

**RAÍSSA ROSA PESSOA CRUZEIRO**

**ATIVIDADE LARVICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DO CERRADO  
BRASILIENSE CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti* (DIPTERA:  
CULICIDAE)**

**Brasília**

**2022**

**FACULDADE DE CEILÂNDIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E**  
**TECNOLOGIAS EM SAÚDE**

**RAÍSSA ROSA PESSOA CRUZEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Promoção, Prevenção e Intervenção em Saúde.

Linha de Pesquisa: Políticas, Programas, Serviços, Educação e Sociabilidade em Saúde.

Temática da linha: Plantas medicinais.

Orientador: Prof. Dr. Christopher William Fagg.

**BRASÍLIA**

**2022**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C957a Rosa Pessoa Cruzeiro, Raíssa  
ATIVIDADE LARVICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DO CERRADO  
BRASILIENSE CONTRA LARVAS DE AEDES AEGYPTI (DIPTERA:  
CULICIDAE) / Raíssa Rosa Pessoa Cruzeiro; orientador  
Christopher William Fagg. -- Brasília, 2023.  
100 p.

Tese (Doutorado - Mestrado em Ciências e Tecnologias em  
Saúde) -- Universidade de Brasília, 2023.

1. Atividade larvicida de óleos essenciais . 2.  
Biolarvicidas de plantas cultivadas no cerrado. 3. Dengue,  
Zika, Chikungunya e Febre Amarela. 4. Aedes aegypti. 5.  
Monoterpenos e Sesquiterpenos. I. William Fagg, Christopher  
, orient. II. Título.

**RAÍSSA ROSA PESSOA CRUZEIRO**

**ATIVIDADE LARVICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DO CERRADO BRASILIENSE  
CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, na área de concentração “Promoção, Prevenção e Intervenção em Saúde” e na linha de Pesquisa: “Políticas, Programas, Serviços, Educação e Sociabilidade em Saúde.”

**Banca Examinadora**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Christopher William Fagg (Presidente)**  
**Universidade de Brasília**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Yanna Karla de Medeiros Nóbrega**  
**Universidade de Brasília**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leandra de Almeida Ribeiro Oliveira**  
**Universidade Estadual do Goiás**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr. Paloma Michelle de Sales**  
**(Suplente)**  
**Secretaria de Estado de Saúde**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, meu Pai, por cuidar de mim com tanto amor, a Ele toda honra, glória e louvor. “Pois dele, por ele e para ele são todas as coisas. A ele seja a glória para sempre! Amém.” (Romanos 11:36). Por ter me concedido a graça de fazer um mestrado, força e sabedoria durante todo o processo, por ter conduzido e preparado cada pessoa no meu caminho para me sustentar nessa caminhada. Sem Deus, não teria chegado até aqui.

Ao anjo e orientador Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Christopher William Fagg, por me aceitar mesmo sem me conhecer, por acreditar em mim quando outros não acreditaram. Por acreditar no meu potencial e me receber de braços abertos e ser tão presente e paciente ao longo do mestrado. Por ser tão disponível e aberto a sugestões e questionamentos. Agradeço por todo apoio, puxões de orelha, orientação, cuidado, por me ouvir e me compreender, por me ensinar a caminhar com as próprias pernas e com autonomia.

À minha mãe, Marina Alves Rosa, por todo incentivo durante toda minha vida, pelo apoio e compreensão ao longo desses anos. Uma das pessoas mais importantes da minha vida. Sempre foi a primeira a acreditar nos meus sonhos e projetos, além de me apoiar emocionalmente e financeiramente em todas as fases da minha vida, por interceder por mim desde o ventre, e, sobretudo, por ser essa mãe tão importante, forte e inspiradora na minha vida.

Ao meu amado esposo, companheiro de vida, José do Carmo Cruzeiro, por me apoiar em meio a tantos desafios e dificuldades para finalizar esse projeto. Por sempre me levantar quando estou desanimada e me levar a enxergar saídas e caminhar ao meu lado até chegar ao fim da linha. Por me apoiar nos meus projetos, mesmo quando não concordava, mas abria mão da sua própria vontade pra me ver realizada. Por compreender minhas ausências, meus momentos de estresse e choros durante todo esse tempo.

À minha amada irmã, Samara Rosa Pessoa dos Santos, que sempre me incentivou a não desistir e enfrentar as dificuldades, além de todo apoio moral, intelectual e psicológico, por sempre me mostrar as perspectivas e possibilidades, além de compartilhar seu conhecimento e experiência acadêmica com toda paciência e

disponibilidade. Por ser inspiração pra mim, por desbravar antes de mim e me mostrar os caminhos a percorrer e me mostrar que as dificuldades não podem me parar, por ser irmã e amiga.

À minha amada irmã Sara Rosa Guimarães, por serem inspiração de vida por me mostrar que a fé move montanhas e que podemos alcançar nossos sonhos, por me alegrar e me ouvir, por me aconselhar e por ser tão irmã e amiga, por todo apoio moral, psicológico e espiritual.

À minha grande amiga Bruna Cabral Reis Pimenta, por sempre acreditar em mim e me motivar a finalizar e concretizar o que comecei, por estar disponível sempre quando precisei, por me aconselhar e ser tão amiga, por doar seu tempo, suas férias e me mostrar o amor ao próximo de uma forma tão altruísta. Por todo apoio moral, intelectual e espiritual durante tantos anos.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Dâmaris Silveira, por ter me recebido de braços abertos, abrindo os laboratórios da Faculdade de Ciências da Saúde. Por ter me dado total liberdade para desenvolver minha pesquisa. Por ter sentado diversas vezes comigo e me mostrar caminhos e soluções para os inúmeros desafios que enfrentei. Por estar sempre disponível e paciente durante todo esse tempo.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Kicia Karinne Pereira Gomes-Copeland, que me recebeu e ensinou o que sabia com todo carinho e paciência. Por ter atendido todas as demandas e trazido soluções aos problemas que encontrei.

Ao Prof. Marcos Takashi Obara, por todo ensinamento, paciência e confiança. Por abrir as portas do laboratório e pelo zelo em mostrar cada etapa dos testes. Por sentar ao meu lado e planejar cada fase e corrigir o que estava errado, por mostrar soluções diante dos desafios.

À Júlia Marina Muller e Patrícia Marques, técnicas exemplares do Laboratório de Controle de Qualidade e de Produtos Naturais, por me auxiliarem com tanto zelo e dedicação. Pela disponibilidade e eficiência em tudo que fazem. Pelo cuidado com cada equipamento. Por me ensinarem o que sabiam com tanto carinho, e principalmente pela ética e responsabilidade.

Ao CNPq, FAP/DF e UnB pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Agradeço, também, aos membros da banca examinadora, que aceitaram participar deste momento tão esperado e importante: A todos os meus sinceros agradecimentos.

Árvores frutíferas de toda espécie crescerão em ambas as margens do rio. Suas folhas não murcharão e os seus frutos não cairão. Todo mês produzirão, porque a água vinda do santuário chega a elas. Seus frutos servirão de comida, e suas folhas de remédio".

Ezequiel 47:12

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fases do mosquito <i>Aedes Aegypti</i> – ovos (1), larvas (2), pupa (3) e mosquito adulto (4).....	19
<b>Figura 2.</b> Fases larvais do mosquito <i>Aedes Aegypti</i> .....	19
<b>Figura 3.</b> Folhas e flores de <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm....	24
<b>Figura 4.</b> Árvore e folhas de <i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) O. Berg.....	25
<b>Figura 5.</b> Flores e folhas de <i>Cymbopogon densiflorus</i> (Steud.) Stapf.....	26
<b>Figura 6.</b> Parte aérea de <i>Eugenia langsdorffii</i> O. Berg.....	27
<b>Figura 7.</b> Folhas e botões florais de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão.....	28
<b>Figura 8.</b> Folhas e flores de <i>Baccharis retusa</i> DC.....	29
<b>Figura 9.</b> Fita de papel filtro com ovos de <i>Aedes aegypti</i> para eclosão.....	36
<b>Figura 10.</b> Fotografia das larvas de <i>Aedes aegypti</i> no terceiro e quarto estágios após eclosão dos ovos.....	37
<b>Figura 11.</b> Fotografia com: a) gaiola de acrílico transparente utilizada para criação e alimentação das colônias de mosquito de <i>Aedes aegypti</i> ; b) formação dos mosquitos adultos na gaiola de acrílico. ....	38
<b>Figura 12.</b> Fotografia dos ensaios em triplicada de larvicidas de <i>Aedes aegypti</i> em copos plásticos protegidos por tule (tecido mosquiteiro). ....	39
<b>Figura 13.</b> Fotografia com controle de temperatura e umidade durante os ensaios ....	41
<b>Figura 14.</b> Representação esquemática do teste larvicida – <i>screening</i> de óleos essenciais de plantas cultivadas no cerrado contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	42
<b>Figura 15.</b> Representação esquemática do teste larvicida com óleos essenciais de <i>A. zerumbet</i> e <i>E. Langsdorffii</i> contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	45
<b>Figura 16.</b> Cromatograma do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm .....	48
<b>Figura 17.</b> Cromatograma do óleo essencial de <i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) O. Berg.....	50
<b>Figura 18.</b> Cromatograma do óleo essencial de <i>Cymbopogon densiflorus</i> (Steud.) Stapf.....	52
<b>Figura 19.</b> Cromatograma do óleo essencial de <i>Eugenia langsdorffii</i> O. ....	54

Berg.....	
<b>Figura 20.</b> Cromatograma do óleo essencial de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão	56
.....	
<b>Figura 21.</b> Cromatogramas do óleos essenciais de <i>Baccharis retusa</i> D.C. das partes: a) folha masculina; b) flor masculina; c) folha feminina; d) flor feminina.	58
.....	
<b>Figura 22.</b> Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) na mortalidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 24h e 48h, em relação à média de mortalidade e concentrações utilizadas.....	65
<b>Figura 23.</b> Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Eugenia langsdorffii</i> O. Berg. na mortalidade de larvas de <i>Aedes aegypti</i> após 24h e 48h, em relação à média de mortalidade e concentrações utilizadas.....	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Quantidade de óleo essencial e dimetilsulfóxido - DMSO utilizada no <i>screening</i> .....	40
<b>Tabela 2.</b> Quantidade de óleo essencial de <i>A. zerumbet</i> e <i>E. langsdorffii</i> e dimetilsulfóxido - DMSO utilizada no bioensaio em diferentes concentrações.....	43
<b>Tabela 3.</b> Rendimentos percentuais obtidos para OEs das folhas e/ou flores de sete diferentes espécies obtidas em 2019.....	47
<b>Tabela 4</b> Compostos químicos identificados por cromatografia gasosa do óleo essencial da espécie <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm .....	48
<b>Tabela 5.</b> Compostos químicos identificados, número CAS, classificação química, fórmula molecular e estrutura química do óleo essencial da espécie <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm.....	49
<b>Tabela 6.</b> Compostos químicos identificados por cromatografia gasosa do óleo essencial da espécie <i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) O. Berg.....	51
<b>Tabela 7.</b> Compostos químicos identificados, número CAS, classificação química, fórmula molecular e estrutura química do óleo essencial da espécie <i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) O. Berg.....	51
<b>Tabela 8.</b> Compostos químicos identificados por cromatografia gasosa do óleo essencial da espécie <i>Cymbopogon densiflorus</i> (Steud.) Stapf.....	52
<b>Tabela 9.</b> Compostos químicos identificados, número CAS, classificação química, fórmula molecular e estrutura dos compostos majoritários, em ordem crescente, do óleo essencial da espécie <i>Cymbopogon densiflorus</i> (Steud.) Stapf.....	53
<b>Tabela 10.</b> Compostos químicos identificados por cromatografia gasosa do óleo essencial da espécie <i>Eugenia langsdorffii</i> O. Berg. ....	54
<b>Tabela 11.</b> Compostos químicos identificados, número CAS, classificação química, fórmula molecular e estrutura química do óleo essencial da espécie <i>Eugenia langsdorffii</i> O. Berg .....	56
<b>Tabela 12.</b> Compostos químicos identificados por cromatografia gasosa do óleo essencial da espécie <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão. ....	57
<b>Tabela 13.</b> Compostos químicos identificados, número CAS, classificação química,	57

fórmula molecular e estrutura dos compostos majoritários, em ordem crescente, do óleo essencial da espécie <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão.....	
<b>Tabela 14.</b> Compostos químicos identificados por cromatografia gasosa do óleo essencial da flor e folha masculina da espécie <i>Baccharis retusa</i> D.C.....	59
<b>Tabela 15.</b> Compostos químicos identificados, número CAS, classificação química, fórmula molecular e estrutura dos compostos majoritários, em ordem crescente, do óleo essencial da flor masculina da espécie <i>Baccharis retusa</i> D.C.....	60
<b>Tabela 16.</b> Compostos químicos identificados, número CAS, classificação química, fórmula molecular e estrutura dos compostos majoritários, em ordem crescente, do óleo essencial da folha masculina da espécie <i>Baccharis retusa</i> D.C.....	60
<b>Tabela 17.</b> Compostos químicos identificados por cromatografia gasosa do óleo essencial da flor e folha feminina da espécie <i>Baccharis retusa</i> D.C.....	61
<b>Tabela 18.</b> Compostos químicos identificados, número CAS, classificação química, fórmula molecular e estrutura dos compostos majoritários, em ordem crescente, do óleo essencial da flor feminina da espécie <i>Baccharis retusa</i> D.C.....	62
<b>Tabela 19.</b> Compostos químicos identificados, número CAS, classificação química, fórmula molecular e estrutura dos compostos majoritários, em ordem crescente, do óleo essencial da folha feminina da espécie <i>Baccharis retusa</i> D.C.....	63
<b>Tabela 20.</b> Mortalidade, média e desvio padrão de larvas de <i>Aedes aegypti</i> em 24h....	64
<b>Tabela 21.</b> Mortalidade, média e desvio padrão de larvas de <i>Aedes aegypti</i> em 48h.....	64
<b>Tabela 22.</b> Concentrações letais dos óleos essenciais de <i>A. zerumbet</i> e <i>E. langsdorffii</i> em 24h contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> . ....	66
<b>Tabela 23.</b> Concentrações letais dos óleos essenciais de <i>A. zerumbet</i> e <i>E. langsdorffii</i> em 48h contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> . ....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(Bti)	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
AMDIS	<i>Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System</i>
ANOVA	Análise de Variância
AR	Abundância Relativa
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CENARGEN	Centro Nacional de Recursos Genéticos
CHIK	Chikungunya
CG-EM	Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa
CL	Concentração Letal
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Produtos Agrícolas
IK	Índice de Retenção de Kovats
L3	Larva estágio 3
L4	Larva estágio 4
NIST MS	<i>National Institute of Standards and Technology Mass Spectrometry</i>
ÓE	Óleo essencial
WHO	<i>World Health Organization</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
DENV-1	Vírus dengue sorotipo 1 (DENV-1)
DENV-2	Vírus dengue sorotipo 2 (DENV-2)
DENV-3	Vírus dengue sorotipo 3 (DENV-3)
DENV-4	Vírus dengue sorotipo 4 (DENV-4)
AChE	Acetilcolinesterase
OE	Óleo essencial

## RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor de doenças virais como dengue, zika e chikungunya e febre amarela, uma espécie de mosquito responsável por epidemias significativas nos últimos anos e de grande importância médica. Os efeitos nocivos dos inseticidas sintéticos já são conhecidos e por isso existe uma necessidade de novas alternativas naturais e biodegradáveis. Além disso, a resistência é outro fator negativo, ao contrário dos bioinseticidas, que pelo fato de abranger um conjunto de compostos botânicos, existe pouca possibilidade de os mosquitos apresentarem resistência. Os óleos essenciais são um conjunto de compostos orgânicos de uma única espécie de planta composta por moléculas voláteis. Normalmente são tóxicos para humanos em doses relativamente altas, eles têm demonstrado atividade repelente contra muitas espécies de mosquitos, porém existem poucos estudos com que avaliem o potencial larvicida de espécies cultivadas no cerrado contra larvas de *Ae. aegypti*. No presente estudo, 9 óleos essenciais (OEs) derivados de 6 espécies vegetais e seus principais componentes foram selecionados por suas propriedades larvicidas contra o *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae). O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade larvicida de diferentes OEs de plantas nativas e cultivadas no Cerrado Brasileiro contra larvas do mosquito *Ae. aegypti*. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação. O rendimento foi calculado com base no peso de folhas frescas. Os óleos essenciais foram analisados por cromatografia gasosa-espectrometria de massas (GC-MS) e a atividade larvicida contra larvas de *Ae. aegypti* no terceiro estágio de desenvolvimento foi avaliada. Dessa forma, foi avaliada a atividade de diferentes óleos essenciais de plantas nativas e cultivadas no Cerrado contra larvas de *Ae. aegypti*. Os óleos essenciais de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burtt & R.M.Sm., *Baccharis retusa* DC., *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf, *Eugenia langsdorffii* O. Berg. e *Myracrodruon urundeuva* Allemão foram testados. Das espécies avaliadas, as amostras mais potentes foram os óleos essenciais das folhas de *A. zerumbet* e *E. langsdorffii*. Os óleos essenciais dessas duas espécies foram os larvicidas mais potentes e foram testados em concentrações entre 2,5 a 100mg/L. Os componentes majoritários dos óleos essenciais foram identificados e quantificados por cromatografia gasosa. Na espécie *A. zerumbet*, os compostos majoritários identificados foram 1,8-cineol, sabinene, terpinen-4-ol e  $\gamma$ -terpineno e em *E. langsdorffii*, limoneno,  $\delta$ -cadinol,  $\beta$ -mirceol e espatulenol. As concentrações letais do óleo essencial de *A. zerumbet* foram (CL<sub>50</sub> = 36.644mg/L; CL<sub>90</sub> = 66.318 mg/L) e para *E. langsdorffii* (CL<sub>50</sub> = 53.522mg/L; CL<sub>90</sub> = 103.932mg/L). Os óleos essenciais das espécies *A. zerumbet* e *E. langsdorffii* apresentaram excelente potencial larvicida contra espécie *Ae. aegypti*, o que poderá representar uma alternativa ecológica e sustentável no controle das larvas da espécie. No entanto, os componentes ativos ainda precisam ser identificados, bem como um esclarecimento sobre seu modo de ação.

**Palavras-chave:** Óleos essenciais, larvicida, controle vetorial, monoterpenos, *Aedes aegypti*.

## ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is the main vector of viral diseases such as dengue, zika and chikungunya, and yellow fever, a mosquito species responsible for significant epidemics in recent years and of great medical importance. The harmful effects of synthetic insecticides are already known, so there is a need for new natural and biodegradable alternatives. In addition, resistance is another negative factor, unlike bioinsecticides, which because they cover a range of botanical compounds, there is little possibility of mosquitoes showing resistance. Essential oils (EOs) are a collection of organic compounds from a single plant species composed of volatile molecules. Usually toxic to humans at relatively high doses, they have demonstrated repellent activity against many mosquito species, but there are few studies evaluating the larvicidal potential of species grown in the cerrado against *Ae. aegypti* larvae. In this study, 9 EOs derived from 6 plant species and their main components were selected for their larvicidal properties against *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae). The objective of this study was to evaluate the larvicidal activity of different EOs from native and cultivated plants of the Brazilian Cerrado against *Ae. aegypti* mosquito larvae. Essential oil was extracted by hydrodistillation. The yield was calculated based on fresh leaf weight. EOs were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and the larvicidal activity against *Ae. aegypti* larvae at the third stage of development evaluated. EOs of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm., *Baccharis retusa* DC., *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf, *Eugenia langsdorffii* O. Berg. and *Myracrodruon urundeuva* Allemão were tested. Of the species evaluated in the screening, the most potent EOs samples were from the leaves of *A. zerumbet* and *E. langsdorffii*. EOs from these two species were then tested at concentrations ranging from 2.5 to 100mg/L. The major components of the EOs were identified and quantified by gas chromatography. In *A. zerumbet* species, the majority compounds identified were 1,8-cineole, sabinene, terpinen-4-ol and  $\gamma$ -terpinene and in *E. langsdorffii*, limoneno,  $\delta$ -cadinol,  $\beta$ -mirceol and espatulenol. Lethal concentrations of the EOs of *A. zerumbet* were (CL<sub>50</sub> = 36,644mg/L; CL<sub>90</sub> = 66,318 mg/L) and for *E. langsdorffii* (CL<sub>50</sub> = 53,522mg/L; CL<sub>90</sub> = 103,932mg/L). Essential oils of *A. zerumbet* and *E. langsdorffii* species showed excellent larvicidal potential against *Ae. aegypti* species, which may represent an ecological and sustainable alternative in controlling the larvae of the species. However, the active components still need to be identified, as well as a clarification of their mode of action.

**Key Words:** Essential oils, larvicides, monoterpenes, vector control, *Aedes aegypti*.

## SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
1.1 ARBOVIROSES.....	15
1.2 <i>Aedes aegypti</i> .....	17
1.3 CONTROLE DE <i>Aedes aegypti</i> .....	21
1.4 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	22
1.5 ESPÉCIES VEGETAIS.....	23
2. INTRODUÇÃO.....	30
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
4.1 ESPÉCIES VEGETAIS.....	33
4.2 COLETA E EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	33
4.3 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	34
4.4 CROMATOGRAFIA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	34
4.5 ORIGEM DOS OVOS .....	35
4.6 FORMAÇÃO DAS LARVAS .....	37
4.7 ALIMENTAÇÃO .....	37
4.8 <i>SCREENING</i> .....	39
4.9 ENSAIOS LARVICIDAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS POTENCIAIS.....	42
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
5. RESULTADOS.....	47
5.1 EXTRAÇÃO E RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS .....	47
5.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	47
5.2.1 Composição química de <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B. L. Burtt & R.M. Sm. ....	48
5.2.2 Composição química de <i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) .....	50
5.2.3 Composição química de <i>Cymbopogon densiflorus</i> (Steud.) Stapf .....	52

5.2.4 Composição química de <i>Eugenia langsdorffii</i> (O. Berg.) .....	53
5.2.5 Composição química de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão .....	56
5.2.6 Composição química de <i>Baccharis retusa</i> D.C. ....	58
5.3 ATIVIDADE LARVICIDA.....	63
5.4 ATIVIDADE LARVICIDA DE BTI .....	67
6. DISCUSSÃO.....	68
7. CONCLUSÃO .....	74
8. REFERÊNCIAS .....	75
9. APÊNDICE.....	85
9.1 APÊNDICE A.....	85
9.2 APÊNDICE B.....	86

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 ARBOVIROSES

Doenças virais transmitidas por vetores causam preocupações globais sobre as causas da emergência, ameaças à saúde, carga, viabilidade de prevenção e controle. São exemplos de doenças virais transmitidas por vetores: dengue, febre amarela, chikungunya, Zika dentre outras<sup>1</sup>.

Dengue, Zika e chikungunya são arboviroses, doenças causadas por vírus, que possuem grande impacto na saúde pública. Dessas, a dengue aumentou substancialmente nas últimas duas décadas em todo o mundo. Além disso, A OMS estima que ocorram entre 100 e 400 milhões de infecções de dengue por ano<sup>2</sup>.

As arboviroses surgiram há séculos, entretanto há grandes mudanças na magnitude e quantidade de surtos de vírus transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*, que se deve principalmente às mudanças climáticas, ambientais e socioeconômicas. Essas mudanças, reconhecidamente, alteram os ciclos de transmissão dos arbovírus, o que contribui para o aumento da distribuição geográfica de arboviroses, refletindo em uma grande ameaça à saúde pública<sup>3</sup>.

Uma das causas do surgimento de novas epidemias é a degradação ambiental, que está diretamente associada à deterioração das condições sociais nas quais se produzem e propagam novas epidemias e doenças diretamente ligadas à pobreza<sup>4</sup>.

O aumento do risco de arboviroses está intimamente ligado ao aumento das chuvas, que tem como consequência, o aumento na criação de criadouros. Outro importante fator é o aumento da temperatura, que acelera o ciclo de vida do vetor e do patógeno e aumenta a taxa de picadas dos vetores<sup>5</sup>.

O vírus da dengue é transmitido principalmente por mosquitos fêmeas *Ae. aegypti* e, em menor grau, *Ae. albopictus*. Esses mosquitos também são vetores dos vírus chikungunya, febre amarela e Zika. O vírus é transmitido aos seres humanos através da picada de mosquitos fêmeas infectados, principalmente o mosquito *Ae. aegypti*. Outras espécies do gênero *Aedes* também podem atuar como vetores, mas sua contribuição é secundária ao *Ae. Aegypti*<sup>2</sup>.

A dengue é uma infecção sistêmica causada por um vírus de RNA de fita simples, transmitido por mosquito, do gênero *Flavivirus*. Há quatro sorotipos desse vírus: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4. Um paciente infectado por um sorotipo pode conferir imunidade vitalícia a esse sorotipo, mas está suscetível aos outros três sorotipos. As segundas infecções estão associadas ao aumento do risco de gravidade da doença, o que tem sido imputado ao aumento da doença por infecção viral dependente de anticorpos<sup>6</sup>.

O vírus da dengue possui distribuição geográfica em todo o mundo em trópicos e subtropicais. Os sintomas da doença são: febre, mialgia, artralgia<sup>7</sup>. Estima-se que o vírus da dengue cause 390 milhões de infecções por ano, das quais aproximadamente 500.000 são casos graves que requerem hospitalização, com mais de 20.000 casos levando à morte, principalmente em países tropicais<sup>8</sup>.

O vírus Zika é um vírus da família Flaviviridae, que inclui vários outros vírus transmitidos por mosquitos de importância clínica, por exemplo, dengue, vírus do Oeste do Nilo e vírus da febre amarela<sup>9</sup>.

O vírus Chikungunya (CHIK) causa uma síndrome febril característica manifestada por dor de cabeça, erupção cutânea e artralgia grave. Os pacientes podem desenvolver uma artrite poliarticular de grandes articulações durante a infecção aguda, e os sintomas de dor nas articulações podem persistir por meses após a infecção<sup>7</sup>.

O vírus CHIK, é um vírus de RNA que pertence à família Togaviridae, família que compreende uma série de vírus que são transmitidos principalmente por artrópodes. A infecção pelo vírus CHIK resulta em febre chikungunya<sup>10</sup>.

O *Ae. aegypti* é o vetor comum responsável pela transmissão em áreas urbanas, enquanto o *Aedes albopictus* tem sido implicado em áreas rurais<sup>11</sup>.

A chikungunya ocorre na África e na Ásia, porém diversos casos tenham sido registrados pela OMS na Região Europeia e na Região das Américas. Desde 2005, já foram registrados mais de 2 milhões de casos<sup>12</sup>.

A infecção pelo Zika vírus não causa sintomas na maioria das pessoas. Aqueles que desenvolvem sintomas incluem: febre, erupção cutânea, conjuntivite, dores musculares, dores articulares, mal-estar e dor de cabeça. Porém a infecção durante a gravidez é uma causa de microcefalia e outras anomalias congênitas no feto em

desenvolvimento e no recém-nascido, além de ser uma das causas da Síndrome de Guillain-Barré, neuropatia e mielite<sup>13</sup>.

Cerca de oitenta e sete países e territórios, de quatro das seis regiões, da OMS (Região da África, Região das Américas, Região do Sudeste Asiático, e região do Pacífico Ocidental) apresentavam evidências de transmissão autóctone do Zika vírus por mosquitos, em 2019<sup>14</sup>.

A febre amarela é uma arbovirose causada por pelo vírus da febre amarela, da família Flaviviridae (gênero *Flavivirus*) que é endêmico em regiões da África e América do Sul. A febre amarela é uma doença hemorrágica viral e os sintomas incluem: febre, dor de cabeça, icterícia, dores musculares, náuseas, vômitos e fadiga. Uma minoria daqueles que contraem o vírus desenvolvem sintomas graves e aproximadamente metade deles morrem entre 7 a 10 dias<sup>15</sup>.

O risco de disseminação da febre amarela urbana tem alto potencial de disseminação em áreas infestadas pelo mosquito *Ae. Aegypti*. As áreas com maior risco de infecção individual previsto na América Latina incluem as regiões amazônicas do Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname, e Venezuela<sup>16</sup>.

Cabe ressaltar que faltam vacinas eficazes para a maioria dos arbovírus, apesar do avanço nas pesquisas para produção de vacinas, a primeira vacina para dengue, foi liberada em 2015, porém sua ação é dependente do estado sorológico do paciente<sup>17,18</sup>. Os obstáculos não se restringem somente a vacina para dengue, para chikungunya e Zika, existem obstáculos como o acesso da população, além dos vários obstáculos à formulação das vacinas<sup>19</sup>.

## 1.2 *Aedes aegypti*

Os mosquitos vetores da família Culicidae, carregam e transmitem vírus patogênicos ao ser humano, por exemplo, mosquitos do gênero *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*<sup>20</sup>.

A distribuição global de *Ae. aegypti* é fortemente influenciada por fatores climáticos, larvas que se desenvolvem em temperaturas de 10° C ou inferior tem seu desenvolvimento e sobrevivência limitada<sup>21</sup>. O mosquito artrópode *Ae. aegypti* é

abundante em regiões neotropicais, onde fatores como chuva, temperatura e umidade relativa afetam diretamente, impedindo ou favorecendo seu ciclo de vida<sup>22</sup>.

Em temperaturas entre 22° C e 32° C são consideradas ideais para desenvolvimento, longevidade e fecundidade<sup>23</sup>. Em temperaturas dentro da faixa de sobrevivência favorável de *Ae. aegypti*, o tempo de postura aumenta, como consequência causa um aumento no número de ovos<sup>24</sup>.

É necessário compreender as estratégias de sobrevivência e transmissão entre o vírus, mosquito (Figura1) e seu ciclo de vida (Figura 2), para obtenção de novas estratégias com o objetivo de limitar a transmissão viral e sua prevalência no meio ambiente<sup>25</sup>.

O mosquito *Ae. aegypti* apresenta corpo segmentado em três partes: cabeça, tórax e abdome, apêndices, um par de antenas, três pares de pernas longas, um par de asas, um par de halteres que auxiliam na orientação e equilíbrio durante o voo, aparelho bucal (probóscide) para sucção e grande parte do corpo revestido de escamas brancas<sup>26</sup>.

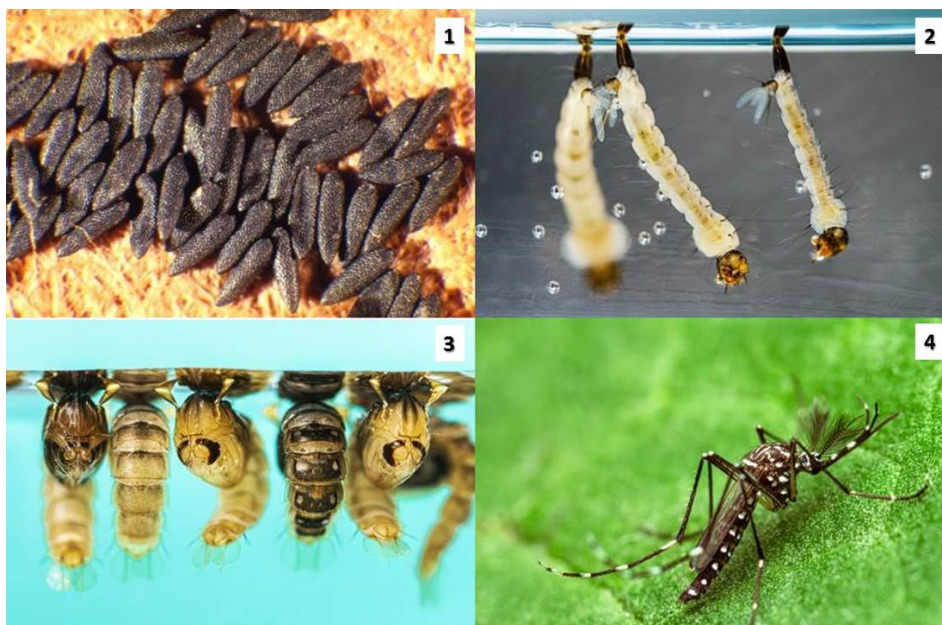
Apenas as fêmeas se alimentam de sangue para amadurecer os seus ovos. Os machos se alimentam de frutos. Mosquitos depositam seus ovos em água limpa, mas o *Aedes* tem capacidade de se adaptar a diversas condições, inclusive água suja<sup>27</sup>.

