
média	6,8
desvio padrão	0,42
Coefficiente de Variação	6,17

4.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO ESSENCIAL

4.2.1 DENSIDADE ESPECÍFICA

Os óleos essenciais extraídos tiveram densidade específica inferior à da água, visto que durante o processo de hidrodestilação, verificou-se uma separação de fases, sempre com o óleo essencial na parte de cima do tubo coletor.

Os resultados da densidade específica dos óleos essenciais obtidos estão resumidos na Tabela 4.4 em g/cm³ a 20°C.

TAB. 4.4 Densidade Específica dos óleos essenciais

Óleo essencial	Densidade Específica (g/cm ³) a 20°C
Anis-estrelado	0,9916
Pimenta da Jamaica	0,9830
Noz moscada	0,8932

O valor da densidade específica da noz moscada está de acordo com a faixa especificada pela Norma ISO para o óleo essencial de noz moscada oriundas da Indonésia (Mendes 1993), que deve estar entre 0,883 a 0,917, mostrando assim, que mesmo sendo uma semente comprada no mercado varejista do Rio de Janeiro, encontra-se dentro da norma estabelecida mundialmente.

Comparando os valores da densidade do óleo essencial do anis-estrelado e da pimenta da Jamaica com os da literatura, pode-se verificar que há uma similaridade entre eles, já que o anis-estrelado encontra-se um pouco superior (3,3%) do obtido pelo Liu (2015) que foi de 0,96g/cm³, enquanto a densidade do óleo essencial da pimenta da Jamaica está em conformidade com o encontrado por Valdez Junior (2009), que foi de 0,98g/cm³, mas um pouco acima (3,6%) do Barros Junior (2011), que foi de 0,949g/cm³. A composição química influencia na densidade do óleo essencial, com isso, variações na composição acarreta mudanças na densidade. Assim, devem-se levar em conta os fatores que influenciam a composição química, tais como condições e tempo armazenamento dos frutos, época de coleta e diferentes tipos de solo no plantio. Além disso, a temperatura na análise é outro parâmetro que deve ser considerado, pois, quanto maior a temperatura, menor a densidade.

4.2.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO

4.2.2.1 ANIS-ESTRELADO

O óleo essencial do fruto do anis-estrelado foi possível identificar 97,84%. Dentre eles, 3,31% pertencentes às classes dos monoterpenóides, 2,38% sesquiterpenóides e 92,15% fenilpropanóides. Na Tabela 4.5, podem-se observar esses constituintes em ordem de eluição, sendo que fenilpropanóide trans-anetol é o composto majoritário na concentração de 90,12%.

TAB. 4.5 Composição química do óleo essencial de anis-estrelado

Tempo de retenção	Composto	Área relativa (%)	RI (calc)	RI Index	Classe
7,30	α -tujeno	0,16	916	922	Monoterpeno
7,48	α -pineno	0,62	975	966	Monoterpeno
9,61	Limoneno	2,21	1012	1018	Monoterpeno
10,49	β -linalool	0,32	1082	1082	Monoterpeno
12,29	estragol	0,28	1188	1172	Fenilpropanóide
13,77	trans-Anetol	90,12	1281	1264	Fenilpropanóide
14,98	β -cubebeno	0,65	1369	1384	Sesquiterpeno
15,62	β -cariofileno	0,35	1422	1440	Sesquiterpeno
15,75	trans- α -bergomoteno	1,38	1428	1430	Sesquiterpeno
18,71	chavicol	1,75	1675	1660	Fenilpropanóide
	monoterpenos	3,31			
	fenilpropanóides	92,15			
	sesquiterpenos	2,38			

O perfil cromatográfico do seu óleo essencial apresentou diversos picos (Figura 4.1). Entre os compostos, estão o trans-anetol como composto majoritário 90,12%, seguido pelo limoneno, chavicol, trans- α -bergomoteno, nas concentrações de 2,21%, 1,75% e 1,38% respectivamente.

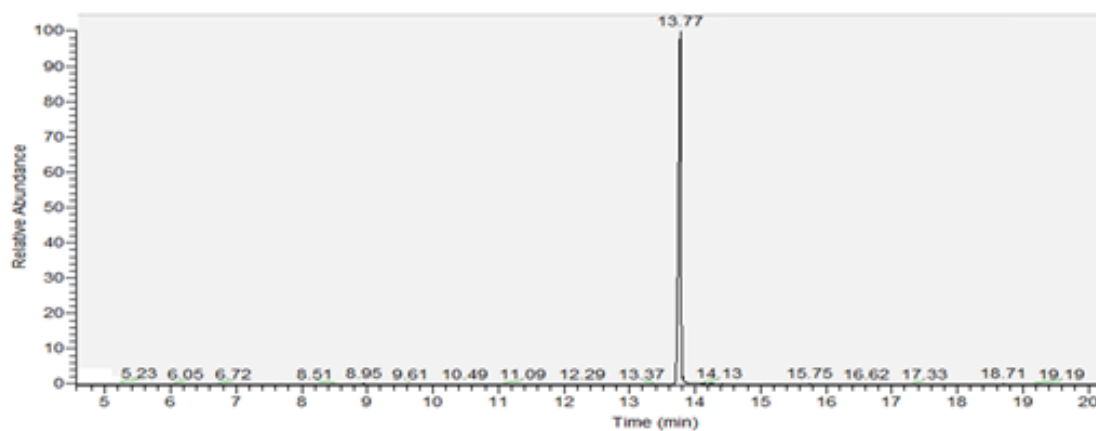


FIG. 4.1 Perfil cromatográfico do óleo essencial do anis-estrelado

Na Figura 4.2 estão representadas as estruturas químicas dos quatro compostos principais identificados no óleo essencial do anis-estrelado.

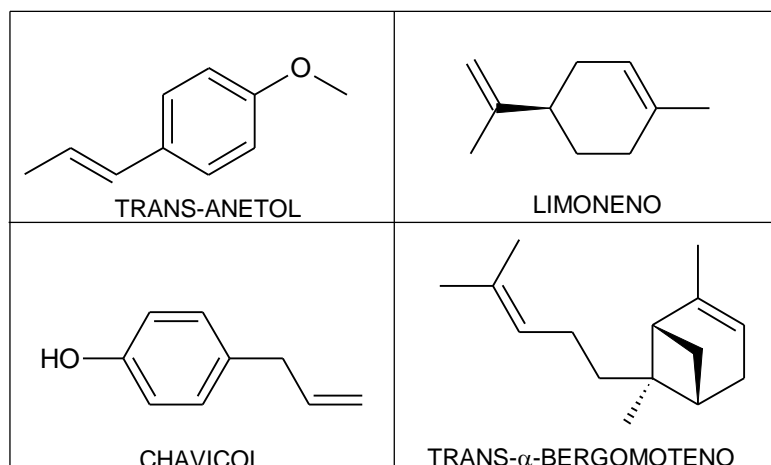


FIG. 4.2 Estruturas químicas dos principais compostos identificados no óleo essencial do anis- estrelado

A informação encontrada na análise cromatográfica do óleo essencial do anis-estrelado de que o trans-anetol é o constituinte majoritário e sua porcentagem é de 90,12% está de acordo com aquelas encontradas na literatura estudada, inclusive a Farmacopeia Chinesa (2010) menciona que além de ser o composto majoritário, a porcentagem de anetol pelo processo de hidrodestilação é entre 86,0 a 93%. Na mesma direção, Cai et al. (2013) reportaram ser trans-anetol o principal componente variando entre 86,66% e 94,21%.

Freire (2014) realizando o mesmo trabalho de caracterização química, encontrou um alto teor de trans-anetol (90,41%), seguido pelo limoneno (2,65%) e chavicol (1,26%), que são os mesmos encontrados nessa pesquisa, diferenciando um pouco apenas nas concentrações de cada elemento. Já Huang et al. (2010) identificaram o componente principal como trans-anetol, embora outros componentes foram diferentes uns dos outros. As razões para este fenômeno podem ser as estações de crescimento, diferentes ambientes geográficos e idade fisiológica da planta, além do método de preparação de óleo, esses fatores refletem o dinamismo das interconversões que acontecem continuamente entre os constituintes do óleo essencial.

Mesmo realizando outros métodos de extração do óleo essencial, Yang et al. (2012), utilizando a extração por solvente, fracionando o extrato alcoólico em hexano, etil-eter, clorofórmio e etil-acetato, identificaram sempre o trans-anetol como principal elemento, porém em porcentagens menores da prevista pela Farmacopeia Chinesa.

4.2.2.2 PIMENTA DA JAMAICA

A partir das análises cromatográficas do óleo essencial do fruto da pimenta da Jamaica foi possível identificar 99,40% dos voláteis. Fenilpropanóides foi a maior porcentagem dos constituintes identificados, 91,22%, e o restante pertencem às classes dos monoterpenóides e dos sesquiterpenóides, 3,58% e 4,60% respectivamente. Na tabela 6, pode-se observar que os compostos mais abundantes são os fenilpropanóides metil-eugenol, com 54,98%, e eugenol, com 36,28%.

TAB. 4.6 Composição química do óleo essencial da pimenta da Jamaica

Tempo de retenção	Composto	Área relativa (%)	RI (calc)	RI Index	Classe
8,78	β -pineno	2,68	990	970	monoterpeno
9,67	eucalyptol	0,48	1045	1059	monoterpeno
12,59	α -terpineol	0,42	1192	1172	monoterpeno
15,08	eugenol	36,28	1377	1392	fenilpropanóide
15,63	metil-eugenol	54,98	1419	1402	fenilpropanóide
15,89	β -farneseno	4,25	1439	1440	sesquiterpeno
17,92	óxido de cariofileno	0,35	1595	1576	sesquiterpeno
	monoterpenos	3,58			
	fenilpropanóides	91,22			
	sesquiterpenos	4,60			

No cromatograma do seu óleo essencial da pimenta da Jamaica, verificaram-se diversos picos (Figura 4.3). Dentre os outros compostos que foram identificados, além do metil-eugenol e do eugenol que foram os compostos majoritários, estão o sesquiterpeno β -farneseno e o monoterpeno β -pineno, nas concentrações de 4,25% e 2,68% respectivamente.

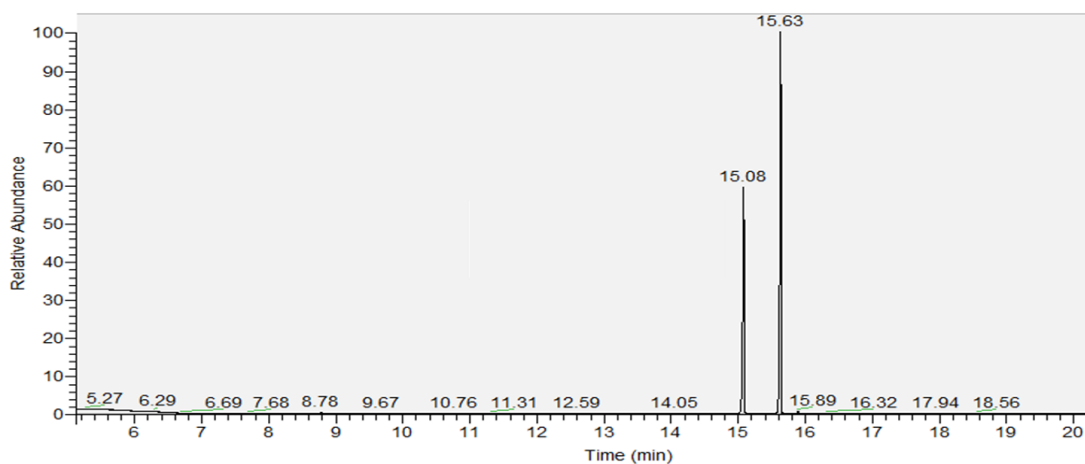


FIG. 4.3 Perfil cromatográfico do óleo essencial da pimenta da Jamaica

Na Figura 4.4 estão representadas as estruturas químicas dos quatro compostos

principais identificados no óleo essencial da pimenta da Jamaica.

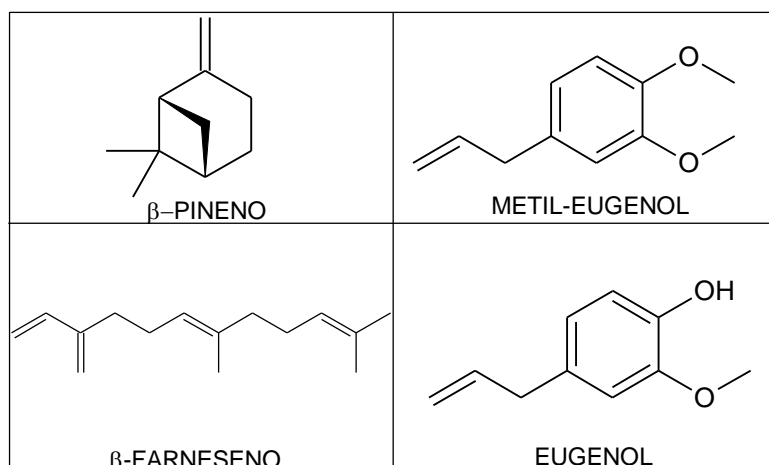


FIG. 4.4 Estruturas químicas dos principais compostos identificados no óleo essencial da pimenta da Jamaica

A composição química do óleo essencial da pimenta da Jamaica foi relatada anteriormente por diversos autores. De Oliveira et al. (2009), utilizando plantas do sul do estado da Bahia, encontraram o eugenol como componente majoritário (75,07%), seguido pelo mirceno (8,19%) e chavicol (6,35%). Já Barrosnior (2011) e Marinho (2010) relataram resultados semelhantes, embora houvesse algumas diferenças nas razões (quantidades relativas) de alguns produtos químicos, com a presença do eugenol como majoritário, porém seguido de β -pineno, 5-indanol e limoneno.

A diferença dessas pesquisas em relação a este trabalho é o destaque sobre o fenilpropanóide eugenol, e nada comentaram sobre o metil-eugenol em suas análises. Essa divergência pode estar associada ao processo de identificação dos compostos e a sensibilidade do aparelho de cromatografia utilizado.

Martinez-Velazquez et al. (2011) encontraram em sua pesquisa o metil-eugenol como constituinte majoritário (62,7%), o eugenol (8,3%) e o eucalyptol (4,1%) como constituintes secundários na análise do óleo essencial da pimenta da Jamaica.

4.2.2.3 NOZ MOSCADA

A partir do óleo essencial das sementes de noz moscada foi possível identificar 96,31% dos constituintes químicos. Dentre eles, 92,98% pertencem às classes dos monoterpenóides e apenas 3,33% foram fenilpropanóides e não sendo possível

identificar nenhum componente da classe dos sesquiterpenóides. Na Tabela 4.7, observa-se como componente majoritário o monoterpene sabineno com 52,05%.

TAB. 4.7 Composição química do óleo essencial da noz moscada

Tempo de retenção	Composto	Área relativa (%)	RI (calc)	RI Index	Classe
7,30	α -tujeno	0,55	939	928	monoterpene
7,48	α -pineno	12,77	947	948	monoterpene
8,45	sabineno	52,05	982	966	monoterpene
8,51	β -pineno	3,85	987	970	monoterpene
8,78	β -mirceno	2,53	996	980	monoterpene
9,61	limoneno	6,20	1030	1018	monoterpene
10,21	γ -terpineno	4,38	1066	1047	monoterpene
12,40	terpinen-4-ol	10,65	1185	1161	monoterpene
14,08	isosafrol	1,22	1327	1345	fenilpropanóide
17,13	miristicina	0,76	1530	1516	fenilpropanóide
17,46	elemicina	1,35	1560	1550	fenilpropanóide
	monoterenos	92,98			
	fenilpropanóides	3,33			

No perfil cromatográfico do óleo essencial da noz moscada, notam-se muitos picos (Figura 4.5). Além do sabineno que possui uma abundância relativa de mais de 50%, outros componentes aparecem com intensidades consideráveis, como é o caso do α -pineno, terpinen-4-ol e limoneno, nas concentrações de 12,77%, 10,65% e 6,20%, respectivamente.

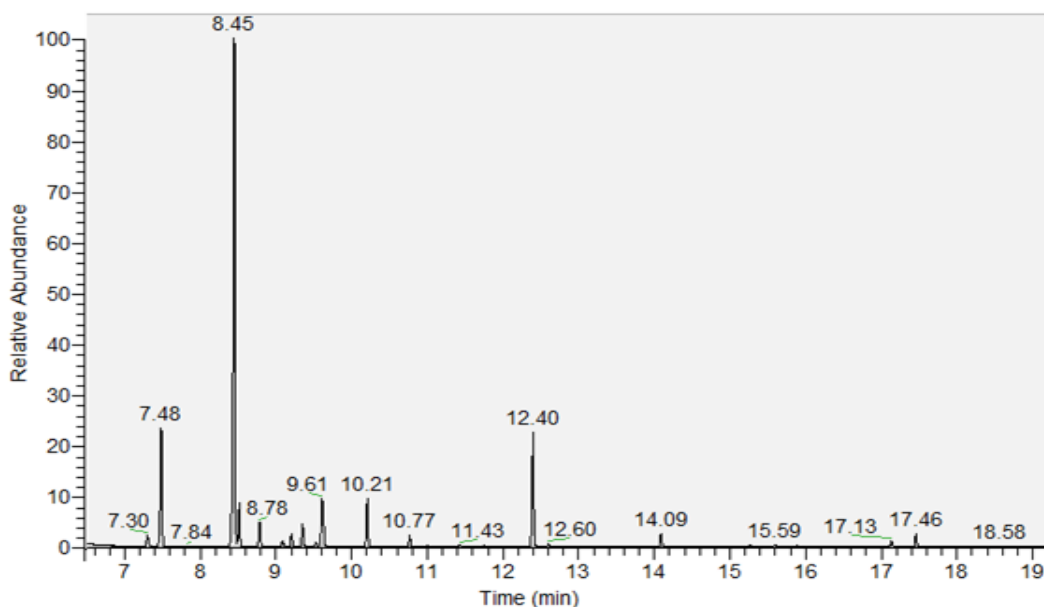


FIG. 4.5 Perfil cromatográfico do óleo essencial da noz moscada

Já na Figura 4.6 mostra as estruturas químicas dos três primeiros compostos

principais identificados no óleo essencial da noz moscada, tendo em vista que o quarto, limoneno, é o mesmo composto apresentado no Figura 4.2, pertencente também ao óleo essencial do anis-estrelado.

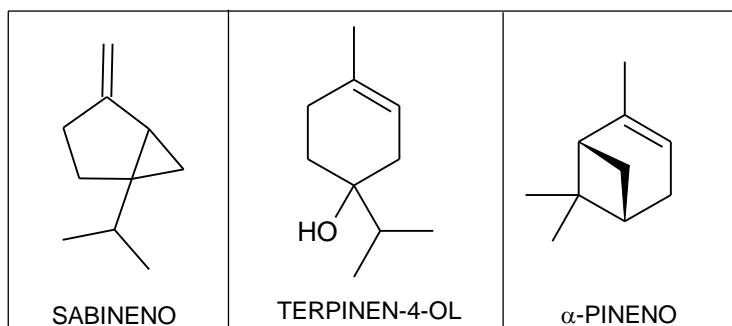


FIG. 4.6 Estruturas químicas dos principais compostos identificados no óleo essencial da noz moscada.

Os compostos identificados neste trabalho são exatamente os mesmos constituintes majoritários encontrados por Souza et al. (2012) só diferenciando as porcentagens relativas, pois seus compostos majoritários extraídos pela técnica de hidrodestilação são o sabineno (22,24%), α -pineno (21,39%) e limoneno (12,78%). O mesmo ocorre na pesquisa de Valente et al. (2005), que encontrou o monoterpene sabineno como majoritário (25,0%), seguido por α -pineno (14,1%) e terpin-4-ol (7,6%).

Outra diferença destacável é a concentração da miristicina em vários estudos, como é o caso do Abou-Elnaga (2014) e Tawatsin et al. (2006) que encontraram esse fenilpropanóide como constituinte majoritário, em concentração de 20,6% e 27,1%, respectivamente. Em outra pesquisa, Jung et al. (2007) utilizou a extração por solvente, fracionando o extrato metanólico em hexano, evidenciando, assim, o ácido mirístico com concentração de 57,5%, seguido pelo safrol (16,8%).

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA

4.3.1 ANIS-ESTRELADO

A atividade larvicida do óleo essencial do anis-estrelado foi testada em nove concentrações diferentes, sendo: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 mg/L. O número de

larvas de *A. aegypti* no seu 3º estágio utilizada foi de 80 larvas em cada teste para cada concentração. Os testes foram feitos em quadruplicata, totalizando 320 larvas por concentração. A mortalidade foi verificada após 24 horas de exposição, considerando mortas aquelas que não responderam a um toque com um bastão. A Figura 4.7 mostra a porcentagem de mortalidade pela concentração utilizada em mg/L.

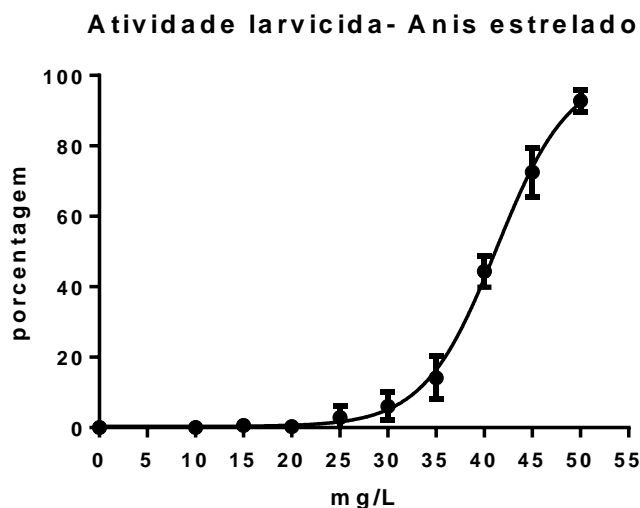


FIG. 4.7 Atividade larvicida do anis-estrelado

Até a concentração de 20 mg/L não apresentou atividade larvicida, visto que a taxa de mortalidade foi igual a zero, o mesmo aconteceu com o controle. Na tabela 4.8, verifica-se o valor da concentração letal de 50% (LC₅₀), ou seja, a concentração que mata 50% dos indivíduos de cada ensaio, de 39,8±0,7 mg/L Enquanto o LC₉₀ foi igual a 53,0±1,2 mg/L.

TAB. 4.8 Atividade larvicida do óleo essencial do anis-estrelado nas larvas do *A. aegypti*

Óleo essencial	Dose resposta			
	*LC50 (mg/L)	**IC50(mg/L)	LC 90 (mg/L)	IC 90 (mg/L)
Anis-estrelado	39,8	39,1 - 40,5	53,0	51,8 - 54,2

* Concentração letal ** Intervalo de Confiança

Conforme a literatura (Cheng et al. 2003), as substâncias que obtiverem valores de LC₅₀ menores que 100mg/L são classificados como bons agentes larvicidas. Na mesma direção, no Brasil, os agentes do órgão do governo federal responsável pelo controle e combate, FUNASA (2002), aplicam como inseticida o organofosforados Temephos nos locais que servem de criadouros das larvas do *A. aegypti*, numa concentração de 100 mg/L, sendo a mortalidade após 24 horas de 100% das larvas.

Dessa forma, segundo esses parâmetros que será utilizado para efeito de

comparação, observa-se que o óleo essencial do anis-estrelado pode ser classificado como excelente atividade larvicida.

O fenilpropanóide trans-anetol, constituinte majoritário do óleo essencial extraído do anis-estrelado (90,12%), tem sido citado na literatura por suas propriedades larvicida contra inúmeros insetos, tais como *Ceratitis capitata*, *Bactrocera dorsalis* e *Bactrocera cucurbitae* (Chang et al. 2009).

A erva-doce, *Foeniculum vulgare*, possui também o anetol como constituinte majoritário. De acordo com Chung et al. (2010), o óleo essencial da erva-doce apresentou um efeito tóxico significativo contra a larvas de *A. aegypti* em 4º estágio, com o LC₅₀ de 41,23 mg/L e o LC₉₀ de 65,24 mg/L, enquanto sua atividade sobre *Anopheles atraparvus*, encontrou um LC₅₀ e LC₉₀ de 39 mg/L e 50 mg/L, respectivamente.

De acordo com Sikkema et al. (1994), o caráter lipofílico do trans-anetol, que pode se partir em fase aquosa e penetrar na membrana celular, levando a expansão da mesma, aumento da permeabilidade da célula e da fluidez, liberando os componentes intracelulares vitais à sobrevivência do microrganismo. Outro cenário é a inativação de enzimas responsáveis pela produção de energia e na síntese de componentes estruturais do microrganismo, conduzindo a inativação ou destruição do material genético.

Outro componente, o monoterpene limoneno, mesmo em menor quantidade (2,09%), também possui atividade larvicida, pois atuando contra larvas de 4º estágio de *Culex quinquefasciatus* teve valor de LC₅₀ = 30,6 mg/L (Ibrahim et al. 2001).

4.3.2 PIMENTA DA JAMAICA

A atividade larvicida do óleo essencial da pimenta da Jamaica foi testada em nove concentrações diferentes, sendo: 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 e 130 mg/L. O número de larvas de *A. aegypti* no seu 3º estágio foi o mesmo utilizado para os ensaios com o óleo essencial do anis-estrelado, ou seja, 320 larvas por concentração. A mortalidade foi também verificada após 24 horas de exposição. A Figura 4.8 mostra a porcentagem de mortalidade pela concentração utilizada em mg/L.