Mosquitos fêmeas precisam de uma refeição de sangue de um hospedeiro vertebrado para se reproduzir. Portanto, eles podem atuar como vetores para inúmeros patógenos, por exemplo, vírus transmitidos por artrópodes (arbovírus) ou parasitas, responsáveis por doenças humanas e animais<sup>28</sup>.

Os ovos são fertilizados durante a postura e o desenvolvimento embrionário geralmente se completa em 48 horas (Figura 1) se o ambiente for úmido e quente, mas pode durar até 5 dias em temperaturas mais baixas<sup>26</sup>.

Para que as larvas e pupas dos mosquitos cresçam (Figura 2), é preciso que estejam em um ambiente com água parada ou corrente para o crescimento adequado. Normalmente, as larvas da maioria das espécies de mosquitos filtram e se alimentam da matéria orgânica ou outros microrganismos presentes na água<sup>29</sup>.

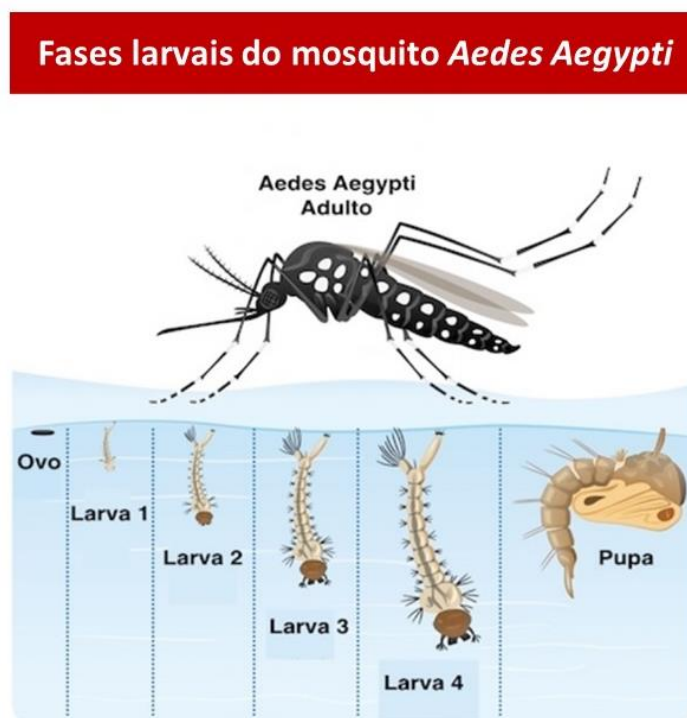
**Figura 1.** Fases do mosquito *Aedes Aegypti* – ovos (1), larvas (2), pupa (3) e mosquito adulto (4).



Fonte: <https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/life-cycles/aedes.html>  
<https://www.cdc.gov/mosquitoes/gallery/aedes/> (Adaptada)

e

**Figura 2.** Fases larvais do mosquito *Aedes aegypti*.



**Fonte:** <http://www.veranopolis.rs.gov.br/noticias/21/saude/2576/saiba-como-e-o-ciclo-de-vida-do-mosquito-aedes-aegypti>

*Ae. aegypti* têm aproximadamente 1 milímetro de comprimento, formato de charuto e são fertilizados no momento da ovoposição. Quando postos, são brancos e ficam pretos brilhantes em pouco tempo. Alguns ovos eclodem dentro de 15 minutos, outros podem não responder até que tenham sido submersos na água diversas vezes<sup>26</sup>.

No período larvário ocorrem três mudas, culminando com a larva de quarto estágio, essa dando origem à pupa<sup>30</sup>.

As larvas de *Ae. aegypti* possuem espículas laterotorácicas bastante desenvolvidas, escamas no oitavo seguimento abdominal com três espinhos bem definidos. As palhetas natatórias das pupas possuem ausência de cílios. O mosquito adulto possui mesonoto (escudo) ornamentado com escamas branco-prateadas em forma de lira<sup>31</sup>.

As larvas de *Ae. aegypti* são semelhantes a outras larvas de mosquito, pois possuem cabeça e tórax ovoides e abdome de 9 segmentos. O segmento posterior e anal do abdome possui quatro brânquias lobadas para regulação osmótica e um sifão ou tubo de ar para respiração na superfície da água. O tempo desde a eclosão até se tornar pupa, geralmente dura de 7 a 14 dias<sup>26</sup>.

Depois que as larvas realizam sua quarta muda larval, elas se desenvolvem em pupas. As pupas não precisam de comida e podem sobreviver por até 3 dias antes da forma adulta<sup>29</sup>.

A função da pupa é a metamorfose da fase larval para a fase adulta, por isso não se alimentam, reagem a estímulos externos, como vibrações, e nadam ativamente em torno do recipiente. Para respirar, na base do tórax há um par de tubos de respiração, que perfuram a superfície da água permitindo a respiração. Quando inativas, flutuam na superfície da água devido à sua flutuabilidade. O estágio de pupa geralmente dura dois ou três dias<sup>26</sup>.

Após se tornarem mosquitos adultos, as fêmeas adultas serão fecundadas, e procurarão abrigo escuro e úmido, em ambiente urbano, logo após a fecundação, são estimuladas à alimentação sanguínea (Figura3). Após a digestão, estando os óvulos maduros, serão estimuladas à oviposição<sup>32</sup>.

As fêmeas se alimentam de sangue durante o dia e podem picar o homem a qualquer hora do dia, porém concentram sua maior atividade dentre o amanhecer e antes

do crepúsculo vespertino. Elas têm preferência pela espécie humana, sua principal vítima, acometido principalmente nos pés e na parte inferior das pernas, porém também picam diversos animais. Os machos também apresentam comportamento diurno para copularem e obterem alimentos açucarados<sup>33</sup>.

Os mosquitos adultos machos se alimentam principalmente de néctar das plantas para obter açúcar, enquanto os mosquitos fêmeas absorvem a refeição de sangue para gerar ovos viáveis<sup>34</sup>.

O mosquito do gênero *Aedes* se diferencia pelo abdome pontiagudo e pela ausência de cerdas espiraculares. É um mosquito escuro com faixas brancas nas bases dos segmentos da perna do tarso e um desenho distinto em forma de "listra" no mesonoto<sup>26</sup>.

### 1.3 CONTROLE DE *Aedes aegypti*

Cobrir os recipientes de armazenamento de água, remover a água parada dos vasos de flores e limpar o lixo e os pneus usados são algumas formas de prevenção e controle. Além disso, as iniciativas comunitárias e os programas de saúde pública para reduzir os criadouros do mosquito são essenciais e o uso de larvicidas e inseticidas para reduzir as populações de mosquitos e a propagação de doenças<sup>35</sup>.

Basicamente existem três tipos de mecanismos de controle: Mecânico, biológico e químico. O mecânico utiliza mecanismos de destruir o vetor e criadouros. O biológico utiliza predadores ou patógenos para eliminar os vetores. O químico utiliza produtos químicos com o objetivo de matar larvas e mosquitos adultos<sup>36</sup>.

As estratégias convencionais de controle baseiam-se na redução de fontes larvais erradicando recipientes de retenção de água que servem como habitats larvais e usando larvicidas (por exemplo, temefós e *Bacillus thuringiensis var. israeliensis [Bti]*) em criadouros naturais e/ou domésticos<sup>37</sup>.

O controle de mosquitos vetores ainda é a principal ferramenta para erradicar, ou pelo menos reduzir, a incidência de arboviroses<sup>38</sup>. Os inseticidas continuam sendo a abordagem de controle de vetores mais eficaz para os mosquitos *Aedes*. Quatro classes principais de inseticidas são amplamente utilizadas para o controle de mosquitos: organoclorados, organofosforados, piretróides e carbamatos<sup>39</sup>. Muitos programas de

controle de vetores estão ameaçados pelo desenvolvimento de resistência a inseticida em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*<sup>40</sup>.

Um tipo de controle biológico do vetor é o uso da bactéria *Wolbachia pipientis*, uma bactéria não patogênica ao homem e a animais domésticos, encontrada naturalmente em mais de 60% dos insetos<sup>41</sup>. A *Wolbachia* é capaz de reduzir pela metade o tempo de vida de um mosquito adulto, ela tem a capacidade de fazer com que o inseto não transmita o vírus<sup>42</sup>. Além disso, um dos métodos planejado para eliminar os vetores é o uso de mosquitos transgênicos; são utilizados mosquitos modificados geneticamente para introduzir novos elementos nos genomas do mosquito, com o objetivo de gerar somente mosquitos que não transmitam vírus e larvas fêmeas que não cheguem à fase adulta e reduzir a população do mosquito *Ae. aegypti*<sup>43</sup>.

#### 1.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas produzem três principais tipos de metabólitos secundários, os fenólicos, terpenos e compostos contendo nitrogênio/enxofre. Os terpenos têm como unidade básica o isoterpenóide 5-C. Os fenólicos conferem capacidade defensiva às plantas e os compostos contendo nitrogênio e enxofre são sintetizados principalmente a partir de aminoácidos<sup>44</sup>.

Os terpenóides constituem uma grande família de compostos naturais e estrutura variada derivados de unidades de isopreno (C5) com cabeça e cauda unidas. Estruturas básicas contêm esqueletos de carbono representados por (C5)<sub>n</sub>, e são classificados de acordo com a quantidade de carbonos presente na cadeia carbônica como hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40)<sup>45</sup>.

Os óleos essenciais (OEs) são constituídos por metabólitos secundários de plantas aromáticas. São substâncias voláteis e normalmente têm forte odor. Os OEs são constituídos por diferentes compostos, o que garante sua capacidade de fornecer propriedades terapêuticas significativas, como por exemplo atividades antioxidantes<sup>46</sup>.

A composição química dos óleos essenciais é bem complexa, normalmente contendo cerca de 20 a 60 compostos em diferentes concentrações<sup>47</sup>. Por serem constituídos de substâncias voláteis, os OEs são de baixa permanência e se degradam no

meio ambiente<sup>48</sup>. Os OEs são ricos em monoterpenos/sesquiterpenos. Em geral, os óleos essenciais possuem de 1 a 3 compostos majoritários, que geralmente, exibem efeitos sinérgicos mútuos e determinam suas propriedades biológicas<sup>49</sup>. Estudos com óleos essenciais e seus principais compostos de diferentes espécies têm sido avaliados devido atividade larvicida relatada contra *Ae. aegypti*<sup>50</sup>.

Desde a antiguidade, os OEs são aproveitados com finalidade antibacteriana, antifúngica, inseticida e cosmética<sup>47</sup>. Os compostos presentes nos óleos essenciais possuem propriedades de inseticida, repelente, larvicida e de ovoposição<sup>51</sup>.

Recentemente, OEs têm sido utilizados como alternativa natural para o controle de mosquitos. Atualmente, a pesquisa sobre OEs concentra-se principalmente em sua atividade repelente contra mosquitos adultos. Porém, por serem constituído de substâncias voláteis, a maioria de óleos essenciais têm atividade residual limitada (<2-4h)<sup>52</sup>.

Os óleos essenciais têm sido bastante testados no controle de vetores de doenças como dengue, chikungunya e Zika. Diversos óleos essenciais com atividade contra larvas de *Ae. aegypti*, sugerem o potencial de exploração desses produtos vegetais contra vetores<sup>53</sup>.

As propriedades dos óleos essenciais são conhecidas há muito tempo, mas somente nos últimos anos o uso dessas substâncias tem sido evidenciado<sup>54</sup>. Como muitas plantas são tóxicas para os mosquitos, a mistura de óleos essenciais pode representar uma saída eficiente para esse problema<sup>55</sup>.

Estudos de sazonalidade têm destacado a necessidade de investigações mais efetivas em produtos vegetais e melhoria do controle de qualidade de produtos derivados de fontes vegetais<sup>56</sup>.

Existe a necessidade de pesquisas com espécies do cerrado com o intuito de aumentar o conhecimento sobre inseticidas biologicamente ativos e ecologicamente corretos<sup>57</sup>.

## 1.5 ESPÉCIES VEGETAIS

### 1.5.1 *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm.

Pertence à família Zingiberaceae é encontrada na literatura científica com as sinonímias de *Alpinia speciosa* K. Shum, *Costus zerumbet* Pers., *Languas speciosa* Small

e *Zerumbet speciosum* J. C. Wendel<sup>58</sup>. O gênero *Alpinia* é o maior gênero da família Zingiberaceae (gingibre)<sup>59</sup>.

Essa espécie pode atingir até 3,0m de altura (Figura 3). É uma erva perene com rizomas, que são aromáticos quando cortados, com um cheiro típico de gengibre. As folhas são de duas fileiras e finas, com aproximadamente 25 a 35 cm de comprimento, também tem o mesmo cheiro. As flores desta bela planta são rosadas quando em botão, e lembram conchas, o que deu origem aos sinônimos: gengibre-concha, flor de concha, lírio de porcelana rosa, gengibre borboleta e galanga luz. Os frutos são em forma de bola com estrias de cor inicialmente amarela, mudando para vermelho à medida que o fruto amadurece<sup>60</sup>.

*A. zerumbet* é muito encontrado no nordeste do Brasil, habitualmente conhecida como colônia<sup>61</sup>. De acordo com a literatura, o óleo essencial dessa espécie é rico em monoterpenos, e dois de seus principais componentes são 4-terpineol e 1,8-cineol<sup>62</sup>.

**Figura 3.** Folhas e flores de *Alpinia zerumbet* (Pers.) (Pers.) B. L. Burt & R. M. Sm.



### 1.5.2 *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg

Pertence à família Myrtaceae, popularmente conhecida por maria-preta ou murta, é árvore de porte pequeno até grande, são arvoretas de tronco geralmente tortuoso e folhas estreitas, porém as árvores se diferenciam pela grande dimensão de seus troncos e pelas folhas mais largas<sup>63</sup>. É uma árvore de 10–20 m de altura e 20–40 cm de diâmetro (Figura 4). Cresce de forma reta e cilíndrica, pouco tortuosa e com casca marrom-escura<sup>64</sup>.

Na literatura constam numerosas descrições botânicas, por isso, hoje se reconhece diferentes espécies, variedades ou formas botânicas para a espécie, entre elas *B. tweediei* e *B. giganteus*<sup>65</sup>.

No Brasil, sua distribuição geográfica se estende pelas regiões Norte, Sudeste e Sul associado a diversas condições climáticas, como umidade e temperatura<sup>66</sup>.

**Figura 4.** Árvore e folhas de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg



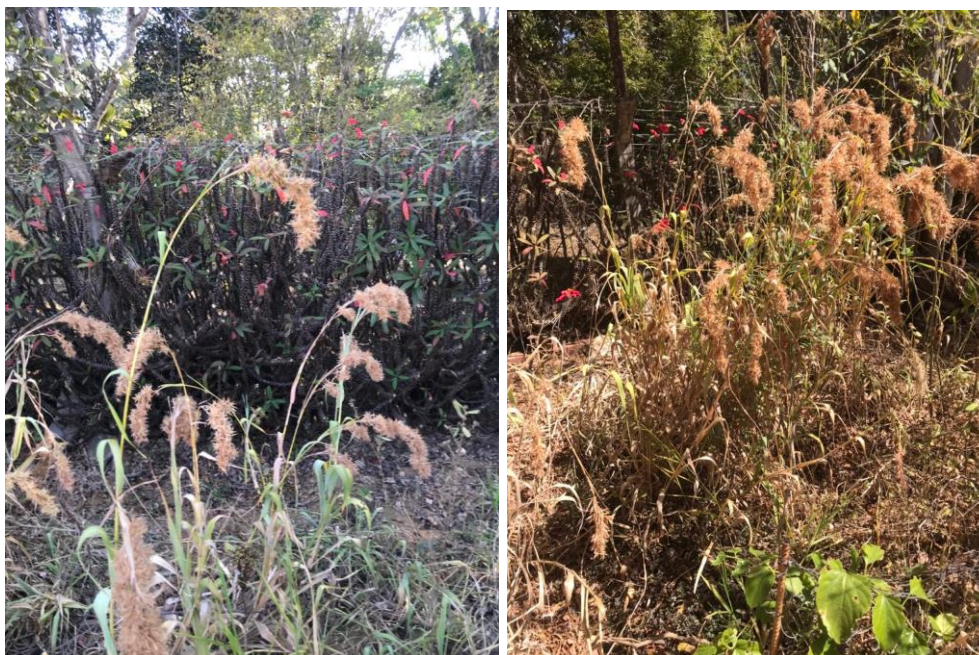
**Fonte:** Foto cedida gentilmente por Christopher William Fagg

### **1.5.3 *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf**

O gênero *Cymbopogon* compreende cerca de 140 espécies, sendo a maioria aromática ricas em óleo essencial<sup>67</sup>. *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf é popularmente usada no Congo contra diversas doenças como asma, febre, resfriado, epilepsia, cólicas e dores abdominais, bem como no domínio culinário e na confecção de perfumes<sup>68</sup>.

Suas flores e folhas (Figura 5) possuem compostos com efeitos terapêuticos e são usadas na medicina tradicional para tratar asma, febre, epilepsia e dores abdominais. O óleo essencial é composto por monoterpenos e é tradicionalmente usado para tratar vários problemas de saúde, como asma, febre, resfriado, epilepsia, cólicas abdominais e dores<sup>69</sup>.

**Figura 5.** Folhas e flores de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf



**Fonte:** Foto cedida gentilmente por Christopher William Fagg

#### 1.5.4 *Eugenia langsdorffii* O. Berg

A Myrtaceae é uma das famílias mais importantes do Brasil, sendo considerada uma das famílias lenhosas dominantes na Mata Atlântica. É também uma grande família, com estimativa de 1.000 espécies no Brasil, que não foi estudada em sua totalidade, mas a estimativa é que menos da metade das espécies tenham sido descritas<sup>70</sup>.

O gênero *Eugenia* contém maior número de espécies vegetais no Brasil, constituído por 407 espécies. Sendo 256, na Mata Atlântica, 108 espécies na Amazônia com, e 83 no Cerrado<sup>71</sup>.

As espécies de *Eugenia* foram classificadas por Berg (1856) em seções baseadas na morfologia da inflorescência<sup>72</sup>. *Eugenia langsdorffii* O. Berg é uma das espécies mais representativas encontrada no bioma cerrado propriamente dito e cerradão, é um arbusto baixo de até 40 cm de altura (Figura 6)<sup>73</sup>.

Espécies de *Eugenia* (Myrtaceae), geralmente são apreciadas por seus frutos comestíveis, além da presença de altos níveis de óleos essenciais e uma grande diversidade química como sesquiterpenos, monoterpenos e fenilpropanóides, e um leque de propriedades biológicas<sup>74</sup>.

**Figura 6.** Parte área de *Eugenia langsdorffii* O. Berg



### 1.5.5 *Myracrodruon urundeuva* Allemão

Pertence à família Anacardiaceae, conhecida popularmente como aroeira, aroeira-do sertão ou urundeúva. É uma árvore de altura de 6-14 metros encontrada no cerrado e caatinga, podendo chegar até 25m em florestas latifoliadas. Ocorre desde o Ceará até o Paraná e Mato Grosso do Sul<sup>75</sup>.

Sua madeira é muito valorizada e altamente explorada, devido à suas características como durabilidade e resistência à deterioração<sup>76</sup>. A espécie é largamente explorada como fonte de madeira, combustível e suas cascas e folhas como remédio (Figura 7). Por causa disso, a planta entra na categoria de ameaçadas de extinção, devido à exploração predatória<sup>77</sup>.

É uma árvore tropical que tem sido estudada pelo potencial antiúlcera, e propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, adstringentes, antialérgicas e cicatrizantes<sup>78,79</sup>.

Extrato etanólico das sementes de *M. urundeuva* espécie vegetal demonstrou excelente atividade biológica, foi altamente tóxico contra larvas do mosquito *Ae. aegypti*<sup>80</sup>.

**Figura 7.** Folhas e botão florais de *Myracrodruon urundeuva* Allemão



**Fonte:** Foto cedida gentilmente por Christopher William Fagg

### **1.5.6 *Baccharis retusa* DC.**

O gênero *Baccharis*, família Asteraceae possui mais de 500 espécies propagadas principalmente nas áreas tropicais da América do Sul. Grande parte das espécies é muito utilizada na medicina popular no tratamento ou prevenção de anemias, inflamações, diabetes e doenças do estômago, fígado e próstata<sup>81</sup>.

É um arbusto, pode atingir 1,5 a 2,5 m altura, folhas coriáceas, margens denteadas, flores presentes em pedicelos ou cachos, os masculinos em formato de sino, os femininos cilíndricos e cipselas (Figura 8) (frutos provenientes de um ovário bicarpelar ínfero)<sup>82</sup>.

**Figura 8.** Folhas e flores de *Baccharis retusa* DC esquerda masculina e direita feminina.



## 2. INTRODUÇÃO

Devido ao clima e outras mudanças ambientais severas, aumento de viagens e comércio internacional, doenças transmitidas por vetores se espalharam de zonas tropicais para áreas temperadas<sup>83</sup>. As doenças transmitidas por vetores representam mais de 17% de todas as doenças infecciosas. Nas Américas, a dengue, a chikungunya e o zika constituem um risco epidemiológico potencial devido ao recente aumento de casos, complicações e gravidade<sup>84</sup>.

O mosquito *Ae. aegypti* é o principal vetor de doenças virais como dengue, zika, chikungunya e febre amarela<sup>85</sup> e o controle vetorial pode prevenir a maioria das doenças transmitidas por vetores<sup>84</sup>.

Os vírus da dengue, chikungunya e Zika, são arbovírus responsáveis por epidemias significativas nos últimos anos. Nas Américas, eles são transmitidos principalmente pelo mosquito *Ae. aegypti*, considerado o principal vetor dessas doenças, é um artrópode hematófago de origem africano muito bem adaptado à vida em áreas urbanas e rurais e distribuído predominantemente nas áreas tropicais e subtropicais das Américas<sup>86</sup>. O uso de inseticidas seguros e eficazes contra a população adulta e larval de vetores de mosquitos é uma das formas mais eficazes de interromper rapidamente a transmissão do vírus Zika, bem como outros vírus transmitidos por mosquitos *Aedes*, como chikungunya e dengue<sup>87</sup>.

Para o controle do mosquito, a principal estratégia utilizada atualmente é o uso de inseticidas sintéticos, porém fatores técnicos, ecológicos, econômicos e operacionais, fazem com que essa estratégia se torne limitada. As iniciativas mais recentes, como o biocontrole com *Wolbachia* spp., modificação genética para insetos estéreis, e outras, apesar de apresentarem bons resultados, ainda não são amplamente utilizadas<sup>88</sup>.

Os efeitos nocivos dos inseticidas sintéticos já são conhecidos e por isso existe uma necessidade de novas alternativas naturais e biodegradáveis. Além disso, a resistência é outro fator negativo, ao contrário dos bioinseticidas, que pelo fato de abranger um conjunto de compostos botânicos, existe pouca possibilidade dos mosquitos apresentarem resistência<sup>88</sup>.

A utilização de inseticidas de forma indiscriminada no controle de mosquitos vetores de doenças tem sido frequente. Porém, a vasta utilização de compostos sintéticos favoreceu o surgimento de linhagens resistentes. Além disso, existe uma grande

preocupação em relação à toxicidade e impacto ambiental destes agentes. Nesse contexto, as plantas podem ser uma opção como alternativas no controle de insetos que empregam substâncias sintéticas ou ainda podem ser adicionados a outros inseticidas nos programas de controle de vetores.

De acordo com a composição química dos extratos podem ser utilizadas como inseticidas, larvicidas ou repelentes<sup>89</sup>.

Os óleos essenciais são um conjunto de compostos orgânicos. São compostos por moléculas aromáticas e voláteis<sup>90</sup>. São pouco tóxicos para os seres humanos e entre suas atividades possuem atividade repelente contra inúmeras espécies de mosquitos<sup>91</sup>. O potencial de óleos essenciais de 175 espécies vegetais contra larvas de *Ae. aegypti* foi analisado e espécies das famílias Piperaceae, Asteraceae, Rutaceae, Euphorbiaceae e Lauraceae apresentaram o maior número de efeitos larvicidas<sup>92</sup>.

O bioma cerrado, ainda pouco explorado, possui um potencial em relação à sua biodiversidade de espécies vegetais, conseqüentemente, essa vegetação é uma fonte rica em produtos naturais que necessitam de investigação<sup>93</sup>.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a suscetibilidade das larvas de *Ae. aegypti* aos diferentes óleos essenciais de plantas cultivadas no cerrado brasileiro e caracterizar a composição química desses e mensurar a concentração letal nas larvas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar extração e calcular rendimento dos óleos essenciais das espécies selecionadas.
- Realizar análise, quantificação e identificação dos óleos essenciais. Realizar bioensaios larvicidas.
- Realizar *screening* com concentrações de 100mg/L (concentração máxima) para seleção de óleos essenciais com maior potencial larvicida.
- Realizar bioensaios larvicidas com 7 (sete) diferentes concentrações com os óleos essenciais com maiores potenciais biolarvicidas e calcular as concentrações letais dos óleos essenciais contra as larvas de *Ae. aegypti*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ESPÉCIES VEGETAIS

Inicialmente foram selecionadas seis espécies vegetais, porém uma das espécies é dióica, ou seja, é a espécie em que os sexos se encontram separados em indivíduos diferentes, por isso foram separadas folhas e flores de cada sexo totalizando nove diferentes óleos essenciais a serem analisados e testados. As espécies vegetais selecionadas foram: *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burtt & R.M.Sm., *Baccharis retusa* DC., *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf, *Eugenia langsdorffii* O. Berg., *Myracrodruon urundeuva* Allemão. A espécie *Baccharis retusa* DC., foi separada em folha masculina, folha feminina, flor masculina e flor feminina.

### 4.2 COLETA E EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O material vegetal foi previamente identificado em campo pelo botânico Christopher Fagg e as *exsiccatas* foram depositadas no Herbário da Universidade de Brasília (UnB). Folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burtt & R.M.Sm., *Baccharis retusa* DC., *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf, *Eugenia langsdorffii* O. Berg. e *Myracrodruon urundeuva* Allemão foram coletados no Campus Darcy Ribeiro da Universidade de Brasília - UnB, Brasília, DF, no Cerrado *sensu stricto*, altitude 1030m, e no Cerrado *sensu stricto* (APA Gama Cabeça de Veado) localizado no Distrito Federal, entre 9h e 10h em junho e julho de 2019.

Foram coletadas folhas e flores completamente desenvolvidas para extração de óleo, para caracterização de seus compostos químicos e realização dos ensaios larvicidas. O material foi acondicionado em sacos de plásticos transparentes, identificados e transportados para o Laboratório de Produtos Naturais (UnB). As espécies coletadas frescas foram cortadas imediatamente com tesoura e faca de cerâmica e inseridas no aparelho tipo Clevenger para destilação. O material vegetal não destilado no mesmo dia foi congelado para destilação no dia posterior.

Os experimentos de extração foram realizados nos laboratórios de Produtos Naturais (Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília-DF), e as

análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (Faculdade de Ciências da Saúde, UnB, Brasília-DF). As plantas foram identificadas pelo botânico Dr. Christopher Fagg.

Os óleos essenciais das folhas e frutos frescos (200 g) foram extraídos em aparelho tipo Clevenger por hidrodestilação por 2h30, e cerca de 2000 mL de água destilada foram utilizados nas extrações, em balões volumétricos de fundo redondo de 2.000 mL. Os vapores de água e óleo formados foram separados por solubilidade e densidade. A mistura de óleo e água foi colocada em vidros escuros fechados, o óleo foi retirado com micropipeta e armazenado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , protegido da luz.

Os experimentos foram realizados em triplicadas em três diferentes dias.

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os rendimentos totais dos óleos foram expressos em porcentagens (g por 200 g de material vegetal fresco). Para o estabelecimento da relação entre a massa fresca da planta e a massa do óleo extraído, os experimentos foram realizados em triplicada e pesados três vezes. A pesagem foi realizada em balança analítica de precisão (GEHAKA, BK5000) com quatro casas decimais.

#### 4.4 CROMATOGRAFIA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A identificação de compostos foi realizada utilizando um cromatógrafo gasoso (Clarus 680 GC, Perkin Elmer) acoplado com um espectrômetro de massas (Clarus SQ8 MS, Perkin Elmer) nas seguintes condições: concentração da amostra  $0,25\ \mu\text{L/mL}$  (solvente acetato de etila); temperatura do forno de injeção de  $280^{\circ}\text{C}$  com proporção de divisão (Split) de 1:20; coluna capilar Elite-5MS da Perkin Elmer (dimensões: comprimento 30m x diâmetro interno 0,25 mm x espessura do filme  $0,25\ \mu\text{m}$ ); forno da coluna com temperatura inicial de  $50^{\circ}\text{C}$ , mantida por 1,5 min, a seguir aumentada gradativamente em  $3^{\circ}\text{C/min}$ , até atingir  $200^{\circ}\text{C}$ , seguida de aquecimento a  $10^{\circ}\text{C/min}$  até  $300^{\circ}\text{C}$ , mantendo esta última temperatura por 5 minutos (tempo total de corrida: 66,5 min); temperatura de interface do CG-EM foi de  $280^{\circ}\text{C}$ , energia de ionização de elétron de 70 eV e temperatura da fonte do detector de  $220^{\circ}\text{C}$ ; a análise feita no intervalo entre 35 e 550 de razão carga massa. A amostra foi preparada em acetato de etila Grau GC (Merk –

Suprasolv), na concentração de 0,25 µL/mL. O volume injetado no cromatógrafo foi de 0,25 µL.

Os cromatogramas e espectros de massas foram analisados pelos softwares Turbo Mass (version 6.1.0.1963), AMDIS (version 2.72) e NIST MS Search (version 2.2).

A identificação dos compostos presentes nos óleos essenciais foi realizada pela comparação dos espectros de massas obtidos na base de dados disponíveis da biblioteca espectral (Turbo Mass (version 6.1.0.1963), AMDIS (version 2.72) e comparados com a biblioteca NIST MS Search (version 2.2) e outras bibliotecas gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Noel W. Davis; e pelos índices de retenção de Kovats (IK). Para o cálculo dos IK, foi realizada corrida do padrão de alcanos C8-C40 (Sigma 40147U) nas mesmas condições das amostras de óleo. Em seguida, o IK foi calculado de acordo com a equação abaixo:

$$IK = 100 \times n + 100 \times [(t_x - t_n) / (t_{n+1} - t_n)]$$

Onde “n” é o número de átomos de carbono do n-alcano que elui imediatamente antes do composto desconhecido X, “t<sub>n</sub>” é o seu respectivo tempo de retenção, “t<sub>n+1</sub>” é o tempo de retenção do n-alcano que elui imediatamente depois do composto X, “t<sub>x</sub>” é o tempo de retenção do composto “X” (Dool HD & Kratz PD, 1963).