Atividade larvicida- Pimenta da Jamaica

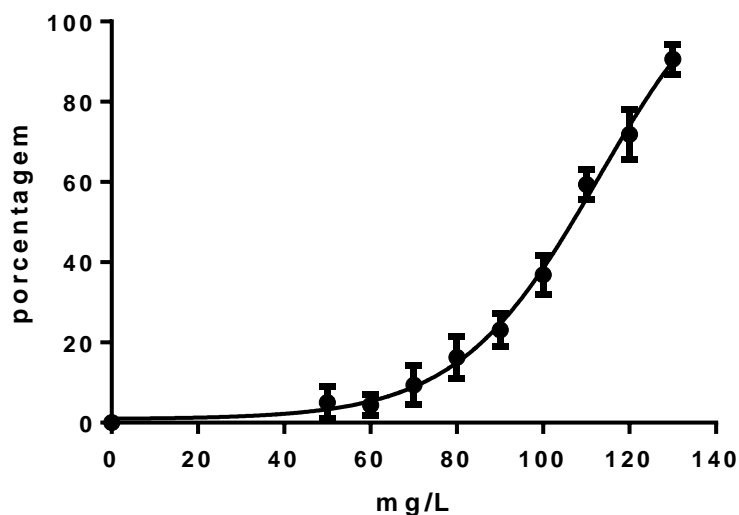


FIG. 4.8 Atividade larvicida da pimenta da Jamaica

Apenas no controle não houve atividade larvicida, com a taxa de mortalidade igual a zero. Na Tabela 4.9, observa-se que o valor da concentração letal de 50% (LC₅₀) foi de 104,4±1,5 mg/L. Enquanto que o valor do LC₉₀ foi igual a 137,3±2,8 mg/L.

TAB. 4.9 Atividade larvicida do óleo essencial da pimenta da Jamaica nas larvas do *A. aegypti*

Óleo essencial	Dose resposta			
	*LC ₅₀ (mg/L)	**IC ₅₀ (mg/L)	LC 90 (mg/L)	IC 90 (mg/L)
Pimenta da Jamaica	104,4	102,9 – 105,9	137,3	134,5 – 140,1

* Concentração letal ** Intervalo de Confiança

De acordo com Cheng et al. (2013), o óleo essencial da pimenta da Jamaica não pode ser considerado um bom agente larvicida, devido ao seu LC₅₀ ser maior que 100 mg/L, porém é certo que seu óleo tem atividade larvicida, mesmo que mediana. Por outro lado, Pavela (2009) reportou um LC₅₀ de 77,2mg/L e LC₉₀ de 118,5mg/L contra larvas de *Culex quinquefasciatus*, sendo assim considerado por ele um bom agente larvicida para esse inseto.

Os fenilpropanóides metil-eugenol e eugenol, ambos os majoritários do óleo essencial extraído da pimenta da Jamaica, são relatados na literatura como excelentes agentes larvicidas. Simas et al. (2004), em sua pesquisa sobre produtos naturais no combate à dengue, identificaram diversas substâncias com atividade larvicida, além do metil-eugenol (LC₅₀=44,5mg/L), outras classes como o monoterpeno β-pineno (LC₅₀=42,3mg/L) e o sesquiterpeno farneseno (LC₅₀=13,0mg/L), que também estão presentes no óleo essencial da pimenta da Jamaica. Esses mesmos autores também

verificaram que características estruturais, como por exemplo, a dupla ligação exocíclica do β -pineno parece ser mais importante para a atividade biológica do que a endocíclica do α -pineno.

Outro óleo essencial que é constituído basicamente por o eugenol (70 a 80%) e metil-eugenol (15%) é o cravo-da-índia, *S. aromaticum*. Seu óleo essencial já mostrou atividades inseticidas contra diversos insetos, tais como: *Pediculus capitis*, *Tribolium castaneum*, *Culex pipiens*, *Dermatophagoides farinae*, *D. pteronyssinus*, *Sitophilus zeamais*, *Psoroptes cuniculi* e *cupins japoneses* (Affonso et al. 2012).

Ainda em relação aos dois constituintes majoritários, eugenol apresentou potencial fungicida inibindo o crescimento em 100% de *A. glaucus*, *A. niger*, *C. musae*, *C. gloeosporopoides*, *F. oxysporum* e *F. semitectum*, enquanto o metil-eugenol inibiu em 100% os fungos *C. musae* e *A. glaucus* (Valente et al. 2005).

O monoterpeneo β -pineno, um composto minoritário no óleo essencial da pimenta da Jamaica, que também está presente no óleo essencial de plantas da família *Boraginaceae*, teve destaque na ação larvicida frente ao *A. aegypti* (Santos et al. 2006).

4.3.3 NOZ MOSCADA

A atividade larvicida do óleo essencial das sementes de noz moscada foi testada em nove concentrações diferentes, sendo: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 mg/L. Utilizaram-se 320 larvas *A. aegypti* no seu 3º estágio, o mesmo número dos ensaios com o óleo essencial do anis-estrelado e pimenta da Jamaica, sendo a mortalidade verificada após 24 horas de exposição. A Figura 4.9 mostra a porcentagem de mortalidade pela concentração utilizada em mg/L.

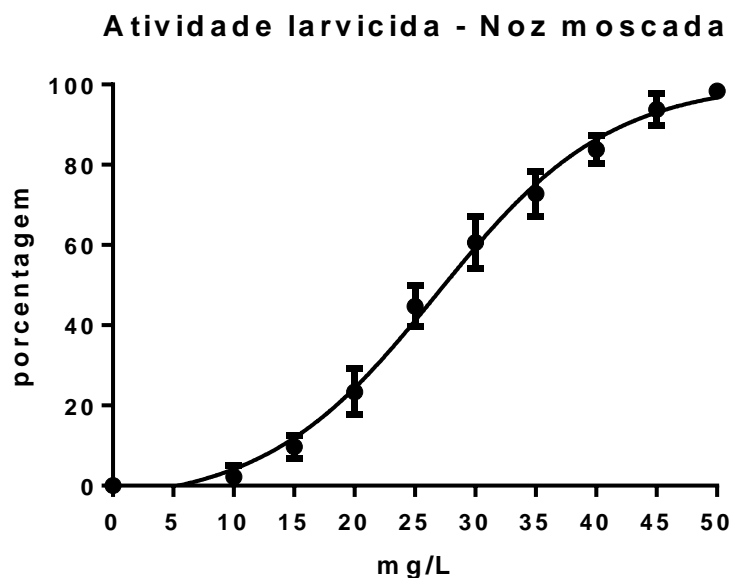


FIG. 4.9 Atividade larvicida da noz moscada

Todas as concentrações tiveram alguma atividade larvicida, menos no controle, visto que sua taxa de mortalidade foi igual a zero. O valor da LC_{50} foi determinado como $28,2 \pm 0,6$ mg/L (Tabela 4.10). Já LC_{90} foi igual a $41,7 \pm 1,0$ mg/L. Esse resultado mostra que o óleo essencial da noz moscada pode ser considerado excelente larvicida e teve o melhor desempenho entre as três testadas.

TAB. 4.10 Atividade larvicida do óleo essencial da noz moscada nas larvas do *A. aegypti*

Óleo essencial	Dose resposta			
	* LC_{50} (mg/L)	** IC_{50} (mg/L)	LC_{90} (mg/L)	IC_{90} (mg/L)
Noz moscada	28,2	27,6 – 28,8	41,7	40,7 – 42,7

* Concentração letal ** Intervalo de Confiança

Abou-Elnaga (2014), em sua pesquisa contra *A. aegypti*, reportou um LC_{50} de 28,8mg/L, a mesma atividade encontrada nesse trabalho, já o valor do LC_{90} foi bem superior (151,4mg/L) em relação ao encontrado (43,6 mg/L). O óleo essencial da noz moscada utilizado continha uma composição um pouco diferente, por ter como componentes majoritários a miristicina (20,6%), sabinene (15,4%) e Terpene-4-ol (14,9%). Ele também testou a miristicina isolada, conseguindo uma melhor atividade no LC_{50} (22,9mg/L) e pior no LC_{90} (119,2mg/L). Ainda em seus estudos, verificou a atividade larvicida da noz moscada contra *Cx. pipiens*, com o LC_{50} e LC_{90} de 28,5mg/L e 147,9 mg/L, respectivamente.

Já outro trabalho, (Valente et al. 2005), utilizando a miristicina isolada, porém para avaliar o potencial fungicida, verificaram a inibição do crescimento de 73 a 88% dos

fungos *A. niger*, *C. musae*, *C. gloeosporopoides*, *F. oxysporum* e *F. semitectum*.

De acordo com Baskar et al. (2017), o *Atalantia monophylla* possui como componente majoritário o monoterpeno sabineno, o mesmo da noz moscada utilizada nessa pesquisa. Eles reportaram um LC_{50} de 9,74mg/L contra a larva do *A. aegypti* no 2º estágio e um LC_{50} =14,97mg/L no 4º estágio. Em outro estudo, Zahran et al. (2017), utilizando o *Origanum vulgare* que também possuía o mesmo majoritário (sabineno), verificaram um LC_{50} de 8,40 mg/L contra a larva em 4º estágio do *Culex pipens*.

Outro constituinte minoritário do óleo essencial de noz moscada, α -pineno (12,65%), apresentou atividade larvicida contra o *A. aegypti*. Morais et al. (2006) reportaram atividade deste elemento nas folhas de *Croton argyrophyllodes* (LC_{50} = 102mg/L), *Croton sonderianus* (LC_{50} = 104mg/L) e *Croton zehntneri* (LC_{50} = 28 mg/L), onde é encontrado como majoritário.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ADULTICIDA

Para avaliar a atividade adulticida, utilizou-se o método da aplicação tópica que indica a toxicidade intrínseca do composto contra o mosquito *A. aegypti*. Os óleos essenciais necessitam ser dissolvidos em substâncias minimamente polares ou polares, por causa de sua natureza lipofílica. Nesse trabalho, utilizou-se acetona, um solvente de polaridade intermediária que dissolve a epicutícula dos insetos. Nesse método de aplicação, as substâncias são colocadas diretamente sobre a exocutícula. Ao atravessar a cutícula, difundem vertical e horizontalmente. Na difusão vertical, as substâncias passam do tegumento para a epiderme, penetram no organismo e são distribuídas pela hemolinfa unida em proteínas ou dissolvida em lipídeos. Ao se difundir horizontalmente, chegam ao sistema traqueal onde continuam a penetrar para o resto dos tecidos no organismo e, portanto, atingem seus locais de ação. Diferente da exposição a vapores ou na impregnação de papel, a volatilidade em aplicações tópicas não é tão significativa, enquanto outras propriedades, como o coeficiente de partição octanol/água, se tornam mais importantes (Tarelli et al. 2009).

4.4.1 ANIS-ESTRELADO

A atividade aduicida do óleo essencial de frutos de anis-estrelado foi testada em sete concentrações diferentes, sendo expressa cada dosagem em microgramas de material vegetal por miligrama de peso corporal de cada mosquito (1,7mg). As dosagens utilizadas foram: 3,67; 7,35; 9,56; 11,76; 14,7; 17,65 e 20,59 µg/mg fêmea. O número de adultas fêmeas de *A. aegypti* foi de 60 em cada teste para cada concentração. Os testes foram feitos em triplicata, totalizando 180 mosquitos por concentração. O knockdown foi verificado após 1 hora e a mortalidade após 24 horas de aplicação do óleo. A Tabela 4.11 mostra a porcentagem de knockdown e mortalidade pela concentração utilizada em µg/mg fêmea.

TAB. 4.11 Atividade aduicida do anis-estrelado após 1 e 24 horas

Óleo Essencial (µg/mg fêmea)	% Knockdown (média±DP)	Atividade aduicida (KC) 1 hora (95% IC, µg/mg fêmea)	% Mortalidade (média±DP)	Atividade aduicida (LC) 24 horas (95% IC, µg/mg fêmea)	
Controle	2,2±1,9		1,7±1,9		
3,67	18,9±3,6		11,7±4,5		
7,35	54,4±7,7		28,9±2,9		
9,56	68,3±8,1	KC ₅₀	48,9±4,5	LC ₅₀	LC ₉₀
11,76	83,3±5,4	7,32±0,53	61,7±3,3	10,34±0,52	17,49±0,80
14,7	88,3±3,6		76,7±3,6		
17,65	95,6±3,8		90,8±2,9		
20,59	98,3±1,9		97,2±2,9		

Todas as concentrações tiveram alguma atividade aduicida de knockdown, até no controle com uma porcentagem de 2,2%. O mesmo ocorre com a atividade aduicida após 24 horas, onde todas as concentrações obtiveram mortalidade, sendo a menor no controle com 1,7%. O valor da concentração de knockdown de 50% (KC₅₀), ou seja, a concentração que derruba 50% dos indivíduos de cada ensaio, foi determinada como 7,32±0,53 µg/mg fêmea. Enquanto o valor do LC₅₀ foi igual a 10,34±0,52 µg/mg fêmea e o LC₉₀ foi de 17,49±0,80 µg/mg fêmea. Esse resultado, com o KC₅₀ menor que LC₅₀, pode ser causado, pelo menos parcialmente, aos processos toxicocinéticos, no qual as substâncias são degradadas durante sua distribuição ao longo do organismo antes de atingir o local de ação. O knockdown pode ser diretamente relacionado com a mortalidade no campo, já que existe o aumento da probabilidade de predação, desidratação ou alimentação, pois impede o inseto de fugir do predador, obter água para

sobreviver ou obter o néctar.

Os resultados obtidos por Chaiyasit et al (2006) na aplicação tópica de óleo de anis-estrelado em duas cepas distintas de *A. aegypti*, uma de laboratório e outra de campo, encontrou-se a mesma eficiência adulticida de ambas, com $LC_{50} = 8,52 \pm 0,38 \mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea (laboratório) e $8,83 \pm 0,40 \mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea (campo) e uma pequena diferença em relação a esse trabalho de 10,3% e 6,4%, respectivamente. Enquanto o LC_{90} não difere do encontrado nesse trabalho ($17,49 \pm 0,80 \mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea), já que na cepa de laboratório o LC_{90} foi de $15,96 \pm 1,53 \mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea e na cepa do campo $16,73 \pm 1,71 \mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea. Em outro estudo utilizando aplicação tópica em *A. aegypti*, Norris et al. (2015) encontraram uma atividade adulticida semelhante ($LC_{50} = 11,6 \pm 0,6 \mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea), enquanto para knockdown, eles utilizaram só a concentração de $15 \mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea e encontraram uma porcentagem de knockdown menor que 10%.

4.4.2 PIMENTA DA JAMAICA

A atividade adulticida do óleo essencial de frutos de pimenta da Jamaica foi testada em oito concentrações diferentes: 2,20; 4,41; 9,56; 14,7; 19,85; 25,00; 30,15 e $35,30 \mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea. O número de adultas fêmeas de *A. aegypti* utilizadas foram o mesmo dos ensaios com anis-estrelado, isto é, um total de 180 mosquitos por concentração. A Tabela 4.12 mostra a porcentagem de knockdown e mortalidade pela concentração utilizada em $\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea.

TAB. 4.12 Atividade adulticida da pimenta da Jamaica após 1 e 24 horas

Óleo Essencial ($\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea)	% Knockdown (média \pm DP)	Atividade adulticida (KC)		Atividade adulticida (LC)	
		1 hora (95% IC, $\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea)	% Mortalidade (média \pm DP)	24 horas (95% IC, $\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea)	
Controle	3,3 \pm 1,6		0,0 \pm 0,0		
2,20	12,8 \pm 3,6		7,8 \pm 4,3		
4,41	29,3 \pm 3,9		20,2 \pm 4,9		
9,56	44,4 \pm 5,3		33,9 \pm 2,9		
14,70	67,2 \pm 5,8	KC ₅₀ 11,38 \pm 0,87	42,0 \pm 2,7	LC ₅₀ 16,58 \pm 0,98	LC ₉₀ 31,39 \pm 1,65
19,85	78,3 \pm 4,9		60,6 \pm 3,5		
25,00	92,4 \pm 3,9		71,3 \pm 6,3		
30,15	95,0 \pm 4,9		83,7 \pm 5,1		
35,30	98,1 \pm 3,2		95,0 \pm 4,9		

A atividade adulticida de knockdown foi verificada em todas as concentrações, sendo no controle a menor porcentagem de 3,3%. Já na atividade adulticida após 24 horas, apenas no controle não foi observada mortalidade. O valor do KC_{50} foi de $11,38 \pm 0,87$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea. O valor do LC_{50} foi igual a $16,58 \pm 0,98$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ e o LC_{90} foi de $31,39 \pm 1,65$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea.

Uma vez que não existam relatórios disponíveis sobre o efeito da toxicidade de extratos brutos ou do óleo essencial dos frutos da pimenta da Jamaica pelo método de aplicação tópica, fica difícil realizar a comparação dos dados desse trabalho. O que existe são alguns estudos sobre o efeito de substâncias como o eugenol ou metil-eugenol que também estão presentes, como constituintes majoritários, no óleo essencial da pimenta da Jamaica. As atividades adulticidas do eugenol ($LC_{50} = 31,0$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea e $30,7$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea) e do metil eugenol ($LC_{50} = 29,4$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea e $85,3$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea) foram avaliadas, respectivamente, contra insetos *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneu* (Huang et al. 2002), insetos comumente conhecidos como “gorgulhos” de grãos. É importante salientar que *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* possuem massa 1,7 e 1,3 vezes maior que o *A. aegypti*, respectivamente, e isso pode influenciar na concentração necessária para a ação do produto.

Utilizando a metodologia de papel impregnado, contra fêmeas de *A. aegypti*, Samarasekera et al. (2011) encontraram um $KC_{50} = 0,99$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ e $LC_{50} = 2,03$ $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tais resultados foram semelhantes aos obtidos nesse estudo, apesar do uso de métodos diferentes, pois nosso valor do KC_{50} ($11,38 \pm 0,87$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea) também foi menor que o LC_{50} ($16,58 \pm 0,98$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea).

4.4.3 NOZ MOSCADA

A atividade adulticida do óleo essencial de frutos de noz moscada foi testada em sete diferentes dosagens: 4,41; 10,29; 16,18; 22,06; 25,74; 27,94 e 33,82 $\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea. Nos testes utilizaram um total de 180 fêmeas adultas de *A. aegypti* por concentração. A Tabela 4.13 mostra a porcentagem de knockdown e mortalidade pela concentração utilizada em $\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea.

TAB. 4.13 Atividade adulticida da noz moscada após 1 e 24 horas

Óleo Essencial ($\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea)	% Knockdown (média \pm DP)	Atividade adulticida (KC)		Atividade adulticida (LC)	
		1 hora (95% IC, $\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea)	% Mortalidade (média \pm DP)	24 horas (95% IC, $\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea)	
Controle	1,7 \pm 1,9		1,7 \pm 2,9		
4,41	9,3 \pm 3,8		12,6 \pm 6,2		
10,29	21,3 \pm 4,5		22,8 \pm 3,7		
16,18	38,8 \pm 4,0	KC ₅₀	46,7 \pm 4,4	LC ₅₀	LC ₉₀
22,06	55,6 \pm 5,2	19,95 \pm 0,93	56,9 \pm 3,8	18,45 \pm 0,95	31,87 \pm 1,50
25,74	67,6 \pm 3,7		70,2 \pm 7,3		
27,94	85,2 \pm 5,1		83,7 \pm 5,7		
33,82	95,2 \pm 3,2		95,6 \pm 6,1		

Todas as concentrações tiveram alguma atividade adulticida, tanto no knockdown (1 hora após a aplicação) quanto em 24 horas, mesmo os controles das duas avaliações tiveram alguma atividade. O valor do KC₅₀ foi de 19,95 \pm 0,93,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea. Enquanto o valor do LC₅₀ foi de 18,45 \pm 0,95 $\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea e o LC₉₀ foi de 31,87 \pm 1,50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea. Diferente dos outros óleos essenciais estudados, o da noz moscada mostrou um KC₅₀ maior que o LC₅₀. Isso sugere que as fêmeas adultas do *A. aegypti* não são capazes de metabolizar esse óleo, ou seja, suas enzimas de desintoxicação não conseguem efetivamente retirar os componentes tóxicos desse óleo do organismo dos insetos. Além dos fatores citados anteriormente sobre o aumento da mortalidade no campo, uma elevada atividade adulticida de knockdown pode permitir que alguns fungos entomopatogênicos colonizem as fêmeas adultas, levando o nível de mortalidade, mesmo se o óleo essencial não levar à morte em 24 horas (Norris et al. 2015).

Norris et al. (2015), em sua pesquisa fazendo o uso do método de aplicação tópica em *A. aegypti*, utilizaram dois tipos de noz moscada, um do Oeste e outro do Leste da Índia, encontraram o LC₅₀ de 19,1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ e LC₅₀ de 33,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente. A noz moscada do Oeste possuiu uma atividade comparável à encontrada nesse trabalho, tendo vista que a composição do óleo essencial é semelhante com o encontrado nesse estudo (LC₅₀ = 18,45 \pm 0,95 $\mu\text{g}/\text{mg}$ fêmea). Enquanto o óleo essencial da noz moscada do Leste teve 80% menos atividade. Segundo os autores, o diferente resultado é atribuído à maior concentração de α - e β -pineno encontrada no óleo extraído da nos moscada do Oeste. Já em relação ao knockdown, eles utilizaram apenas uma concentração, 40 $\mu\text{g}/\text{mg}$, verificando uma porcentagem de knockdown de 20% para a do Leste e 70% para do

Oeste, ficando bem abaixo em relação a este trabalho que utilizando 33,82 µg/mg fêmea obteve-se uma porcentagem de knockdown de 95,6%.

Senthilkumar et al. (2009), utilizando o método de impregnação de papel com o extrato etanólico do óleo de noz moscada, encontrou uma toxicidade adulticida de $LC_{50}= 0,954$ ppm e $LC_{90}= 29,26$ ppm. Por outro lado, (Subramaniam & Murugan 2013), realizando a mesma metodologia de Senthilkumar, verificou uma atividade muito menor da noz moscada, relatando um $LC_{50}= 92,2$ ppm e $LC_{90}= 207,05$ ppm.

Todos os óleos essenciais testados tem potencial adulticida encorajador, sendo que o anis-estrelado apresentou uma mortalidade induzida ($LC_{50}= 10,34\pm 0,52$ µg/mg fêmea) significativamente maior que a observada para a pimenta Jamaica ($LC_{50}= 16,58\pm 0,98$ µg/mg fêmea) e a noz moscada ($LC_{50}= 18,45\pm 0,95$ µg/mg fêmea), que apresentaram efeito de knockdown similares. porém não tanto quando comparados aos inseticidas sintéticos convencionais. Corbel et al. (2004) reportaram a excelente toxicidade intrínseca de inseticidas químicos pelo método da aplicação tópica contra diversas espécies de mosquitos. O LC_{50} da permetrina, bifentrina e temephos foram 0,24, 0,077 e 195 ng/mg, respectivamente, quando testadas contra fêmeas adultas de *A. aegypti*, ou seja, até 10000 vezes mais potentes. Porém um fato importante não pode ser ignorado: esses inseticidas sintéticos selecionam resistência nos mosquitos após o uso prolongado, o que gera a necessidade de um manejo de inseticida. Poucas classes de produtos químicos são liberadas para uso no controle de insetos de importância médica e os produtos oriundos de fontes naturais se tornam uma alternativa cada vez mais interessante.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REPELENTE

Para avaliar a atividade repelente, foi utilizado o método da aplicação tópica em voluntários sadios para verificar a repelência dos óleos essenciais contra fêmeas adultas do mosquito *A. aegypti*.

4.5.1 ANIS-ESTRELADO

A atividade repelente do óleo essencial de frutos do anis-estrelado foi testada em sete diferentes dosagens: 0,125; 0,375; 0,625; 1,000; 3,000; 5,000 e 10,000 mg em uma área de 25cm². Nos testes, foi utilizada uma gaiola com um total de 120 fêmeas adultas de *A. aegypti* sem alimentação por 1 dia. A Tabela 4.14 mostra a porcentagem de repelência do óleo essencial do anis-estrelado e dose efetiva de 50% (ED₅₀) e 90% (ED₉₀) expressa em mg/cm².

TAB. 4.14 Atividade repelente do anis-estrelado

Óleo Essencial (mg/cm ²)	% Repelência	Dose Efetiva 50% (95% IC, mg/cm ²)	Dose Efetiva 90% (95% IC, mg/cm ²)
Controle	0,00		
0,005	11,327		
0,015	22,864		
0,025	36,346	ED ₅₀	ED ₉₀
0,040	43,423	0,097±0,003	0,299±0,029
0,120	67,310		
0,200	82,103		
0,400	91,025		

Na Tabela 4.14, observa-se que a repelência foi dose dependente, com o valor da ED₅₀ de 0,097±0,003 mg/cm². Enquanto que o valor do ED₉₀ foi igual a 0,299±0,029 mg/cm².

O efeito de repelência do constituinte majoritário do anis-estrelado (trans-anetol) foi demonstrado por Guo et al. (2017) e Bedini et al. (2016) contra alguns artrópodes considerados pestes de grãos armazenados. Os primeiros, em seu trabalho, verificaram uma forte repelência de 86% contra *T. castaneum* (0,015mg/cm²) e de 68% contra *L. bostrychophila* (0,031 mg/cm²). Já os segundos, encontraram um ED₅₀ de 0,612, 0,271 e 0,094 mg/cm² contra os artrópodes *R. dominica*, *S. zeamais* e *T. confusum*, respectivamente. Eles também, utilizando o limoneno, o segundo constituinte majoritário do anis-estrelado, observando um ED₅₀ de 0,099 mg/cm² (*R. dominica*), 0,213 mg/cm² (*S. zeamais*) e 0,409 mg/cm² (*T. confusum*).

Wei et al. (2014) também demonstraram a repelência dos frutos de anis-estrelado extraídos por álcool metílico (AM), acetato de etila (AE) e éter de petróleo (EP) contra *Sitophilus zeamais*, encontrando uma porcentagem de repelência de 57,14 (AM), 86,08 (AE) e 73,24 (EP) com a dose fixa de 0,125 mg/cm².