A porcentagem relativa de cada composto no óleo essencial foi calculada pela razão entre a área do pico de um determinado composto e o valor da soma das alturas dos picos de todos os compostos do cromatograma de uma dada amostra. Foram identificados os compostos com área relativa acima de 1%, sendo considerados predominantes acima de 10%.

Foi calculada a abundância relativa (AR) por meio da seguinte equação:

$$AR = (h_i \times 100) / H_i$$

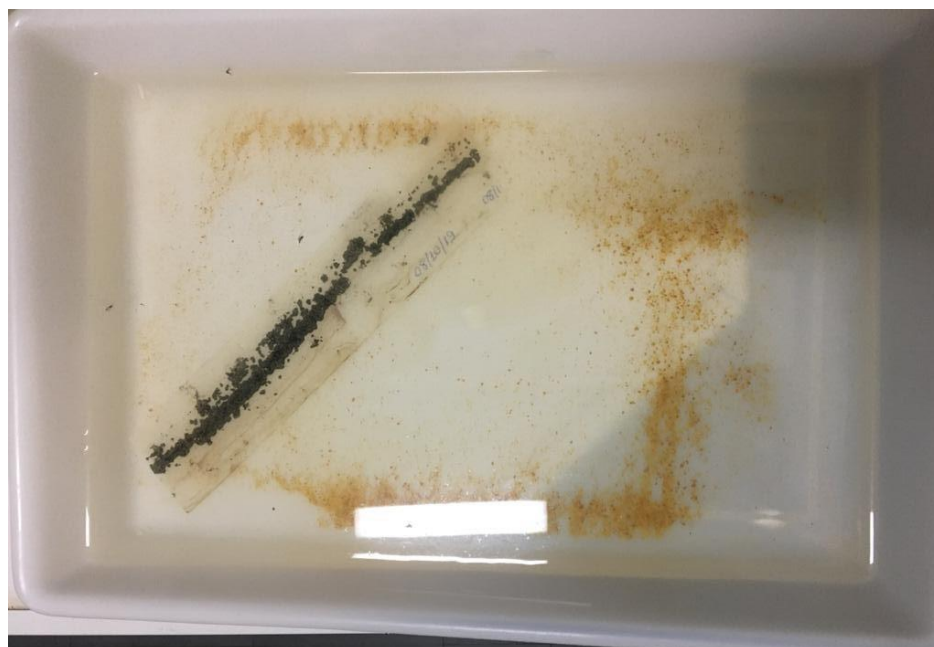
onde “h<sub>i</sub>” é a altura do pico de um dado composto e “H<sub>i</sub>” é a soma das alturas dos picos de todos os compostos do cromatograma de uma dada amostra<sup>95</sup>

#### 4.5 ORIGEM DOS OVOS

Para avaliar a ação dos larvicidas, foram utilizados exemplares de ovos de *Ae. aegypti* (Figura 10) obtidos a partir de amostragem de ovos já existentes no Laboratório de Entomologia do NMT - Universidade de Brasília - UnB. Foram utilizados ovos oriundos de linhagens susceptíveis (Rockefeller) de *Ae. aegypti*, fornecidos pela Universidade do

Ceará (UFCE). Foram utilizadas fitas de papel filtro com ovos já existentes no laboratório. Uma fita de ovos foi previamente preparada com antecedência de 24 horas, inserida em bandeja branca medindo 30 cm de comprimento, 22 cm de largura e 9 cm de altura contendo 3 litros de água destilada e com adição de 3mg de ração triturada para filhotes de gato Natural Guabi® com baixo teor de gordura a cada três dias, para permitir a eclosão das larvas. A primeira geração não foi utilizada. Para os testes, foi utilizada a segunda geração de ovos. Após a etapa de eclosão da primeira fita de ovos, a limpeza da bandeja foi realizada por lavagem com detergente, desinfecção da bandeja com hipoclorito de sódio, e colocação da bandeja a temperatura – 20°C por 24 horas para a eliminação de ovos não eclodidos. Este procedimento de limpeza e armazenamento a temperatura – 20°C também foi adotado com o papel filtro utilizado para a coleta de ovos, bandeja e outros materiais. Os testes foram realizados entre setembro e novembro de 2019, nas instalações do Laboratório de Entomologia de flebotomíneos e culicídeos da Universidade de Brasília.

**Figura 9.** Fita de papel filtro com ovos de *Aedes aegypti* para eclosão.



#### 4.6 FORMAÇÃO DAS LARVAS

A fita da segunda geração foi inserida em bandeja branca com água destilada para eclodir, esse processo durou cerca de 4 – 5 dias até que as larvas eclodissem e estivessem no 3º e 4º estágio. As larvas foram alimentadas até a formação de larvas instar L3 e L4 (Figura 11) com ração triturada para filhotes de gato Natural Guabi® com baixo teor de gordura a cada três dias, adicionada à bandeja. As pupas foram retiradas diariamente das bandejas pipeta pasteur graduada 3mL medidor conta gotas de plástico, transferidas para recipientes contendo água destilada e colocadas em gaiolas de telas de nylon medindo 30x30x30cm (Figura 12).

**Figura 10.** Fotografia das larvas de *Aedes aegypti* no terceiro e quarto estágios após eclosão dos ovos



#### 4.7 ALIMENTAÇÃO

*Ae. aegypti* adultos foram alimentados com solução de água destilada com sacarose a 10% disponível durante todo o tempo na gaiola. A alimentação sanguínea artificial com sangue equino (Figura 12a), cedido pelo Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, foi realizada duas vezes por semana, de 6 a 8 horas. Foram

utilizadas placas de petri de vidro (100x15mm) envolvidas por filme de parafina plástica (Parafilm®). As placas, com 5 mL de sangue, foram dispostas nas gaiolas e, recipientes com 150 mL de água quente foram colocadas por cima para aquecimento do sangue e simulação da temperatura corporal humana. A cada hora, a água foi reaquecida, com o objetivo de manter o sangue com a temperatura ideal para o repasto sanguíneo (38-42°C). Para a oviposição foram colocados recipientes redondos de cor preta com 100 mL de água destilada e papel filtro, devidamente identificado, revestindo a parede interna (Figura 12b) com o objetivo de capturar novos ovos. Os papéis com os ovos (geração F1) foram retirados após 3 dias e mantidos no insetário para secagem e armazenados até a utilização nos ensaios. Novos recipientes foram colocados no interior das gaiolas para nova oviposição. Para alimentação dos mosquitos machos foi inserida solução açucarada de água destilada com sacarose a 10%.

**Figura 11.** Fotografia com: a) gaiola de acrílico transparente utilizada para criação e alimentação das colônias de mosquito de *Aedes aegypti*; b) formação dos mosquitos adultos na gaiola de acrílico.

a)



b)



**Figura 12.** Fotografia dos ensaios em triplicada de larvicidas de *Aedes aegypti* em copos plásticos protegidos por tule (tecido mosquiteiro).



#### 4.8 – SCREENING DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Inicialmente os ensaios larvicidas foram realizados com todos os nove óleos essenciais somente em uma única concentração de 100mg/L. Para realização do teste, foi utilizado o protocolo de monitoramento e manejo da resistência a inseticidas em populações de mosquitos *Aedes*<sup>87</sup>.

Vinte larvas de *Ae. aegypti* foram utilizadas em terceiro e quarto estágio para cada copo de 250 mL em triplicadas, ou seja, 20 larvas x 4 copos, um total de em média 80 larvas para cada óleo essencial testado, podendo ter mais ou menos. As larvas foram expostas a concentrações finais de 100mg/L de óleo essencial em triplicadas (Figura 13).

Além disso, dois controles negativos foram utilizados: com 20 larvas em cada copo, um somente em água destilada (250 mL), e outro com 249 mL de água destilada e 1 mL de DMSO puro.

A solução larvicida foi preparada no momento do teste para a população Rockfeller na concentração final de 100mg/L para os testes iniciais de acordo com a fórmula utilizada abaixo. A quantidade utilizada de óleo essencial foi calculada para um volume final de 250 mL. A quantidade de OE de cada espécie foi solubilizada em DMSO (v/v) para produção de uma solução aquosa a 100mg/L foi utilizada para cada copo em triplicada de acordo com descrição da Tabela 1.

$$D = m/v \text{ (} D = \text{densidade, } m = \text{massa, } v = \text{volume)}$$

$$V(\mu\text{L}) = (Df * Vf)/Doe$$

(*Df = densidade final, Vf = volume final, Doe = densidade óleo essencial*)

$$V(\mu\text{L}) = (100\text{mg/L} * 0,250\text{L})/m/v$$

**OBS: 0,250L considerando o volume final de 250 mL**

Cada óleo foi devidamente pesado em balança de precisão para cálculo da densidade e volume final ideal de acordo com a densidade de cada óleo. Para preparar cada copo utilizado com óleos selecionados, foi utilizado DMSO como agente emulsificante.

O óleo essencial foi diluído em DMSO, o volume total da solução preparada foi de 1 mL a ser adicionado no copo com água destilada. O OE diluído em DMSO foi diluído em copos transparentes de água com volume final de 200 mL.

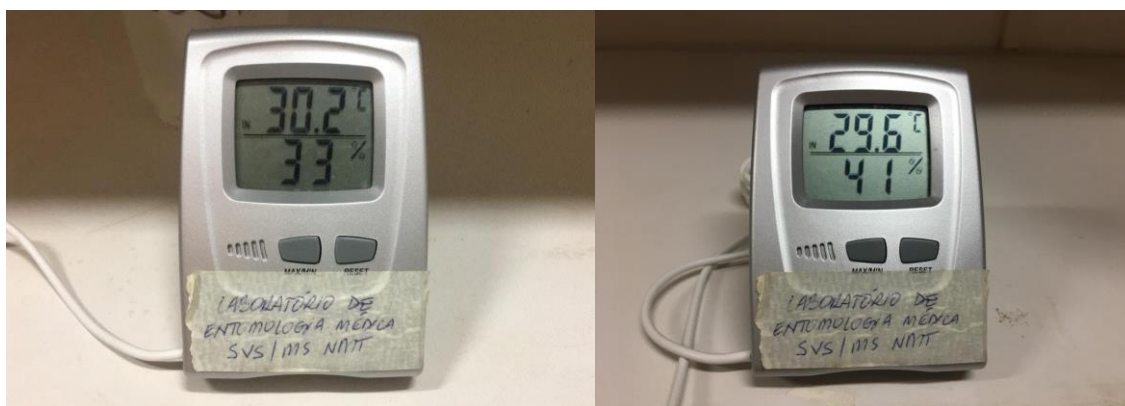
**Tabela 1.** Quantidade de óleo essencial e dimetilsulfóxido - DMSO utilizada no *screening* em espécies cultivadas no cerrado.

ESPÉCIE	MASSA DO OE (mg)	VOLUME DE DMSO (mL)
<i>A. zerumbet</i>	27,17	972,83
<i>B. salicifolius</i>	29,76	970,24
<i>C. densiflorus</i>	28,40	971,60
<i>E. langsdorffii</i>	26,59	973,41
<i>M. urundeuva</i>	29,76	970,24
<i>B. retusa</i> (folha feminina)	27,17	972,83
<i>B. retusa</i> (flor feminina)	28,40	971,60
<i>B. retusa</i> (folha masculina)	27,77	972,23
<i>B. retusa</i> (flor masculina)	26,04	973,96

A partir do *screening* foram selecionados os óleos essenciais que promoveram mortalidade de cerca de 100% para serem testados em sete diferentes concentrações.

Os testes foram realizados em temperatura controlada ( $25 \pm 30^\circ\text{C}$ ) e umidade entre 30-50% (Figura 14).

**Figura 13.** Fotografia com controle de temperatura e umidade durante os ensaios larvicidas.



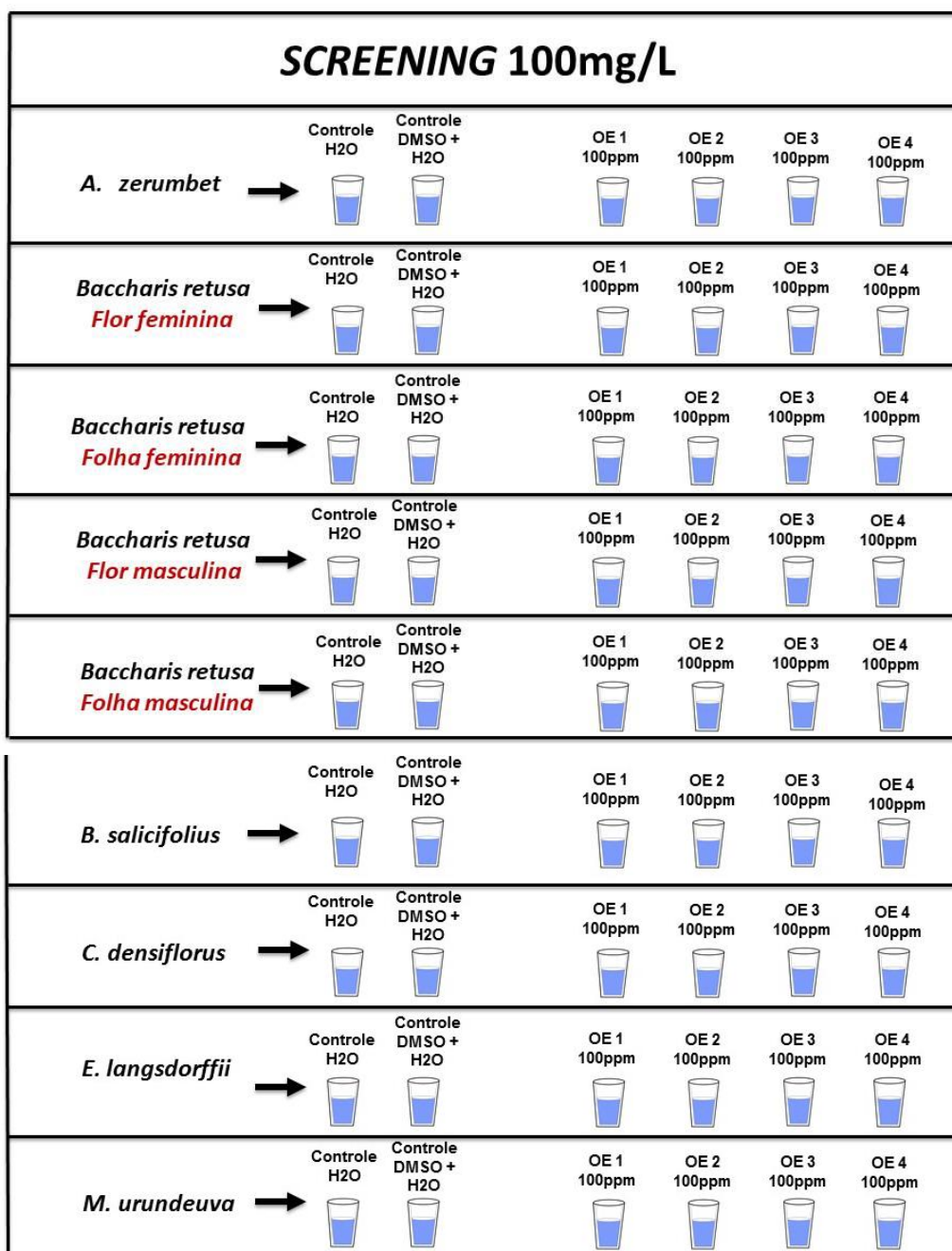
Para cada óleo essencial testado no *screening* foram utilizadas por volta de 120 larvas L3/L4 (80 larvas para o teste com óleo essencial e 20 larvas para os dois controles).

Os copos descartáveis tinham capacidade de 300 mL, foram colocados inicialmente 199 mL de água destilada em cada copo e o volume da solução larvicida de óleo essencial diluído em 1 mL de DMSO para atingir a concentração desejada. Em seguida foi realizada a homogeneização da solução com bastão de vidro nos 199 mL de água destilada. Esse procedimento teve como objetivo garantir que o volume final fosse de 200 mL.

Vinte larvas em estágio L3/L4 foram adicionadas em copos descartáveis com capacidade de 50 mL. Inicialmente, as larvas foram retiradas da bandeja com pipeta Pasteur graduada de 3 mL - medidor conta gotas de plástico e adicionadas ao copo de plástico. Para que o volume final chegasse a 50 mL, foi adicionada água destilada até a marca de 50 mL. Posteriormente, as larvas do copo de 50 mL foram transferidas para cada copo contendo a solução de óleo essencial, que foi previamente diluído, totalizando 250 mL finais.

A solução final continha 250 mL. A mortalidade foi verificada após 24 e 48 horas após o início de cada ensaio. Durante o ensaio nenhum suplemento nutricional foi adicionado. As larvas foram consideradas mortas quando não apresentaram movimento ou resposta à estimulação com uma pipeta Pasteur de plástico e luz direta.

**Figura 14.** Representação esquemática do teste larvicida – *screening* de óleos essenciais de plantas cultivadas no cerrado contra larvas de *Aedes aegypti*.



#### 4.9 ENSAIOS LARVICIDA COM ÓLEOS ESSENCIAIS POTENCIAIS

A atividade larvicida foi testada pelo método de imersão de acordo com procedimento padrão recomendado pelo Organização Mundial de Saúde<sup>87</sup>, com modificações.

A partir do *screening* foram selecionados dois óleos essenciais: *A. zerumbet* e *E. langsdorffii* - que exibiram mortalidade de aproximadamente 100%. Esses dois óleos essenciais foram testados em 7 diferentes concentrações: 2,5; 5; 12; 25; 50; 75 e 100 mg/L para determinar as concentrações letais CL<sub>50</sub>, CL<sub>90</sub> e CL<sub>95</sub>. Os testes das plantas selecionadas foram realizados em triplicadas e três diferentes dias – triplicada biológica.

A mortalidade foi verificada após 24 e 48 horas após o início de cada ensaio. As larvas foram consideradas mortas quando não apresentaram movimento ou resposta à estimulação com uma pipeta Pasteur e luz direta.

Para realização do experimento, foram preparadas soluções com quantidade de óleo essencial calculada para um volume final de 250 mL. Esse procedimento foi realizado para as sete diferentes concentrações. Para cada concentração foram preparadas soluções separadas conforme fórmula acima para volume final de 250 mL em triplicadas.

Para realização dos testes, o óleo essencial pesado foi diluído em DMSO puro, foi pesado e diluído até completar 1 mL de volume final de acordo com a Tabela 2. O OE diluído em DMSO foi diluído em copos transparentes de água com 199 mL com volume final de 200 mL.

Posteriormente, 20 larvas foram transferidas para copo plástico de 50 ml e adicionada água destilada até a marca de 50 ml. O copo contendo as larvas foi adicionado à solução preparada com óleo essencial para completar o volume final de 250 ml. As larvas não foram alimentadas durante o tempo de teste. A mortalidade foi analisada e registrada após 24 e 48 horas de exposição.

**Tabela 2.** Quantidade de óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm. e *Eugenia langsdorffii* O. Berg. e dimetilsulfóxido - DMSO utilizada no bioensaio em diferentes concentrações.

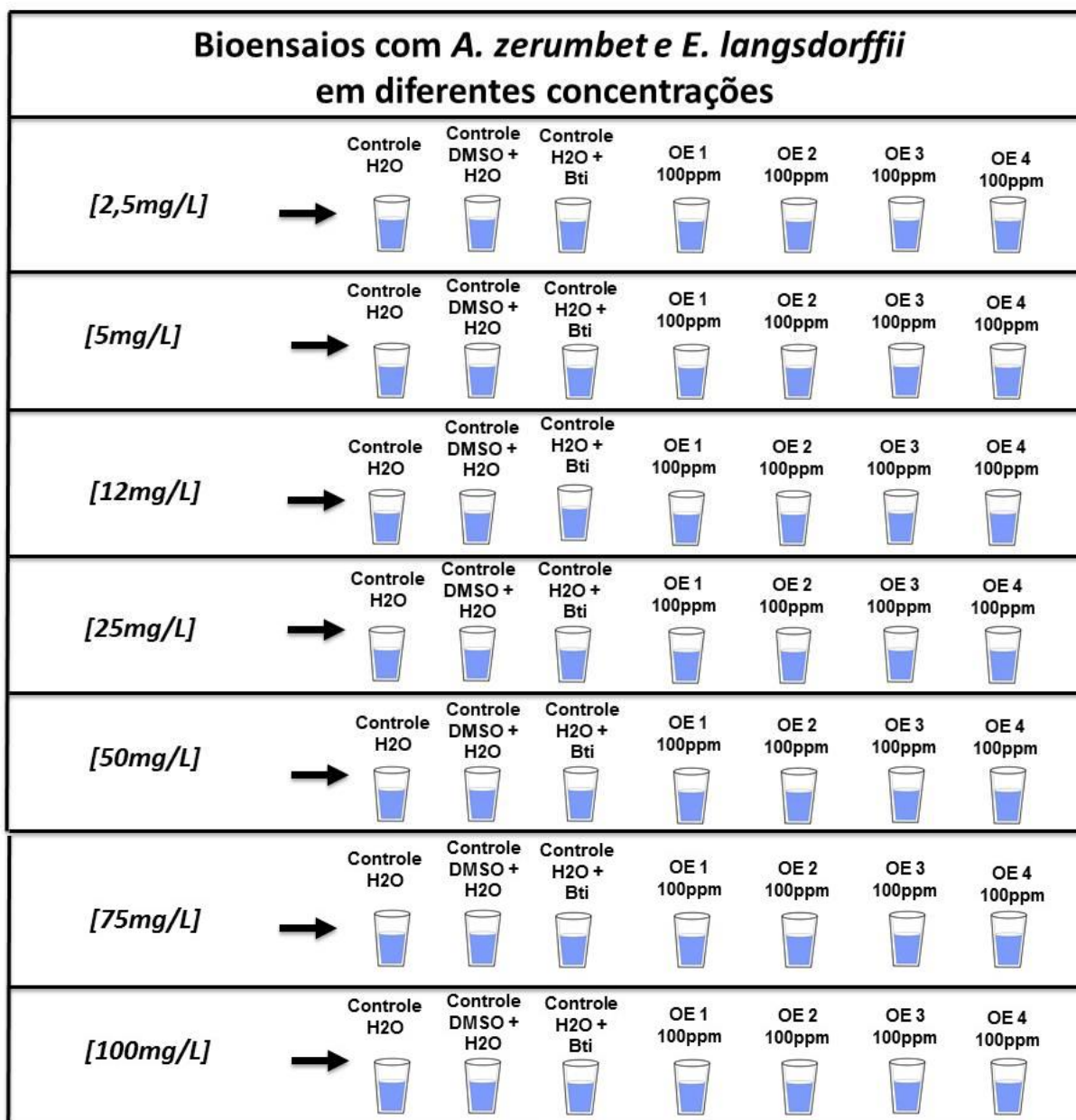
ESPÉCIE	CONCENTRAÇÃO	MASSA DO OE (mg)	VOLUME DE DMSO (mL)
<i>A. zerumbet</i>	2,5	0,68	999,32
	5,0	1,35	998,65
	12	3,26	996,74
	25	6,79	993,21
	50	13,85	986,15
	75	20,37	979,63

	100	27,17	972,83
	2,5	0,66	999,34
	5,0	1,32	998,68
	12	3,19	996,81
<i>E. langsdorffii</i>	25	6,64	993,36
	50	13,29	986,71
	75	19,94	980,06
	100	26,59	973,41

Sete diferentes concentrações foram selecionadas para determinar as doses letais. Triplicadas foram realizadas para cada óleo essencial nas sete diferentes concentrações em três dias distintos – depois de 72h do primeiro ensaio, foi realizado o segundo e após 72h desse foi realizado o terceiro.

Dois controles negativos foram utilizados: com 20 larvas em cada copo, um somente em água destilada (250 mL), e outro com 249 mL de água destilada e 1 mL de DMSO puro. Além dos controles negativos, foi utilizado também um controle positivo para as espécies selecionadas - larvas com água destilada e duas gotas do larvicida *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) a 1,2% para cada copo de 250 mL com 20 larvas para cada triplicada. Sessenta larvas totais foram utilizadas como controle para cada óleo essencial testado e em três diferentes dias de repetição. O larvicida Bti foi gentilmente cedido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, CENARGEN.

**Figura 15.** Representação esquemática do teste larvídica com óleos essenciais de *A. zerumbet* e *E. langsdorffii* contra larvas de *Aedes aegypti*.



#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados do *screening* foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre médias comparadas pelo teste Scott Knott (a 5% de probabilidade) para os testes de mortalidade com o objetivo de definir os tratamentos mais promissores. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos em

$P < 0,05$ . Esse teste é considerado eficiente nas aplicações de experimentos em que o objetivo é comparar diferentes tratamentos. Não foi necessário corrigir a mortalidade, pois a mortalidade dos grupos controle não ultrapassou 10%<sup>87</sup>. As razões das Concentrações Letais (CL) foram consideradas significantes ( $P \leq 0,05$ ).

Os dados de mortalidade obtidos dos bioensaios de concentração-mortalidade foram submetidos à análise de probit com limites de 0,95 (intervalo de confiança), através do programa estatístico PoloPlus (LeOra Software, 2002-2007). Os resultados foram expressos pelo parâmetro de Concentração Letal (CL). As respostas das populações testadas nos bioensaios de concentração-mortalidade foram utilizadas para obtenção das inclinações das curvas e estimadas as  $CL_{50}$ ,  $CL_{90}$  e  $CL_{95}$  para os dois biolarvicidas testados, a fim de ser avaliada a mortalidade das larvas.

Para análise da atividade larvicida foi utilizado o método de Scott-Knott, adequado ao estudo, pois se trata de comparações múltiplas em várias espécies e diversas concentrações. Esse método realiza a comparação de médias por meio de grupos que as classificam de forma homogênea, minimizando a soma de quadrados dentro dos grupos e maximizando entre eles<sup>94</sup>.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 EXTRAÇÃO E RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS

Na Tabela 1 encontram-se registrados os rendimentos percentuais médios dos nove OEs das seis diferentes espécies.

O cálculo para rendimento dos óleos essenciais foi definido pela razão entre a massa de folhas frescas inseridas no balão de destilação e a massa (g) de óleo essencial obtida, conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Rendimento do OE (\%)} = \frac{\text{Média da massa do óleo extraído (g) (triplicadas)} \times 100}{\text{Média da massa de folhas frescas balão (g) (triplicadas)}}$$

**Tabela 3.** Rendimentos percentuais obtidos para OEs das folhas e/ou flores de seis diferentes espécies obtidas em 2019.

Nome científico	Voucher	Parte extraída	Família	Rendimento (%)
<i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B. L. Burt & R.M. Sm.	Fagg 2525	folha	Zingiberaceae	0,26
<i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) O. Berg	Fagg 2521	folha	Myrtaceae	0,28
<i>Cymbopogon densiflorus</i> (Steud.) Stapf	Fagg 2411	folha	Poaceae	0,24
<i>Eugenia langsdorffii</i> (O. Berg.) Faria Jn & Fagg 918	Fagg 2520	folha	Myrtaceae	0,39
<i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão	Fagg 2524	folha	Anacardiaceae	0,13
<i>Baccharis retusa</i> D.C.	Fagg 2524	folha ♂	Asteraceae	0,12
<i>Baccharis retusa</i> D.C.	Fagg 2524	flor ♂	Asteraceae	0,11
<i>Baccharis retusa</i> D.C.	Fagg 2523	folha ♀	Asteraceae	0,15
<i>Baccharis retusa</i> D.C.	Fagg 2523	flor ♀	Asteraceae	0,09

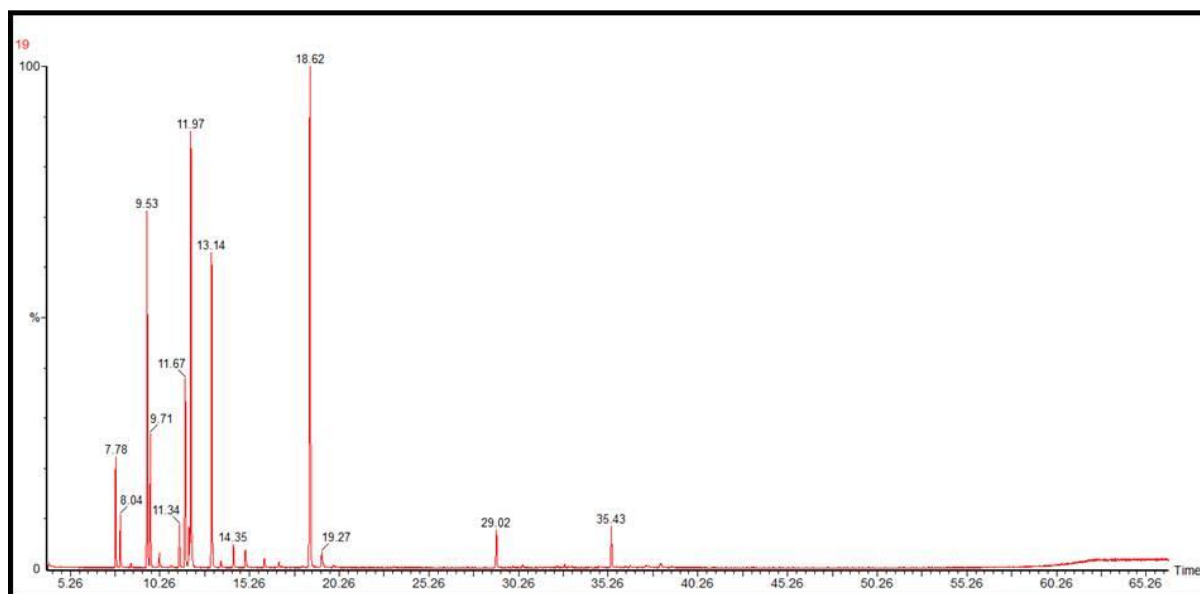
As espécies *E. langsdorffii*, *B. salicifolius*, *A. zerumbet* e *C. densiflorus* apresentaram os maiores rendimentos de óleo essencial extraído (0,39%, 0,28%, 0,26% e 0,24% respectivamente), e diferiu significativamente das espécies *M. urundeuva* e *B. retusa* - tanto folhas como flores masculinas e femininas (0,13%, 0,12%, 0,11%, 0,15% e 0,09% respectivamente).

## 5.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

### 5.2.1 Composição química de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt & R.M. Sm.

Foram identificados 18 componentes químicos no total (Tabela 2), dos quais quatro representaram 73,8%. O componente majoritário do óleo essencial de *A. zerumbet* foi 1,8-cineol (22,6%) seguido por sabineno (21%), terpinen-4-ol (17,3%), e  $\gamma$ -terpineno (12,9%). A porcentagem total de picos identificados a partir do cromatograma foi igual a 98,6% (Figura 16).

**Figura 16.** Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm.



**Tabela 4.** Compostos químicos do óleo essencial das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm. identificados por cromatografia gasosa.