4.5.2 PIMENTA DA JAMAICA

A atividade repelente do óleo essencial de frutos do anis-estrelado foi testada em sete diferentes dosagens: 0,125; 0,250; 0,500; 1,000; 1,500; 2,000 e 5,000 mg em uma área de 25cm². A Tabela 4.15 mostra a porcentagem de repelência do óleo essencial da pimenta da Jamaica e a dose efetiva de 50% (ED₅₀) e 90% (ED₉₀) expressa em mg/cm².

TAB. 4.15 Atividade repelente da Pimenta da Jamaica

Óleo Essencial (mg/cm ²)	% Repelência	Dose Efetiva 50% (95% IC, mg/cm ²)	Dose Efetiva 90% (95% IC, mg/cm ²)
Controle	0,00		
0,005	11,96		
0,010	31,28		
0,020	42,12	ED ₅₀	ED ₉₀
0,040	58,19	0,035±0,004	0,116±0,012
0,060	73,58		
0,080	83,99		
0,200	93,78		

Verifica-se que a repelência também foi dose dependente e o valor de ED₅₀ foi de 0,035±0,004 mg/cm². Enquanto que o valor do ED₉₀ foi igual a 0,116±0,012 mg/cm² (Tabela 4.15).

No trabalho realizado por combatentes de unidade militar cubana com creme à base de óleo essencial da pimenta da Jamaica, foi verificado que durante a exposição de 5 horas aos mosquitos *A. aegypti*, não houve picadas em 100% dos combatentes tratados com o creme repelente, sendo a diferença bastante significativa estaticamente com o resultado do creme placebo (Rodríguez et al. 1997).

Em outro estudo, utilizou-se o eugenol puro, um dos constituintes majoritário do óleo essencial da pimenta da Jamaica no teste de repelência contra mosquitos adultos de *A. aegypti*, obteve-se um ED₅₀ de 0,043±0,045 mg/cm² (Tabanca et al. 2013). Enquanto Ali et al. (2017), também analisando a repelência contra o *A. aegypti*, porém com o outro constituinte majoritário da pimenta da Jamaica, o metil-eugenol, encontrou um ED₅₀ de 0,019 mg/cm².

4.5.3 NOZ MOSCADA

A atividade repelente do óleo essencial de sementes da noz moscada foi testada em sete diferentes dosagens: 0,0625; 0,125; 0,500; 1,000; 3,000; 5,000 e 10,000 mg em uma área de 25cm². A Tabela 4.16 mostra a porcentagem de repelência do óleo essencial da noz moscada e a dose efetiva de 50% (ED₅₀) e 90% (ED₉₀) expressa em mg/cm².

TAB. 4.16 Atividade repelente da noz moscada

Óleo Essencial (mg/cm ²)	% Repelência	Dose Efetiva 50% (95% IC, mg/cm ²)	Dose Efetiva 90% (95% IC, mg/cm ²)
Controle	0,00		
0,003	10,71		
0,005	22,36		
0,020	38,67	ED ₅₀	ED ₉₀
0,040	46,00	0,082±0,004	0,274±0,011
0,120	66,44		
0,200	83,20		
0,400	93,10		

Na Tabela 16, observa-se que a dose dependência da atividade repelente, o valor de ED₅₀ e ED₉₀ de 0,082±0,004 e 0,274±0,011 mg/cm², respectivamente.

O óleo essencial extraído com etanol das sementes de noz moscada foi capaz de repelir mosquitos da malária, *Anopheles stephensi*, em teste com humanos com até 210 minutos de exposição, sem observação de alergia nos voluntários (Subramaniam & Murugan 2013). Com o óleo essencial extraído por hidrodestilado, apresentou tanto as sementes da *M. fragrans* quanto os seus principais componentes uma forte repelência ao besouro do cigarro, *Lasioderma serricorne*, em um teste de preferência de área com placas de Petri de 9 cm em laboratório (Du et al. 2014). Em outro estudo, o óleo essencial da noz moscada em humanos repeliu 4 tipos de espécies de mosquitos, são elas: *A. albopictus*, *A. aegypti*, *Anopheles dirus* e *Culex quinquefasciatus*, com diferentes durações de repelência observadas (intervalo: 2,8-8 h) (Tawatsin et al. 2006). Porém, Trongtokit et al. (2005) não observaram repelência utilizando óleo essencial diluído em 10 e 50% em testes contra o *A. aegypti*, apenas obteve uma repelência de 30 minutos com o óleo essencial não diluído.

Os três óleos essenciais testados possuem muito boa atividade repelente, com a maior atividade na pimenta da Jamaica (ED₅₀= 0,035±0,004 mg/cm²), seguida pela noz

moscada ($ED_{50} = 0,082 \pm 0,004 \text{ mg/cm}^2$) e o anis-estrelado ($ED_{50} = 0,097 \pm 0,003 \text{ mg/cm}^2$). Porém se compararmos com o DEET ($ED_{50} = 0,039 \pm 0,004 \text{ mg/cm}^2$) (Tabanca et al. 2013), o mais utilizado atualmente, apenas a pimenta da Jamaica tem valor semelhante, enquanto as outras duas tem valores 1,8 vezes (noz moscada) e 2,2 vezes (anis-estrelado) inferior.

Outro problema é em relação a persistência, já que muitos óleos vegetais, como a citronela, o cravo, o gerânio e a hortelã, também repelem os insetos, porém por períodos curtos, já que pelas suas altas volatilidades limitam a duração da eficácia quando aplicados topicamente (Brown et al. 1997). Existem algumas propriedades de um repelente de insetos que o tornam ideal. Dentre elas: a utilização eficaz contra a ampla gama de artrópodes, incluindo pulgas, moscas e mosquitos; aplicação na pele sem efeitos adversos; não ocasionar danos à roupa (coloração, branqueamento e desgaste); sem odor ou odor agradável; não deixar resíduos oleosos na pele; difícil remoção por lavagem, limpeza ou transpiração; quimicamente estável; não tóxico; e a eficácia da duração adequada (Katz et al. 2008). Nesse teste, verificou-se que os óleos essenciais foram eficazes contra o *A. aegypti*, além da não toxicidade na pele dos voluntários, os odores extremamente agradáveis, não ocasionaram danos à roupa e foram quimicamente estáveis.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

Os óleos essenciais podem causar uma ação neurotóxica em insetos semelhantes aos sintomas produzidos pelos inseticidas carbamatos e organofosforados. Nesse âmbito, os óleos essenciais do anis-estrelado, da noz moscada e da pimenta da Jamaica foram avaliados por meio de ensaios de microplacas para verificar sua capacidade de inibir as enzimas AChE e BChE significativamente. Para a primeira foi utilizada a enzima encontrada no *Electrophorus electricus* (eel-AChE), já para a segunda foi utilizada a enzima do soro de cavalo (HS-BChE).

4.6.1 ANIS-ESTRELADO

Os valores de IC_{50} (concentração do óleo essencial necessário para inibir 50% da enzima estudada) foram calculados por meio de regressão não-linear a partir de amostras do óleo essencial dissolvidas em metanol. Na Figura 4.10, o gráfico é referente à inibição da atividade da acetilcolinesterase para concentrações crescentes do óleo de anis-estrelado, sendo as doses testadas: 1; 2; 3; 4 e 5mg/mL. A sua atividade inibitória sobre a eel-AChE teve valor de $IC_{50}= 4,80\pm 0,26$ mg/mL, com um $R^2=0,977$.

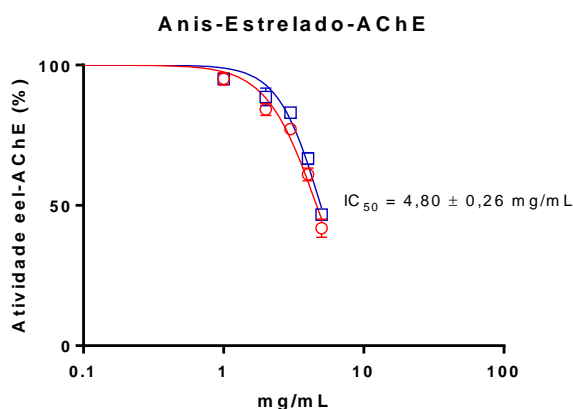


FIG. 4.10 Atividade antiacetilcolinesterásica do anis-estrelado

Verifica-se que para a atividade antiacetilcolinesterásica, o óleo essencial é dose-dependente, ou seja, quanto maior a concentração da amostra, maior é a sua porcentagem de inibição. Entretanto, para a inibição da atividade da BChE, não foi possível encontrar o IC_{50} , pois a inibição ficou por volta dos 30% na concentração máxima testada (8 mg/mL). Além disso, a utilização de concentrações elevadas desse óleo essencial acarretou na turbidez na amostra, inviabilizando o teste. Dessa forma, não foi viável realizar o gráfico da atividade antibutirilcolinesterásica.

Essa ação inibitória pode ser a causa dos sintomas relatados por Yang et al. (2010), onde foi verificado a toxicidade do óleo essencial de anis-estrelado em doses elevadas, causando efeitos de convulsões, anestesia e delírio. Na cultura chinesa e japonesa é utilizado para tratamento neurotrópico e analgésico.

Bhadra et al. (2011), utilizando-se da enzima AChE de eritrócitos bovinos e BChE de soro de cavalo, encontraram valores de IC_{50} igual a $0,039\pm 0,003$ e $0,075\pm 0,001$ mg/mL, respectivamente. O valor encontrado para a inibição da AChE é cerca de cem vezes menor do que o verificado nesse estudo, o que pode estar relacionado a enzima utilizada. Já em relação à inibição do BChE, que foi utilizado o mesmo tipo de enzima, a diferença só pode estar associada ao fruto utilizado.

Outra comparação que pode ser realizada é por meio do constituinte majoritário, o

trans-anetol. Menchini et al. (2009), em seus estudos, encontraram o IC_{50} de $0,135 \pm 0,002$ e $0,209 \pm 0,002$ mg/mL, para AChE e BChE respectivamente, utilizando os mesmos tipos de enzimas dessa pesquisa. Enquanto, Orhan et al. (2008), utilizando as mesmas enzimas e uma concentração fixa de 1mg/mL de trans-anetol puro, não obtiveram inibição das enzimas AChE e BChE.

4.6.2 PIMENTA DA JAMAICA

De acordo com a pesquisa bibliográfica realizada, o óleo essencial do fruto da pimenta da Jamaica ainda não foi estudado no que se refere a sua capacidade de inibir as enzimas AChE e BChE.

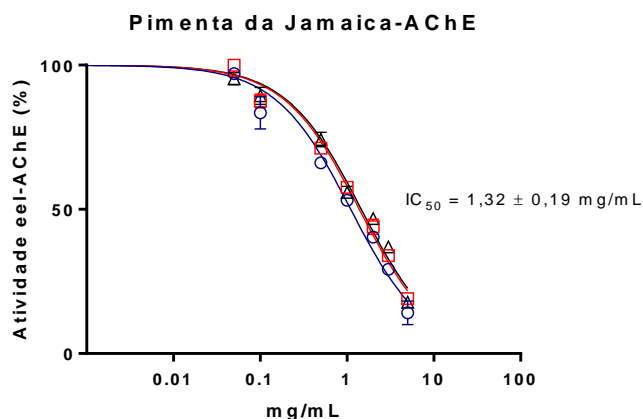


FIG. 4.11 Atividade antiacetilcolinesterásica da pimenta da Jamaica

A Figura 4.11 apresenta-se o gráfico referente à inibição da atividade enzimática da acetilcolinesterase para concentrações crescentes do óleo da pimenta da Jamaica, sendo as doses testadas: 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2; 3 e 5mg/mL. A sua atividade inibitória sobre a eel-AChE teve valor de $IC_{50} = 1,32 \pm 0,19$ mg/mL, com um $R^2 = 0,985$. Enquanto na Figura 4.12, foram testadas as mesmas concentrações para verificar a inibição da enzima HS-BChE, sendo o valor de $IC_{50} = 3,34 \pm 0,07$ mg/mL, com o $R^2 = 0,970$.

Verifica-se que em ambos os testes, o óleo essencial da pimenta da Jamaica é dose-dependente. Esse efeito inibitório foi verificado por Suarez e al. (2000), que utilizando as folhas da planta de pimenta da Jamaica, observaram um efeito depressor no sistema nervoso central, concomitantemente com efeitos analgésicos, podendo assim ser útil no tratamento de hipertensos.