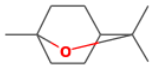
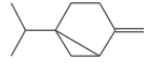
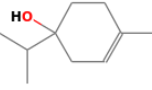
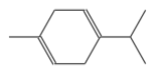
Componentes	Número CAS	IKE $\pm$ D <sup>1</sup> (ED#)	IKE <sup>2</sup>	Match	AR <sup>3</sup> (%)
$\alpha$ -tujeno	2867-05-2	929 $\pm$ 2 (489)	923	868	4,2
1R- $\alpha$ -pineno	7785-70-8	929 $\pm$ 7 (7)	930	896	2,2
sabineno	3387-41-5	974 $\pm$ 2 (619)	969	890	21,0
$\beta$ -pineno	127-91-3	979 $\pm$ 2 (849)	974	886	5,3
miraceno	123-35-3	991 $\pm$ 2 (841)	987	844	0,5
$\alpha$ -terpineno	99-86-5	1017 $\pm$ 2 (534)	1014	852	2,9
O-cimeno*	527-84-4	1022 $\pm$ 2 (116)	1021	917	4,0
limoneno	138-86-3	1030 $\pm$ 2 (1005)	1026	858	1,3
1,8-cineol	470-82-6	1032 $\pm$ 2 (580)	1029	915	22,6

$\gamma$ -terpineno	99-85-4	1060 $\pm$ 3 (739)	1055	902	12,9
hidrato de trans-sabineno**	17699-16-0	1070 $\pm$ 5 (339)	1067	809	0,4
terpinoleno	586-62-9	1088 $\pm$ 2 (607)	1083	874	1,0
cis-p-ment-2-en-1-ol	29803-82-5	1122 $\pm$ 3 (120)	1121	774	0,3
trans-p-ment-2-en-1-ol	29803-81-4	1140 $\pm$ 4 (94)	1139	729	0,2
terpinen-4-ol	562-74-3	1177 $\pm$ 2 (764)	1177	815	17,3
$\alpha$ -terpineol	98-55-5	1189 $\pm$ 2 (811)	1191	890	0,5
$\beta$ -cariofileno	87-44-5	1419 $\pm$ 3 (983)	1415	845	1,2
espatulenol***	77171-55-2	1577 $\pm$ 5 (6)	1576	775	0,8
			IP <sup>4</sup> (%):		98,6

**Legenda:** IKE  $\pm$  D<sup>1</sup> (ED#): Referência média do Índice de Kovats e desvio padrão seguido pelo número de registros de dados entre parênteses. IKE<sup>2</sup>: Índice de Kovats Experimental; Abundância relativa <sup>3</sup>; \*o-cimeno foi o composto com a melhor correspondência, mas m-cimeno e p-cimeno também podem estar presentes. \*\* também pode ser hidrato cis-Sabineno (IK próximo e mesma semelhança) \*\*\* também pode ser (+) – espatulenol.

Houve predominância de monoterpenos hidrogenados (55,3%), identificados como sabineno e  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -tujeno, 1R- $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, canfeno, mirceno,  $\alpha$ -terpineno, O-cimeno, limoneno e terpinoleno; e monoterpenos oxigenados (41,3%), a saber, 1,8-cineol, hidrato de trans-sabineno, cis-p-ment-2-en-1-ol, trans-p-Ment-2-en-1-ol, e terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol). Também foram identificados sesquiterpenos, em um total de 1,2% ( $\beta$ -cariofileno) e 0,8% (espatulenol). A Tabela 5 mostra os compostos majoritários.

**Tabela 5.** Compostos majoritários no óleo essencial de folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm.

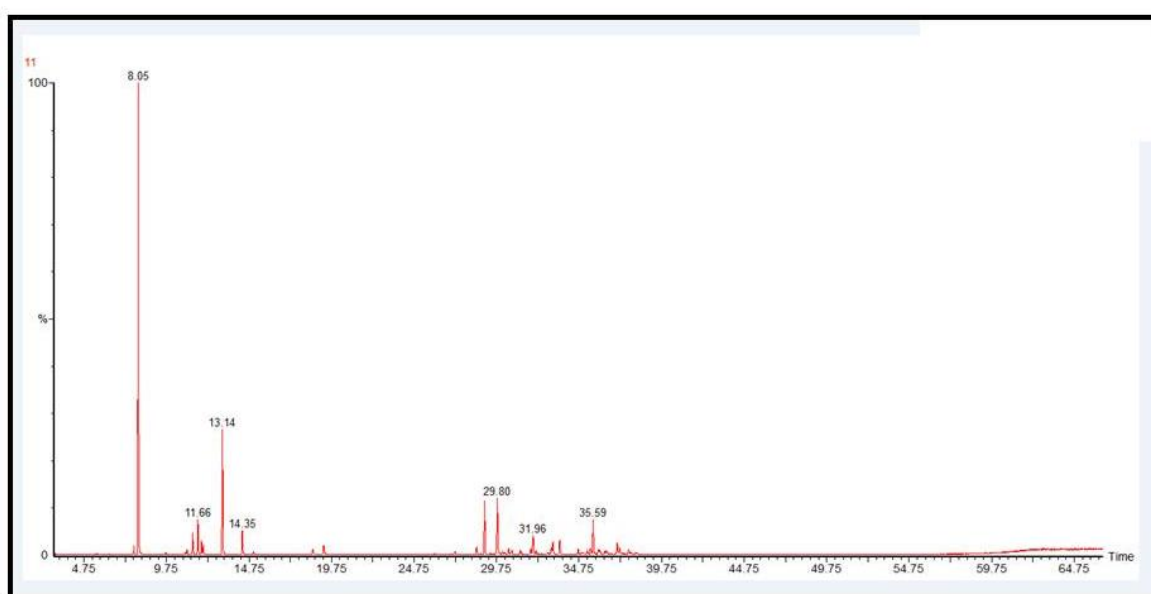
Nº	COMPOSTOS MAJORITÁRIOS	NÚMERO CAS	CLASSIFICAÇÃO QUÍMICA	FÓRMULA MOLECULAR	ESTRUTURA QUÍMICA
1	1,8-cineol	470-82-6	MONOTERPENO	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	
2	sabineno	3387-41-5	MONOTERPENO	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	
3	terpinen-4-ol	562-74-3	MONOTERPENO	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	
4	$\gamma$ -terpineno	99-85-4	MONOTERPENO	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	

**Fonte:** Baseado em dados já publicados Pubchem, 2022 e NIST, 2022<sup>120,121</sup>.

## 5.2.2 Composição química de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg

Os resultados da análise por CG-EM estão listados na Tabela 6 e cromatograma (Figura 17). Um total de 31 componentes foram identificados. Quatro componentes químicos representaram 66,8% do total de 93,3% identificados. O principal constituinte do OE de *B. salicifolius* foi 1R- $\alpha$ -pineno (44%), seguido por  $\gamma$ -terpineno (12,1%),  $\beta$ -cariofileno (5,3%) e aromadendreno (5,3%) (Tabela 6).

**Figura 17.** Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg.



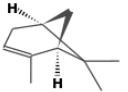

Os principais constituintes do OE de *B. salicifolius* foram representados por monoterpenos alifáticos (67,3%):  $\alpha$ -tujeno, 1R- $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -felandreno, 3-careno,  $\alpha$ -terpineno, O-cimeno, limoneno,  $\gamma$ -terpineno, terpinoleno. Três compostos foram identificados como monoterpenos oxigenados (1,8-cineol, linalool,  $\alpha$ -terpineol) em um total de 2%. Os sesquiterpenos alifáticos constituíram 19,3% ( $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -gurjuneno,  $\beta$ -cariofileno, aromadendreno, selina-5-11-dieno,  $\alpha$ -humuleno, alloaromadendreno,  $\beta$ -guaiano, ledeno,  $\beta$ -cadineno, calameneno, cubeneno, guaia-3,9-dieno). Como sesquiterpenos oxigenados, quatro compostos foram identificados (espatulenol, globulol e viridiflorol) totalizando 4,7%, e um aldeído, 2-hexenal (0,1%). Os compostos majoritários estão apresentados na Tabela 7.

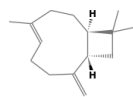
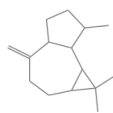
**Tabela 6.** Compostos químicos do óleo essencial das folhas de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg identificados por cromatografia gasosa.

Componentes	Número CAS	IKE ± D <sup>1</sup> (ED#)	IKE <sup>2</sup>	Match	AR <sup>3</sup> (%)
2-hexenal	505-57-7	851 ± 5 (52)	846	751	0,1
α-tujeno	2867-05-2	929 ± 2 (489)	921	864	0,9
1R-α-pineno	7785-70-8	929 ± 7 (7)	928	908	44,0
β-pineno	127-91-3	979 ± 2 (849)	972	847	0,2
α-felandreno	99-83-2	1005 ± 2 (509)	1002	746	0,2
3-careno	13466-78-9	1011 ± 2 (336)	1005	863	0,4
α-terpineno	99-86-5	1017 ± 2 (534)	1013	866	1,9
o-cimeno**	527-84-4	1022 ± 2 (116)	1020	912	3,5
limoneno	138-86-3	1030 ± 2 (1005)	1024	869	1,4
1,8-cineol	470-82-6	1032 ± 2 (580)	1027	846	0,8
γ-terpineno	99-85-4	1060 ± 3 (739)	1053	910	12,1
terpinoleno	586-62-9	1088 ± 2 (607)	1081	924	2,7
linalool	78-70-6	1099 ± 2 (976)	1096	842	0,3
α-terpineol	98-55-5	1189 ± 2 (811)	1190	900	0,9
α-copaeno	3856-25-5	1376 ± 2 (698)	1371	832	0,3
α-gurjuneno	489-40-7	1409 ± 2 (196)	1402	850	0,8
β-cariofileno	87-44-5	1419 ± 3 (983)	1414	895	5,3
aromandendreno	489-39-4	1440 ± 1 (5)	1433	925	5,3
selina-5-11-dieno	52026-55-8	1447 ± N/A (1)	1440	840	0,4
α-humuleno	6753-98-6	1454 ± 3 (792)	1450	845	0,6
alloaromadendreno	25246-27-9	1461 ± 2 (343)	1454	851	0,4
β-guaieno	88-84-6	1490 ± 3 (69)	1483	855	0,5
ledeno	21747-46-6	1493 ± 4 (114)	1486	877	1,8
cadina-3,9-dieno	523-47-7	1518 ± 10 (30)	1513	830	0,6
calameneno	483-77-2	1523 ± 5 (145)	1516	861	1,2
cubeneno	29837-12-5	1532 ± 1 (119)	1527	810	1,5
guaia-3,9-diene	489-83-8	1556 ± N/A (1)	1556	787	0,6
espatulenol	6750-60-3	1576 ± 2 (539)	1570	766	1,1
globulol	489-41-8	1580 ± N/A (1)	1579	836	3,1
viridiflorol	552-02-3	1591 ± 2 (198)	1588	773	0,5
			IP <sup>4</sup> (%):		93,3

**Legenda:** IKE ± D<sup>1</sup> (ED#): Referência média do Índice de Kovats e desvio padrão seguido pelo número de registros de dados entre parênteses. IKE<sup>2</sup>: Índice de Kovats Experimental; Abundância relativa<sup>3</sup>;

**Tabela 7.** Compostos químicos identificados, número CAS, classificação química, fórmula molecular e estrutura química dos compostos majoritários, em ordem crescente, do óleo essencial das folhas de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg.

Nº	COMPOSTOS MAJORITÁRIOS	NÚMERO CAS	CLASSIFICAÇÃO QUÍMICA	FÓRMULA MOLECULAR	ESTRUTURA QUÍMICA
1	1R-α-pineno	7785-70-8	MONOTERPENO	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	
2	γ-terpineno	99-85-4	MONOTERPENO	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	

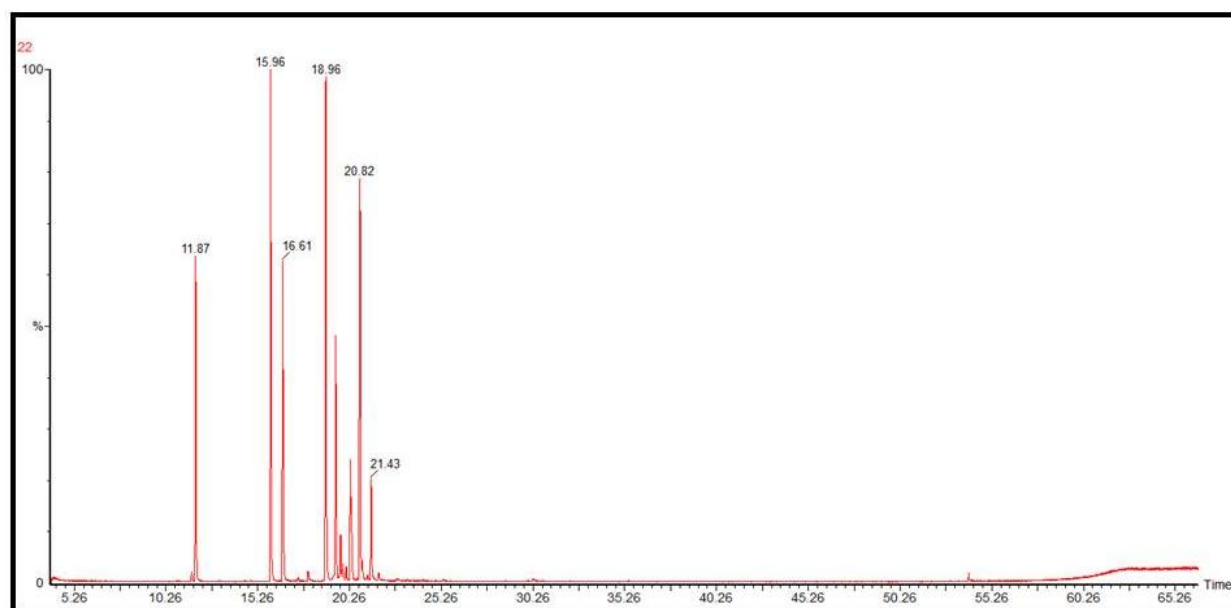
3	$\beta$ -cariofileno	87-44-5	SESQUITERPENO	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	
4	aromandendreno	489-39-4	SESQUITERPENO	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	

Fonte: Baseado em dados já publicados Pubchem, 2022 e NIST, 2022<sup>120,121</sup>.

### 5.2.3 Composição química de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf

Os resultados da análise por CG-EM estão listados na Tabela 8 e cromatograma (Figura 18). Um total de 12 componentes foi identificado (97,8%). Os principais compostos identificados foram trans-p-menta-2.8-dien-1-ol (19,2%), isocarveol (18,9%) cis-p-Menta-1(7).8-dien-2-ol (15,1%), limoneno (12,2%) e cosmeno (12%).

**Figura 18.** Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf.



**Tabela 8.** Compostos químicos do óleo essencial das folhas de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf identificados por cromatografia gasosa.