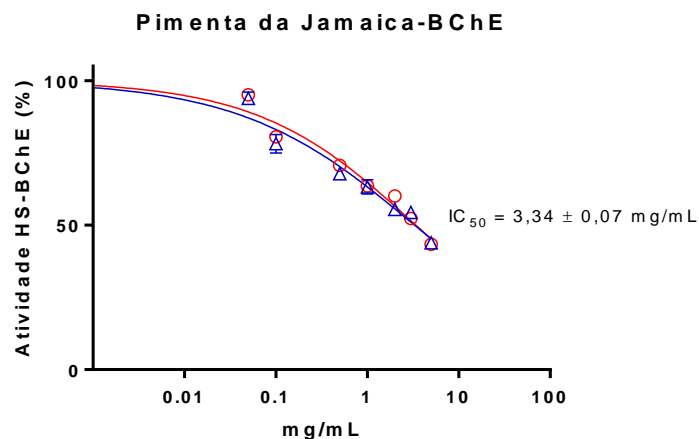


FIG. 4.12 Atividade antibutirilcolinesterásica da pimenta da Jamaica

Como não existem estudos referentes ao óleo essencial do fruto da pimenta da Jamaica, podem-se realizar comparações com outros trabalhos publicados que analisaram os mesmos componentes majoritários. É o caso de Dohi et al. (2009) que utilizaram substâncias puras em seu estudo sobre a inibição da AChE e encontrou para o eugenol o valor de $IC_{50} = 0,48 \pm 0,16$ mg/mL, uma inibição três vezes maior do que o encontrado nesse trabalho. Porém para o metil-eugenol não conseguiram encontrar o IC_{50} . O mesmo ocorreu com Silva et al. (2013), utilizando folhas de *Piper divaricatum*, que possui o metil-eugenol como componente majoritário (89%), não apresentou atividade frente ao AChE. Contudo, Orhan et al. (2008), utilizando uma concentração fixa de 1mg/mL de eugenol puro, relataram uma inibição de $45,4 \pm 0,78\%$ para a BChE, já para AChE não obtiveram nenhuma inibição.

Desse modo, pode-se sugerir a existência de interações químicas entre os constituintes dos óleos essenciais que pode ocasionar em antagonismo ou sinergismo, isto é, o componente puro pode ou não ser eficaz quanto combinado em uma matriz complexa.

4.6.3 NOZ MOSCADA

Para o óleo essencial de sementes de noz moscada, foram realizados testes de inibição da atividade da acetilcolinesterase nas seguintes concentrações: 0,1; 0,5; 2; 3; 5 e 7 mg/mL. Na Figura 4.13, o gráfico é referente a essa atividade, tendo como valor de $IC_{50} = 4,51 \pm 0,06$ mg/mL, com um $R^2 = 0,981$.

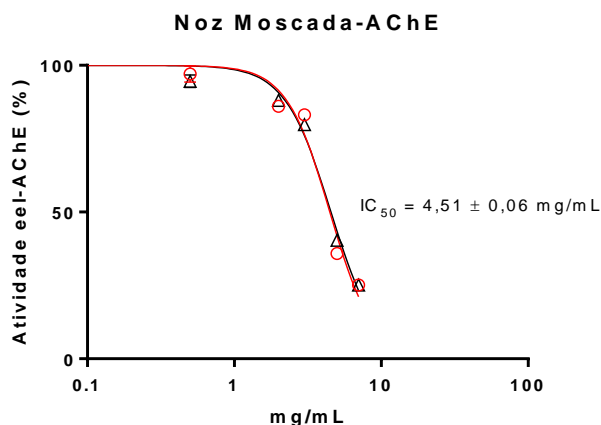


FIG. 4.13 Atividade antiacetilcolinesterásica da noz moscada

Na inibição da atividade butirilcolinesterásica foram usadas as seguintes doses: 0,1; 0,5; 2; 4 e 5mg/mL. A sua atividade inibitória sobre a HS-BChE teve valor de IC₅₀= 4,13±0,15mg/mL, com um R²=0,977, que pode ser visto na Figura 4.14 a sua curva ajustada não linearmente. Observa-se que em ambos os testes a inibição das enzimas são dose-dependente.

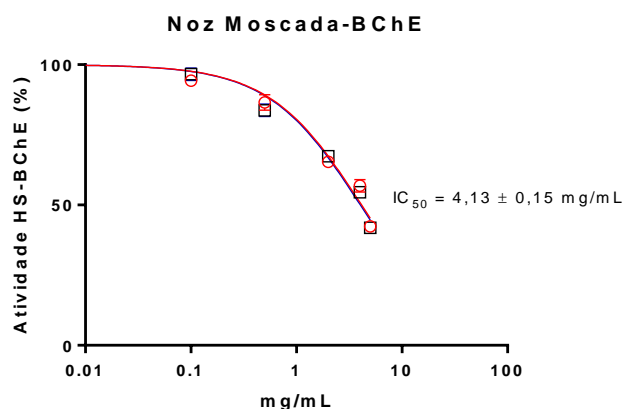


FIG. 4.14 Atividade antibutirilcolinesterásica da noz moscada

Essa semente é conhecida pelos seus efeitos psicoativos, possuindo atividades estimulantes e depressivas. Os componentes responsáveis são a elemicina, safrol e miristicina, todos precursores metabólicos de compostos do tipo MDA (Teixeira et al. 2008).

Existem poucos estudos sobre a inibição colinesterásicas do óleo essencial da semente da noz moscada, porém de acordo com Mukherjee et al. (2007), o efeito inibitório sobre AChE tem como valor de IC₅₀=0,133±0,011mg/mL, sendo assim uma inibição trinta vezes maior que neste trabalho, sendo que a diferença pode estar relacionada aos constituintes majoritários encontradas na noz moscada testado pelo

autor.

Outros estudos podem ser comparados a esse, por analisarem os mesmos constituintes majoritários, como é o caso de Menichini et al. (2009), que utilizando o sabineno nas enzimas colinesterásicas, verificaram um IC₅₀ de 0,176±0,003 e 0,218±0,003mg/mL, sobre a AChE e BChE, respectivamente. Enquanto Savalev et al. (2004), verificaram um IC₅₀=0,10±0,01mg/mL de inibição da AChE usando o α-pineno, porém não encontraram nenhuma inibição sobre BChE com o mesmo constituinte a 1mg/mL. Por fim, Orhan et al. (2008), com a mesma dose de 1mg/mL de α-pineno, conseguiram uma inibição de 76,3±1,27% de AChE e 23,5±1,08% de BChE.

Os três óleos essenciais testados apresentaram inibição para a AChE e BChE, menos o óleo essencial de anis-estrelado que não alcançou os 50% de inibição sobre a BChE, sendo a pimenta da Jamaica a que possui a maior inibição dentre os três. Porém se forem comparados a galantamina, um fármaco padrão utilizado como inibidor de colinesterase, verifica-se que não são tão eficazes assim. De acordo com Bhadra et al. (2011), a galantamina apresentou um IC₅₀ de 10.14±0.71 e 21.15±0.18 µg/mL para AChE e BChE, respectivamente, sendo 140 vezes mais potente que o óleo essencial da pimenta da Jamaica.

4.7 QUADRO RESUMO

TAB. 4.17 Quadro resumo das atividades dos óleos essenciais

Óleo Essencial Atividade	LARVICIDA LC ₅₀ (mg/L)	ADULTICIDA		REPELENTE ED ₅₀ (mg/cm ²)	ANTICOLINESTERÁSICA	
		1 H KC ₅₀ (µg/mg fêmea)	24 H LC ₅₀ (µg/mg fêmea)		AChE IC ₅₀ (mg/mL)	BChE IC ₅₀ (mg/mL)
Anis-Estrelado	39,76 (39,11 – 40,43)	6,43 (5,31-7,74)	9,75 (8,60 – 10,90)	0,097 (0,094 – 0,1000)	4,80 (4,54 – 5,06)	X
Pimenta da Jamaica	104,40 (102,94 – 105,92)	9,47 (8,63 – 10,31)	14,61 (13,41 – 15,81)	0,035 (0,031 – 0,039)	1,32 (1,13 – 1,51)	3,34 (3,27 – 3,41)
Noz moscada	28,19 (27,58 – 28,80)	22,19 (21,03 – 23,35)	21,92 (20,59 – 23,25)	0,082 (0,078 – 0,086)	4,51 (4,45 – 4,57)	4,13 (3,98 – 4,28)

Na tabela 4.17, observa-se um quadro resumo de cada óleo essencial e suas atividades. Verifica-se que cada óleo essencial é mais efetivo em uma atividade, ou seja,

o anis-estrelado é o 2º em larvicida, 1º em adulticida e 3º em repelência; a pimenta da Jamaica é a 3º em larvicida, 2º em adulticida e 1º em repelência; a noz moscada é a 1º em larvicida, 3º em adulticida e 2º em repelência. Isto é em decorrência dos constituintes ativos presentes nos óleos essenciais, já que, por serem diferentes e grande número (7 a 11 identificados), eles possuem múltiplos modos de ações, fazendo com que cada óleo essencial seja específico e efetivo para cada atividade. Além disso, esses constituintes possuem relações de sinergismo ou/e antagonismo, favorecendo ou não uma determinada atividade.

5 CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste trabalho e considerando os objetivos propostos, conclui-se que os óleos essenciais de anis-estrelado, pimenta da Jamaica e noz moscada têm efeito larvicida, adulticida e repelente contra o vetor *A. aegypti*.

Verificando o rendimento e preço por grama de cada planta desse estudo, verifica-se que utilização do anis-estrelado foi mais vantajoso, ou seja, com a mesma quantidade de dinheiro para a comprar as três plantas, o rendimento da extração do óleo essencial do anis-estrelado é maior.

Outro aspecto é os constituintes majoritários e suas classes. O anis-estrelado e a pimenta da Jamaica tiveram maior porcentagem de fenilpropanóides, 93,11% e 90,96%, respectivamente. Enquanto a noz moscada tem maior porcentual de monoterpenos (93,04%). Já em relação aos constituintes, o anetol, metileugenol e sabineno são os majoritários do anis-estrelado, pimenta da Jamaica e noz moscada, respectivamente.

Em relação a atividade anticolinesterásica, entre os três óleos, o anis-estrelado foi aquele com a menor efeito de inibição da AChE e não inibiu BChE, sendo, portanto, o menos tóxico. Esse resultado, quando comparado com sua ação adulticida ($LC_{50} = 10,34 \pm 0,52 \mu\text{g}/\text{mg}$ de fêmea), onde mostrou ser o mais eficiente entre os três, mostra claramente que o anis-estrelado é altamente tóxico para o inseto, mas sim seguro para uso humano, podendo facilmente ser usado como inseticidas. A noz-moscada, que foi equipotente para inibir ambas as enzimas, apresentou alta atividade larvicida ($LC_{50} = 0,0282 \text{ mg}/\text{mL}$), que poderia ser um agente larvicida promissor e ser usada em formulações para combater a proliferação de larvas de *A. aegypti*. Pimenta da Jamaica, que teve o maior efeito repelente entre os três óleos, teve a maior capacidade de inibição para ambas as enzimas e, portanto, era a mais tóxica aos seres humanos, mas nada comparado aos repelentes comuns; além de apresentar atividade larvicida média e menor ação adulticida do que os outros óleos, podendo ser utilizada em formulações de repelentes no lugar do consagrado, porém tóxico, DEET.

Em todas as formas, os três óleos são menos tóxicos para os seres humanos, o ambiente e a cultura do que os inseticidas e repelentes atualmente utilizados, abrindo a possibilidade de elaboração de um inseticida e repelente natural, eficaz, seguro e

ecológico para o controle do vetor *A. aegypti*.

Trabalhos futuros deverão ser desenvolvidos com o intuito de explorar o efeito destes óleos para estágios imaturos (ovos e pupas) desta praga, além do efeito de persistência. Outro ponto de deve ser estudado é as atividades de cada constituinte majoritário e a mistura (blend) desses óleos essenciais, além de testes com populações de campo, permeabilidade e citotoxicidade com os óleos essenciais.

Existem outros desafios um pouco mais avançados que ainda podem ser incluídos em futuras pesquisas como: (i) desenvolvimento de processos de estabilização eficientes (por exemplo, microencapsulação), (ii) estudos toxicológicos e efeitos dos óleos essenciais em organismos não-alvos (outras espécies), (iii) otimização das condições de criação de plantas e processos de extração para óleos essenciais de composição química homogênea, (iv) verificação dos mecanismos de ação e a relação de sinergismo e antagonismo de cada constituinte majoritário.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-ELNAGA, Zeinab Sh. Insecticidal bioactivity of eco-friendly plant origin chemicals against *Culex pipiens* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 2, n. 6, p. 340-347, 2014.
- AFFONSO, Raphael S. et al. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p. 146-161, 2012.
- ALI, Abbas; CANTRELL, Charles L.; KHAN, Ikhlas A. A New In Vitro Bioassay System for the Discovery and Quantitative Evaluation of Mosquito Repellents. **Journal of Medical Entomology**, 2017.
- BAKKALI, Fadil et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARROS JÚNIOR, Francisco Reivilandio da S. CHEMICAL STUDY AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FRUITS OF THE *Pimenta dioica* Lindl. 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado em QUÍMICA) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2011.
- BASILE, Kerri; KOK, Jen; DWYER, Dominic E. Zika virus: what, where from and where to?. **Pathology**, v. 49, n. 7, p. 698-706, 2017.
- BASKAR, Kathirvelu et al. Larvicidal and repellent activity of the essential oil from *Atalantia monophylla* on three mosquito vectors of public health importance, with limited impact on non-target zebra fish. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 2017.
- BHADRA, Santanu et al. Anticholinesterase activity of standardized extract of *Illicium verum* Hook. f. fruits. **Fitoterapia**, v. 82, n. 3, p. 342-346, 2011.
- BHATT, Samir et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-507, 2013.
- BEDINI, Stefano et al. Repellency of anethole- and estragole-type fennel essential oils against stored grain pests: the different twins. **Bull Insectol**, v. 69, n. 1, p. 149-57, 2016.

- BELTRÁN-SILVA, S. L. et al. Clinical and differential diagnosis: Dengue, chikungunya and Zika. **Revista Médica del Hospital General de México**, 2016.
- BRAGA, Ima Aparecida; VALLE, Denise. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e serviços de saúde**, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue, Chikungunya e Zika: Prevenção e Combate**. Disponível: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/dengue>. Acessado em 7 de Agosto de 2017.
- BRICKS, Lucia Ferro. Vacinas para a dengue: perspectivas. **Pediatria**, v. 26, n. 4, p. 268-281, 2004.
- BROWN, Margaret et al. Insect repellents: an overview. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 36, n. 2, p. 243-249, 1997.
- CAI, Ming et al. Microwave-assisted extraction and antioxidant activity of star anise oil from *Illicium verum* Hook. f. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, n. 11, p. 2324-2330, 2013.
- CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006.
- CASTRO, Nilmar Eduardo Arbex de. Caracterização fitoquímica de óleos essenciais de eucalipto e seu efeito sobre protozoário tripanosomatídeo *Herpetomonas samuelpessoai*. 2006. 82 p. Doutorado em Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras.
- CHAIYASIT, Dana et al. Essential oils as potential adulticides against two populations of *Aedes aegypti*, the laboratory and natural field strains, in Chiang Mai province, northern Thailand. **Parasitology research**, v. 99, n. 6, p. 715, 2006.
- CHANG, Chiou Ling; CHO, Il Kyu; LI, Qing X. Insecticidal activity of basil oil, trans-anethole, estragole, and linalool to adult fruit flies of *Ceratitis capitata*, *Bactrocera dorsalis*, and *Bactrocera cucurbitae*. **Journal of economic entomology**, v. 102, n. 1, p. 203-209, 2009.

- CHENG, Sen-Sung et al. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 99-102, 2003.
- CHUNG, Ill-Min; RO, Hee-Myong; MOON, Huyng-In. RETRACTED: Major essential oils composition and immunotoxicity activity from leaves of *Foeniculum vulgare* against *Aedes aegypti* L. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 33, n. 3, p. 450-453, 2011.
- COLLER, Beth-Ann G.; CLEMENTS, David E. Dengue vaccines: progress and challenges. **Current opinion in immunology**, v. 23, n. 3, p. 391-398, 2011.
- CORBEL, Vincent et al. Dinotefuran: a potential neonicotinoid insecticide against resistant mosquitoes. **Journal of medical entomology**, v. 41, n. 4, p. 712-717, 2004.
- CUNHA, A. P. et al. Fármacos aromáticos (plantas aromáticas e óleos essenciais). **Farmacognosia e Fitoquímica, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian**, p. 339-401, 2005.
- DE OLIVEIRA, Rosilene Aparecida et al. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.
- DEARLOVE, Rebecca P. et al. Inhibition of protein glycation by extracts of culinary herbs and spices. **Journal of medicinal food**, v. 11, n. 2, p. 275-281, 2008.
- DENGUE. Boletim de Saúde de Fortaleza, v.07, n.01, p.01-63, 2003.
- DOHI, Satomi; TERASAKI, Masanori; MAKINO, Masakazu. Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 10, p. 4313-4318, 2009.
- DU, Shu-Shan et al. Chemical constituents and activities of the essential oil from *Myristica fragrans* against cigarette beetle *Lasioderma serricorne*. **Chemistry & biodiversity**, v. 11, n. 9, p. 1449-1456, 2014.
- DUFFY, Mark R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009.

- DUKE, J. A. CRC handbook of medicinal herbs. 677 pp. **Boca Raton, Florida**, 1985.
- EDITORIAL COMMITTEE OF CHINESE PHARMACOPOEIA. Chinese Pharmacopoeia (2010 edn.). China Medical Science and Technology Press, Beijing, p. 4–5, 2010.
- ELLMAN, George L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88IN191-9095, 1961.
- FERREIRA, Aurélio Buarque de Holanda. **Novo dicionário da língua portuguesa**. Nova fronteira, 1986.
- FERREIRA, José Tércio B.; CORRÊA, Arlene G.; VIEIRA, Paulo Cezar. Produtos naturais no controle de insetos. In: **Série de textos da Escola de Verão em química**. Edufscar, 2001.
- FREIRE, Juliana Mesquita. Óleos essenciais de canela, manjerona e anis-estrelado: caracterização química e atividade biológica sobre *Staphylococcus aureus*, *Echerichia coli*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. 2008. Dissertação, Universidade Federal de Larvas.
- FUNASA. Direção do Centro Nacional de Epidemiologia: Jarbas Barbosa da Silva Júnior. Desenvolvido pela Fundação Nacional de Saúde, jul. 2002. Plano de intensificação das ações de prevenção e controle da Febre Amarela.
- GARCEZ, Walmir Silva et al. Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.
- GARCIA, Carlos Henrique. **Tabelas para classificação do coeficiente de variação**. IPEF, p. 11, 1989.
- GARCÍA-FAJARDO, Jorge et al. Comparative study of the oil and supercritical CO₂ extract of Mexican pimento (*Pimenta dioica* Merrill). **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, n. 2, p. 181-185, 1997.
- GHOSH, Saptarshi; CHISTI, Yusuf; BANERJEE, Uttam C. Production of shikimic acid. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1425-1431, 2012.

- GIEHL, Kássia Thais et al. Obtenção do óleo essencial de anis-estrelado (*Illicium verum*) extraído via soxhlet. In: XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2016, Fortaleza.
- GOVINDARAJAN, Marimuthu et al. Larvicidal activity of the essential oil from *Amomum subulatum* Roxb.(Zingiberaceae) against *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae), and non-target impact on four mosquito natural enemies. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 2017.
- GRAYER, Renée J.; KOKUBUN, Tetsuo. Plant–fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p. 253-263, 2001.
- GROSSMAN, Luiz; ZITUNE, Gabriel; JANUÁRIO, Sandra. **Óleos essenciais na culinária, cosmética e saúde**. Optionline, 2005.
- GUENTHER, Ernest. The essential oils. Vol. 4. Individual essential oils of the plant families Gramineae, Lauraceae, Burseraceae, Myrtaceae, Umbelliferae and Geraniaceae. **The Essential Oils: Vol. IV. Individual essential oils of the plant families Gramineae, Lauraceae, Burseraceae, Myrtaceae, Umbelliferae and Geraniaceae**, 1950.
- GUO, Shan-Shan et al. Repellence of the main components from the essential oil of *Glycosmis lucida* Wall. ex Huang against two stored product insects. **Natural product research**, v. 31, n. 10, p. 1201-1204, 2017.
- HEMINGWAY, Janet; RANSON, Hilary. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual review of entomology**, v. 45, n. 1, p. 371-391, 2000.
- HEUKELBACH, Jorg et al. Zika virus outbreak in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 02, p. 116-120, 2016.
- HOEVELER, Mônica. Produção de bioinseticida à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* contra o *Aedes aegypti*. 2016. Dissertação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- HUANG, Yan et al. Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch.(Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera:

- Tenebrionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 38, n. 5, p. 403-412, 2002.
- HUANG, Yongfu et al. Antifungal activity of the essential oil of *Illicium verum* fruit and its main component trans-anethole. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 7558-7569, 2010.
- IBRAHIM, Mohamed A. et al. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. 2001.
- JUNG, Woo-Chul et al. Toxicity of *Myristica fragrans* seed compounds against *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 3, p. 524-529, 2007.
- KAMBLE, Vilas A.; PATIL, Sahadeo D. Spice-derived essential oils: effective antifungal and possible therapeutic agents. **Journal of herbs, spices & medicinal plants**, v. 14, n. 3-4, p. 129-143, 2008.
- KATZ, Tracy M.; MILLER, Jason H.; HEBERT, Adelaide A. Insect repellents: historical perspectives and new developments. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 5, p. 865-871, 2008.
- KNIO, K. M. et al. Larvicidal activity of essential oils extracted from commonly used herbs in Lebanon against the seaside mosquito, *Ochlerotatus caspius*. **Bioresource technology**, v. 99, n. 4, p. 763-768, 2008.
- KUNO, Goro. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. **Journal of medical entomology**, v. 47, n. 6, p. 957-971, 2014.
- LAHARIYA, Chandrakant; PRADHAN, S. K. Emergence of chikungunya virus in Indian subcontinent after 32 years: a review. **Journal of vector borne diseases**, v. 43, n. 4, p. 151, 2006.
- LEE, Sung-Won et al. Preventive agents against sepsis and new phenylpropanoid glucosides from the fruits of *Illicium verum*. **Planta medica**, v. 69, n. 09, p. 861-864, 2003.

- LEFEVRE, Ana Maria Cavalcanti et al. Views of the agents that fight *Aedes aegypti* on the strategy of eliminating insecticide in vector control action. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 4, p. 359-372, 2003.
- LIMA, Josélia A. et al. Geissospermum vellosii stem bark: anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 92, n. 3, p. 508-513, 2009.
- LIU, Xin Chao et al. Larvicidal activity of essential oil derived from Illicium henryi Diels (Illiciaceae) leaf. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 1, p. 111-116, 2015.
- LOIZZO, Monica R. et al. Natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders: an update. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 12, p. 1209-1228, 2008.
- LOZOVEI, A. L.; MARCONDES, C. B. Culicídeos (mosquitos). **Entomologia médica e veterinária**. 1ª ed. São Paulo, Atheneu, 432p, p. 59-104, 2001.
- MARIA, G.; SILVA, V. Atividade larvica de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 843-847, 2005.
- MARINHO, Silvio Carvalho. **Estudo químico, avaliação eletroquímica e atividade larvica do óleo essencial das folhas da Pimenta dioica Lindl frente *Aedes aegypti* (linnaeus, 1762)**. 2010. Tese de Doutorado. Tese de doutorado- Universidade federal da Paraíba/Pb.
- MARTINEZ-VELAZQUEZ, Moises et al. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from Cuminum cyminum, Pimenta dioica and Ocimum basilicum against the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 108, n. 2, p. 481-487, 2011.
- MARZOUK, Mohamed SA et al. Anticancer and antioxidant tannins from Pimenta dioica leaves. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, n. 7-8, p. 526-536, 2007.
- MENDES, Ferrao JE. Especiarias: cultura, tecnologia, comercio. **Lisboa, Portugal: Instituto de Investigação Científica Tropical** 413p. ISBN, v. 1136791485, 1993.

- MENICHINI, Federica et al. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition of ethanolic extract and monoterpenes from *Pimpinella anisoides* V Brig.(Apiaceae). **Fitoterapia**, v. 80, n. 5, p. 297-300, 2009.
- METZLER, Martina et al. HIP1 functions in clathrin-mediated endocytosis through binding to clathrin and adaptor protein 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 42, p. 39271-39276, 2001.
- MIYAZAWA, Mitsuo; YAMAFUJI, Chikako. Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1765-1768, 2005.
- MONATH, Thomas P.; VASCONCELOS, Pedro FC. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, p. 160-173, 2015.
- MORAIS, Selene M. et al. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti* L. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, n. 1, p. 161-164, 2006.
- MUKHERJEE, Pulok K.; KUMAR, Venkatesan; HOUGHTON, Peter J. Screening of Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Phytotherapy research**, v. 21, n. 12, p. 1142-1145, 2007.
- MUSTAFA, M. S. et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67-70, 2015.
- NATH, B. Surendra; KUMAR, RP Surendra. Toxic Impact of Organophosphorus Insecticides on Acetylcholinesterase Activity in the Silkworm, *Bombyx mori*L. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 42, n. 2, p. 157-162, 1999.
- NEGRAES, Paula. **Guia AZ de plantas: condimentos**. Bei Comunicação, 2003.
- NEVES, David Pereira et al. Parasitologia Humana. 10a. **Atheneu, São Paulo**, p. 428, 2000.
- NICULAU, Edenilson dos S. et al. Insecticidal activity of essential oils of *Pelargonium graveolens* l'Herit and *Lippia alba* (Mill) NE Brown against *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). **Química Nova**, v. 36, n. 9, p. 1391-1394, 2013.

- NORRIS, Edmund J. et al. Comparison of the insecticidal characteristics of commercially available plant essential oils against *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 52, n. 5, p. 993-1002, 2015.
- OLDSTONE, Michael BA. **Viruses, plagues, and history: past, present and future**. Oxford University Press, 2009.
- OLIVEIRA, Guiomar Francisca Teixeira de. **Noz-Moscada, Myristica Fragans, houtt: em estudo de composição e efeito do consumo crônico no comportamento de animais de laboratório**. 2007. Dissertação de Mestrado.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. FIÈVRE JAUNE, Aide-mémoire N°100. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/fr/>> Acesso em 27 de setembro de 2016.
- ORHAN, Ilkay et al. Activity of essential oils and individual components against acetylcholinesterase. **Zeitschrift fuer Naturforschung C**, v. 63, n. 7-8, p. 547-553, 2008.
- OUSSALAH, Mounia et al. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat science**, v. 73, n. 2, p. 236-244, 2006.
- OUSSALAH, Mounia et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food control**, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.
- PADMASHREE, A. et al. Star-anise (*Illicium verum*) and black caraway (*Carum nigrum*) as natural antioxidants. **Food chemistry**, v. 104, n. 1, p. 59-66, 2007.
- PARK, Il-Kwon et al. Nematicidal activity of plant essential oils and components from ajowan (*Trachyspermum ammi*), allspice (*Pimenta dioica*) and litsea (*Litsea cubeba*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Journal of nematology**, v. 39, n. 3, p. 275, 2007.
- PAVELA, Roman. Larvicidal property of essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Industrial crops and products**, v. 30, n. 2, p. 311-315, 2009.

- PERRY, Nicolette SL et al. Salvia lavandulaefolia essential oil inhibits cholinesterase in vivo. **Phytomedicine**, v. 9, n. 1, p. 48-51, 2002.
- PORTAL DA SAÚDE, Governo Federal. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>> Acesso em 6 de abril de 2016.
- POLATOĞLU, Kaan et al. Insecticidal activity of edible Crithmum maritimum L. essential oil against Coleopteran and Lepidopteran insects. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 383-389, 2016.
- PROBST, Isabella da Silva. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico. 2012. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
- RAMOS, A. et al. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 87, n. 2, p. 241-246, 2003.
- RODRIGUES, Marisa BP et al. É possível identificar a dengue em crianças a partir do critério de caso suspeito preconizado pelo Ministério da Saúde. **J Pediatr**, v. 81, n. 3, p. 209-215, 2005.
- RODRÍGUEZ, Mario González-Quevedo et al. Uso de la crema repelente de Pimenta dioica por combatientes de una unidad militar. **Revista Cubana de Medicina Militar**, v. 26, n. 2, p. 94-97, 1997.
- ROEL, Antônia R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v. 1, n. 2, p. 43-50, 2001.
- ROMERO, Adriano Lopes et al. Caracterização e avaliação da atividade antifitopatogênica do trans-anetol obtido de Illicium verum. In: 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2013, Águas de Lindóia. Anais da 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2013.
- ROTHMAN, Alan L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 7, p. 946, 2004.

- SAMARASEKERA, Radhika; KALHARI, Kosmulalage S.; WEERASINGHE, Indira S. Mosquitocidal activity of leaf and bark essential oils of Ceylon Cinnamomum zeylanicum. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 3, p. 301-303, 2005.
- SANTOS, Renata P. et al. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 5, p. 1027-1030, 2006.
- SAVELEV, Sergey U.; OKELLO, Edward J.; PERRY, Elaine K. Butyryl- and acetyl-cholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 4, p. 315-324, 2004.
- SCHILTE, Clémentine et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 3, p. e2137, 2013.
- SENTHILKUMAR, N.; VARMA, Pushkala; GURUSUBRAMANIAN, G. Larvicidal and adulticidal activities of some medicinal plants against the malarial vector, *Anopheles stephensi* (Liston). **Parasitology research**, v. 104, n. 2, p. 237-244, 2009.
- SEO, Seon-Mi et al. Larvicidal and acetylcholinesterase inhibitory activities of Apiaceae plant essential oils and their constituents against *Aedes albopictus* and formulation development. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 45, p. 9977-9986, 2015.
- SEPPA, Nathan. Chikungunya: Is on the Move: The virus has found a new hemisphere and might get a new latitude. **Science News**, v. 187, n. 12, p. 16-20, 2015.
- SIKKEMA, Jan; DE BONT, J. A.; POOLMAN, Bert. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8022-8028, 1994.
- SILVA, I. G. et al. Atividade de espécies de culicíneos sinantrópicos em uma cidade brasileira com transmissão de dengue. **Entomol Vect**, v. 9, p. 15-24, 2002.
- SILVA, Nayla Nunes dos Santos et al. **Atividade anticolinesterásica dos óleos essenciais e componentes majoritários de *Piper* spp e *Aniba canelilla* e docagem molecular do 1-nitro-2-feniletano**. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará.

- SIMAS, Naomi Kato et al. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue-atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Quím nova**, v. 27, n. 1, p. 46-9, 2004.
- SOUZA, Stefânia Priscila et al. Gamma radiation effect on chemical composition of volatile substances of *Myristica fragrans* Houtt. In: 16th World Congress of Food Science and Technology, 2012, Foz do Iguaçu. CD 16th IUFOST, 2012.
- SUÁREZ, Adriana; ULATE, Guido; CICCIO, José F. Hypotensive action of an aqueous extract of *Pimenta dioica* (Myrtaceae) in rats. **Revista de Biología Tropical**, v. 48, n. 1, p. 53-58, 2000.
- SUBRAMANIAM, JAYAPAL; MURUGAN, KADARKARAI. Evaluation of larvicidal, pupicidal, repellent, and adulticidal activity of *Myristica fragrans* against malarial vector *Anopheles stephensi*. In: Proceedings of the National Conference on Insect Diversity and Systematics: Special Emphasis on Molecular Approaches Department of Zoology, Aligarh Muslim University, p. 1-6. 2013.
- TABANCA, Nurhayat et al. Bioassay-guided investigation of two *Monarda* essential oils as repellents of yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 36, p. 8573-8580, 2013.
- TARELLI, G; ZERBA, E. N.; ALZOGARAY, Raúl A. Toxicity to vapor exposure and topical application of essential oils and monoterpenes on *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Journal of economic entomology**, v. 102, n. 3, p. 1383-1388, 2009.
- TAWATSIN, Apiwat et al. Repellency of essential oils extracted from plants in Thailand against four mosquito vectors (Diptera: Culicidae) and oviposition deterrent effects against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 37, n. 5, p. 915, 2006.
- TAUIL, Pedro Luiz. Urbanização e ecologia do dengue. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.17, p. 99-102, 2001.
- TEIXEIRA, Guiomar Francisca et al. Conteúdo de miristicina em preparados de noz moscada (*Myristica fragrans*, Houtt). **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 67, n. 1, p. 39-45, 2008.

- TEIXEIRA, Maria da Glória et al. Epidemiology of dengue in Salvador-Bahia, 1995-1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 3, p. 269-274, 2001.
- TRONGTOKIT, Yuwadee et al. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 4, p. 303-309, 2005.
- UCHIBAYASHI, M. The coriander story. **Yakushigaku zasshi**, v. 36, n. 1, p. 56-57, 2001.
- VALDEZ JÚNIOR, D. Estudo analítico e bacteriano do óleo essencial extraído das folhas da espécie Pimenta dioica Lindl. São Luis, 2009, p.105. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal do Maranhão.
- VALENTE, Vânia Maria Moreira et al. Caracterização de antifúngicos em óleo essencial de noz-moscada (*Myristica fragans*). 2005. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa.
- WANG, Guo-Wei et al. *Illicium verum*: a review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. **Journal of ethnopharmacology**, v. 136, n. 1, p. 10-20, 2011.
- WEI, Linlin et al. Chemical composition and biological activity of star anise *Illicium verum* extracts against maize weevil, *Sitophilus zeamais* adults. **Journal of insect science**, v. 14, n. 1, p. 80, 2014.
- WHO. Report of the WHO Informal Consultation on the evaluation and testing of insecticides. **World Health Organization**, Geneva, 1996.
- WHO. Guidelines for laboratory and field testing of mosquitos larvicides. **World Health Organization**, Geneva, 2005.
- WHO. Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin. **World Health Organization**, Geneva, 2009.
- YANG, Cheng-Hong et al. Investigation of the antioxidant activity of *Illicium verum* extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 2, p. 314-324, 2012.

YANG, Jyh-Ferng et al. Chemical composition and antibacterial activities of *Illicium verum* against antibiotic-resistant pathogens. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 5, p. 1254-1262, 2010.

ZAHRAN, Hossam El-Din M.; ABOU-TALEB, Hamdy K.; ABDELGALEIL, Samir AM. Adulticidal, larvicidal and biochemical properties of essential oils against *Culex pipiens* L. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 20, n. 1, p. 133-139, 2017.

ZANLUCA, Camila et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015.

ZHANG, Lei; L LOKESHWAR, Bal. Medicinal properties of the Jamaican pepper plant *Pimenta dioica* and Allspice. **Current drug targets**, v. 13, n. 14, p. 1900-1906, 2012.

7 ANEXOS

7.1 ANEXO 1



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-20/14

Certificamos que o protocolo (P-29/13-3), intitulado "Estudos da fisiologia, desenvolvimento e controle de artropodes vetores", sob a responsabilidade de JOSE BENTO PEREIRA LIMA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 31/03/2018 e inclui o uso total de :

Cavia porcellus

- 72 Machos de Short Hair.
- 72 Fêmeas de Short Hair.

Mus musculus

- 96 Machos de Swiss Webster.

Rio de Janeiro, 31 de março de 2014

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04626550

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da Pesquisa:

Estudos etnofarmacológicos de óleos essenciais como inseticidas e repelentes contra o mosquito *Aedes aegypti*.

Pesquisador responsável:

Diego Gomes da Rocha Voris - (21)979007944 - divoris@hotmail.com

Instituição responsável da pesquisa:

Instituto Militar de Engenharia (IME) – Curso de Pós-Graduação em Química

Informações aos voluntários

Você está sendo convidado(a) para participar de uma etapa da pesquisa “Estudos etnofarmacológicos de óleos essenciais como inseticidas e repelentes contra o mosquito *Aedes aegypti*”. Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento, você pode desistir de participar e retirar o seu consentimento, sem que haja qualquer prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com o Instituto Militar de Engenharia.

O objetivo deste trabalho é avaliar a eficácia dos produtos naturais na proteção contra picadas de mosquitos. Os óleos essenciais a serem testados não possuem ação tóxica sobre a pele.

Sua participação nesta etapa da pesquisa consistirá na aplicação de uma solução de etanol a 70% em seu antebraço direito. Esta área tratada será exposta dentro de uma gaiola (30cm X 30cm) contendo 100 fêmeas sadias do mosquito *Aedes aegypti*. Após o tratamento com álcool, o mesmo antebraço será aplicado o óleo essencial com potencial de repelência em cinco concentrações diferentes. A cada nova aplicação, o procedimento de expor a área tratada na gaiola será repetido. Depois de terminado essa etapa, o antebraço esquerdo será tratado com uma solução de etanol a 70% em seu antebraço esquerdo e realizado o mesmo processo ocorrido com o braço direito. No total, sete sessões de exposição dos antebraços, sendo seis sessões no direito (um tratamento com álcool e cinco com as diferentes concentrações do óleo essencial) e uma sessão no esquerdo (tratamento com álcool sendo cada uma com 30 segundos de exposição). As fêmeas adultas serão provenientes de colônias mantidas no insetário do Laboratório de Entomologia da FIOCRUZ localizada no Instituto de Biologia do Exército (IBEx). Os mosquitos utilizados são isentos de doença, não possuindo nenhum risco de transmissão de patógenos. Os riscos antecipáveis em decorrência da participação na pesquisa restringem-se a eventuais reações alérgicas devido à sensibilidade à picada ou ao óleo. Neste caso, se o senhor (a) apresentar essas reações será imediatamente afastado e terá assistência médica prestada pela instituição. Por causa da irritação da pele que ocorrer após a picada, será aplicada sobre a pele do voluntário uma loção pós-picada, se assim o desejar, para que o incômodo seja amenizado.

Se o senhor (a) tiver apresentado alguma vez na vida alergia a picadas de insetos, repelentes ou condimentos não poderá participar do estudo. Além de não fazer uso de nenhuma fragrância, como perfumes, ou fumar nas últimas 12 horas antes dos testes.

O pesquisador Diego Gomes da Rocha Voris será responsável por quaisquer danos ou despesas decorrentes de reações relacionados ao ensaio.

As informações obtidas por meio da pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação.

Você receberá uma via deste termo onde consta o telefone do pesquisador, podendo tirar dúvidas sobre sua participação e sobre o projeto em qualquer momento.

Eu: _____

RG: _____, **abaixo assinado, tendo recebido as informações no verso e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar como voluntário da pesquisa citada.**

- 1- A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento;
- 2- A garantia de receber esclarecimentos a qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, benefícios, riscos e outros, relacionados com o tratamento e pesquisa a que estarei participando;
- 3- A segurança de que as informações obtidas serão confidenciais e de que não serei identificado(a);
- 4- A disponibilidade de indenização e tratamento médico que legalmente tenho direito, por parte da Instituição, em caso de danos que sejam comprovados como causados pela pesquisa;
- 5- Caso ocorrerem alguma reação adversa na pele (como irritações, alergia e outras) decorrente da picada dos mosquitos ou da aplicação das diferentes formulações, serei imediatamente afastado do ensaio.

Tenho ciência do exposto acima e desejo colaborar com a pesquisa

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____.

Assinatura do voluntário

Comitê de Ética e Pesquisa – Hospital Naval Marcílio Dias (CEP/HNMD)

Endereço: Rua Cezar Zama nº 185	
Bairro: Lins de Vasconcelos	CEP: 20.725-090
UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2599-5452	Fax: (21)2599-5452 E-mail: cep@hnmd.mar.mil.br