Componentes	Número CAS	IKE ± D <sup>1</sup> (ED#)	IKE <sup>2</sup>	Match	AR <sup>3</sup> (%)
m-cimeno*	535-77-3	1023 + 6 (53)	1021	819	0,3
limoneno	138-86-3	1030 ± 2 (1005)	1026	869	12,2
trans-p-menta-2.8-dien-1-ol	7212-40-0	1123 + 4 (18)	1118	816	19,2

cosmeno	460-01-5	1131 + 1 (4)	1133	827	12,0
isocarveol	35907-10-9	1186 + N/A (1)	1184	839	18,9
carveol	99-48-9	1219 + 19 (11)	1196	879	9,2
2-pinen-10-ol	515-00-4	1195 + 2 (203)	1202	772	1,6
trans-carveol	1197-07-5	1217 + 2 (216)	1214	662	4,5
cis-p-menta-1(7).8-dien-2-ol	22626-43-3	1231 + N/A (1)	1226	911	15,1
cis-carveol	1197-06-4	1229 + 3 (115)	1228	799	0,7
carvona	99-49-0	1242 + 4 (307)	1239	914	3,8
hexanoato de isopentila	2198-61-0	1252 + 2 (33)	1249	853	0,3
				IP <sup>4</sup> (%):	97,8

**Legenda:** IKE ± D<sup>1</sup> (ED#): Referência média do Índice de Kovats e desvio padrão seguido pelo número de registros de dados entre parênteses. IKE<sup>2</sup>: Índice de Kovats Experimental; Abundância relativa<sup>3</sup>;

Os compostos majoritários foram mostrados na Tabela 9. Foram encontrados monoterpenos oxigenados (73%): trans-p-menta-2.8-dien-1-ol isocarveol, carveol, 2-pinen-10-ol, trans-carveol, cis-p-menta-1(7).8-dien-2-ol, cis-carveol e carvona; monoterpenos alifáticos em um total de 24,5% (m-cimene, limoneno e cosmeno) e um éster, hexanoato de isopentenila (0,3%).

**Tabela 9.** Compostos majoritários no óleo essencial das folhas de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf

Nº	COMPOSTOS MAJORITÁRIOS	NÚMERO CAS	CLASSIFICAÇÃO QUÍMICA	FÓRMULA MOLECULAR	ESTRUTURA QUÍMICA
1	trans-p-menta-2.8-dien-1-ol	7212-40-0	MONOTERPENO	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	
2	isocarveol	35907-10-9	MONOTERPENO	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	
3	cis-p-menta-1(7).8-dien-2-ol	22626-43-3	MONOTERPENO	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	
4	limoneno	138-86-3	MONOTERPENO	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	
5	cosmeno	460-01-5	MONOTERPENO	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	

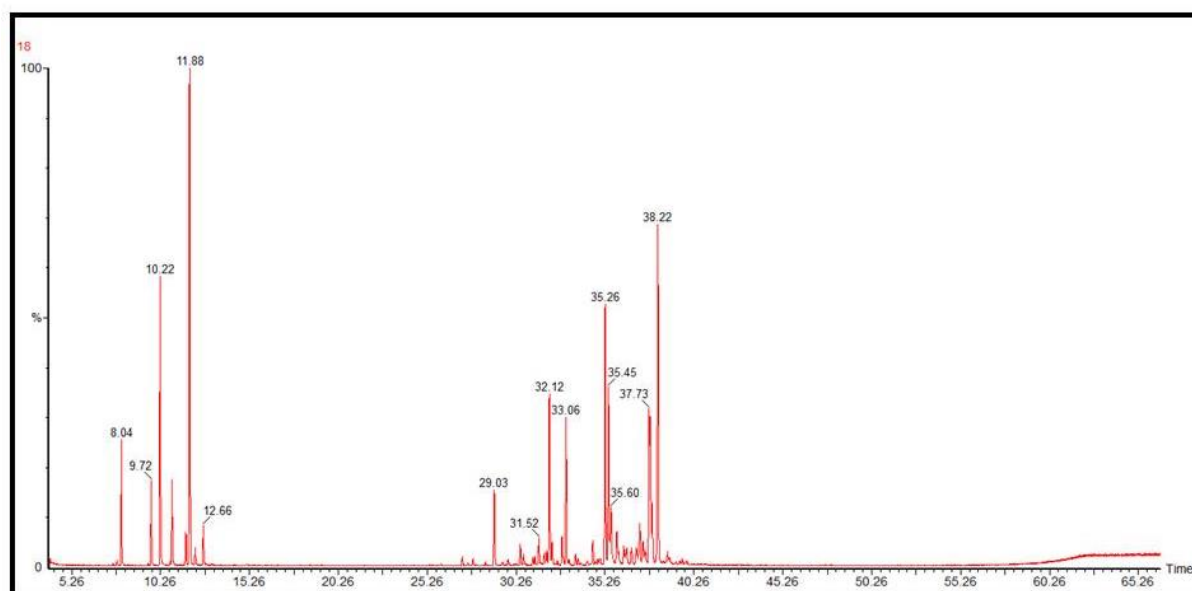
**Fonte:** Baseado em dados já publicados Pubchem, 2022 e NIST, 2022<sup>120,121</sup>.

### 5.2.4 Composição química de *Eugenia langsdorffii* O. Berg.

Um total de 29 compostos foi identificado. *Eugenia langsdorffii* apresentou predominância de monoterpenos alifáticos (36,5%): α-tujeno, 1R-α-pineno, β-pineno,

mirreno,  $\alpha$ -felandreno, O-cimeno, limoneno,  $\beta$ -O-cimeno,  $\alpha$ -O-cimeno; além de sesquiterpenos oxigenados (32,9%): espatulenol, globulol, viridiflorol,  $\alpha$ -epi-cadinol, cubenol e  $\delta$ -cadinol. 17,2% foram identificados como sesquiterpenos alifáticos ( $\beta$ -elemeno,  $\beta$ -cariofileno, aromadendreno,  $\alpha$ -humuleno,  $\gamma$ -muuroleno,  $\gamma$ -himachaleno, ledeno,  $\beta$ -ciclogermacreno,  $\alpha$ -muuroleno,  $\gamma$ -cadineno,  $\beta$ -cadineno,  $\alpha$ -cadineno e germacreno B; que foram os compostos majoritários desta família química de acordo com Tabela 8. O cromatograma na Figura 19 mostra a diversidade de picos dos compostos identificados, Os compostos majoritários identificados foram limoneno (15,5%),  $\delta$ -cadinol (10,6%), mirreno (9%) e espatulenol (13,5%). Ao todo, 87,8% dos compostos foram identificados. A Tabela 10 descreve os compostos identificados.

**Figura 19.** Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Eugenia langsdorffii* O. Berg.



**Tabela 10.** Compostos químicos do óleo essencial das folhas de espécie *Eugenia langsdorffii* O. Berg. identificados por cromatografia gasosa.

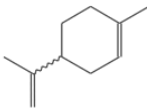
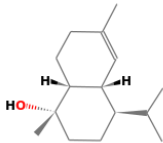
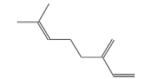
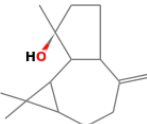
Componentes	Número CAS	IKE $\pm$ D <sup>1</sup> (ED#)	EKI 2	Match RA 3 (%)
$\alpha$ -tujeno	2867-05-2	929 $\pm$ 2 (489)	923 840	0,2
1R- $\alpha$ -pineno	7785-70-8	929 $\pm$ 7 (7)	930 892	3,9
$\beta$ -pineno	127-91-3	979 $\pm$ 2 (849)	974 913	2,6
$\beta$ -mirreno	123-35-3	991 $\pm$ 2 (841)	987 919	9,0
$\alpha$ -felandreno	99-83-2	1005 $\pm$ 2 (509)	1004 898	2,6

o-cimeno*	527-84-4	1022 ± 2 (116)	1022	906	1,0
limoneno	138-86-3	1030 ± 2 (1005)	1026	879	15,5
β-ocimeno	13877-91-3	1037 ± 7 (20)	1034	864	0,5
α-ocimeno	502-99-8	1047 ± 5 (38)	1044	895	1,2
β-elemeno	515-13-9	1391 ± 2 (521)	1386	826	0,2
β-cariofileno	87-44-5	1419 ± 3 (983)	1415	894	2,4
aromadendreno	489-39-4	1440 ± 1 (5)	1434	833	0,2
α-humuleno	6753-98-6	1454 ± 3 (792)	1450	855	0,6
γ-muurolene	30021-74-0	1477 ± 3 (392)	1476	800	0,8
γ-himachaleno**	?	1477 ± 3 (31)	1484	809	0,3
ledeno	21747-46-6	1493 ± 4 (114)	1487	831	0,4
β-ciclo-□-germacreno	24703-35-3	1495 ± 4 (368)	1491	861	5,2
α-muuroloeno	10208-80-7	1499 ± 3 (427)	1494	853	0,6
γ-cadineno	39029-41-9	1513 ± 2 (485)	1508	849	0,9
β-cadineno	523-47-7	1518 ± 10 (30)	1514	881	4,6
α-cadineno	24406-05-1	1538 ± 1 (31)	1532	806	0,2
germacreno B	15423-57-1	1557 ± 3 (233)	1553	852	0,8
espatulenol	6750-60-3	1576 ± 2 (539)	1571	817	13,5
globulol	489-41-8	1580 ± N/A (1)	1580	869	1,6
viridiflorol	552-02-3	1591 ± 2 (198)	1588	788	1,0
α-epi-cadinol	5937-11-1	1640 ± 2 (241)	1639	807	4,5
cubenol	21284-22-0	1642 ± 3 (127)	1641	761	1,7
δ-cadinol	19435-97-3	1645 ± 2 (220)	1650	823	10,6
				IP <sup>4</sup> (%):	87,8

**Legenda:** IKE ± D1 (ED#): Referência média do Índice de Kovats e desvio padrão seguido pelo número de registros de dados entre parênteses. IKE2: Índice de Kovats Experimental; Abundância relativa 3;

Os monoterpenos alifáticos tiveram representação em porcentagem muito próxima aos sesquiterpenos oxigenados 36,5% e 32,9% respectivamente. Os sesquiterpenos alifáticos representaram 17,2% e nenhum composto foi identificado como monoterpeno oxigenado. Os compostos majoritários foram caracterizados e descritos de acordo com suas características químicas na Tabela 11.

**Tabela 11.** Compostos químicos identificados, no óleo essencial de folhas de *Eugenia langsdorffii* O. Berg.

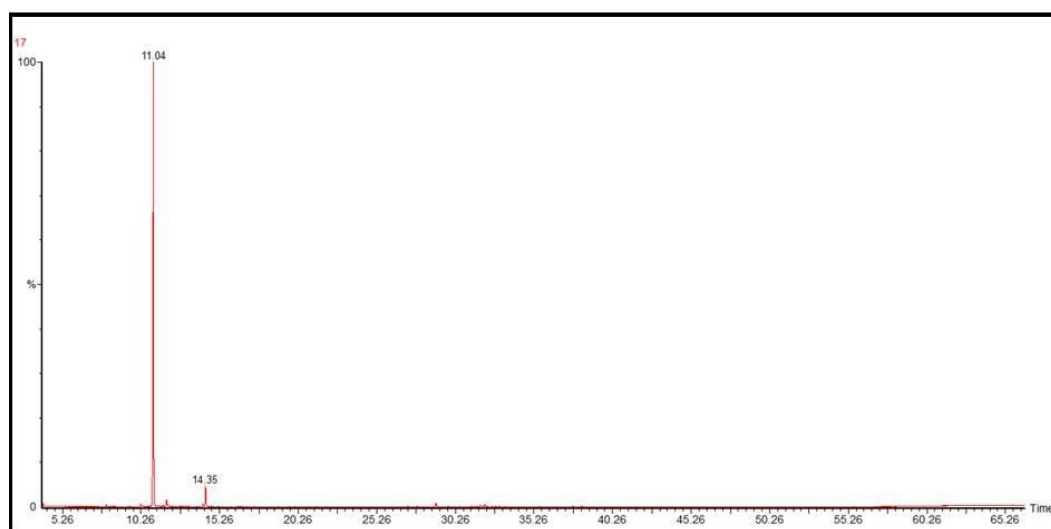
Nº	COMPOSTOS MAJORITÁRIOS	NÚMERO CAS	CLASSIFICAÇÃO QUÍMICA	FÓRMULA MOLECULAR	ESTRUTURA QUÍMICA
1	limoneno	138-86-3	MONOTERPENO	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	
2	δ-cadinol	19435-97-3	SESQUITERPENO	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	
3	mirreno	123-35-3	MONOTERPENO	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	
4	espatulenol	6750-60-3	SESQUITERPENO	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	

Fonte: Baseado em dados já publicados Pubchem, 2022 e NIST, 2022<sup>120,121</sup>.

### 5.2.5 Composição química de *Myracrodruon urundeuva* Allemão

O óleo essencial de *Myracrodruon urundeuva* Allemão se diferenciou no quesito composição química, pois, basicamente tem um único componente, como pode ser observado no cromatograma na Figura 20, totalizando 90,3% de δ-3-careno e 4,4% de terpinoleno (Figura 24), totalizando 94,7% dos compostos identificados. Ao todo 11 compostos foram identificados, totalizando 99,2% (Tabela 12).

**Figura 20.** Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Myracrodruon urundeuva* Allemão.



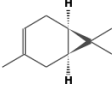
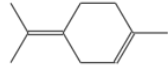
Os compostos majoritários foram classificados somente como monoterpenos alifáticos ( $\delta$ -3-careno e terpinoleno) conforme Tabela 12. Um total de 97,7% dos compostos identificados foram classificados como monoterpenos alifáticos (1R- $\alpha$ -pineno, mirceno,  $\alpha$ -felandreno,  $\delta$ -3-careno,  $\alpha$ -terpineno, limoneno, isoterpinoleno e terpinoleno); e 1,5% como sesquiterpenos alifáticos ( $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -eudesmeno,  $\beta$ -guaiano). Não foram identificados compostos classificados como monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos oxigenados. Os compostos majoritários caracterizados e descritos de acordo com suas características químicas na Tabela 13.

**Tabela 12.** Compostos químicos identificados por cromatografia gasosa no óleo essencial das folhas de *Myracrodruon urundeuva* Allemão.

Componentes	Número CAS	IKE $\pm$ D <sup>1</sup> (ED#)	IKE <sup>2</sup>	Match	AR <sup>3</sup> (%)
1R- $\alpha$ -pineno	7785-70-8	929 $\pm$ 7 (7)	930	881	0,4
mirceno	123-35-3	991 $\pm$ 2 (841)	987	850	0,6
$\alpha$ -felandreno	99-83-2	1005 $\pm$ 2 (509)	1004	783	0,3
$\delta$ -3-careno	13466-78-9	1011 $\pm$ 2 (336)	1007	915	90,2
$\alpha$ -terpineno	99-86-5	1017 $\pm$ 2 (534)	1014	835	0,3
$\alpha$ -limoneno	138-86-3	1030 $\pm$ 2 (1005)	1026	863	1,3
isoterpinoleno	586-63-0	1086 $\pm$ 3 (46)	1079	878	0,5
terpinoleno	586-62-9	1088 $\pm$ 2 (607)	1083	922	4,1
$\beta$ -cariofileno	87-44-5	1419 $\pm$ 3 (983)	1415	863	0,8
$\beta$ -eudesmeno	17066-67-0	1486 $\pm$ 3 (349)	1484	842	0,3
$\beta$ -guaiano	88-84-6	1490 $\pm$ 3 (69)	1491	862	0,4
<b>PI<sup>4</sup> (%):</b>					<b>99,1</b>

**Legenda:** RKI  $\pm$  D<sup>1</sup> (ED#): Referência média do Índice de Kovats e desvio padrão seguido pelo número de registros de dados entre parênteses. EKI<sup>2</sup>: Índice de Kovats Experimental; Abundância relativa<sup>3</sup>; IP<sup>4</sup> (%): Picos identificados.

**Tabela 13.** Compostos químicos identificados, número CAS, classificação química, fórmula molecular e estrutura dos compostos majoritários, em ordem crescente, do óleo essencial das folhas de *Myracrodruon urundeuva* Allemão.

Nº	COMPOSTOS MAJORITÁRIOS	NÚMERO CAS	CLASSIFICAÇÃO QUÍMICA	FÓRMULA MOLECULAR	ESTRUTURA QUÍMICA
1	$\delta$ -3-careno	13466-78-9	MONOTERPENO	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	
2	terpinoleno	586-62-9	MONOTERPENO	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	

**Fonte:** Baseado em dados já publicados Pubchem, 2022 e NIST, 2022<sup>120,121</sup>.

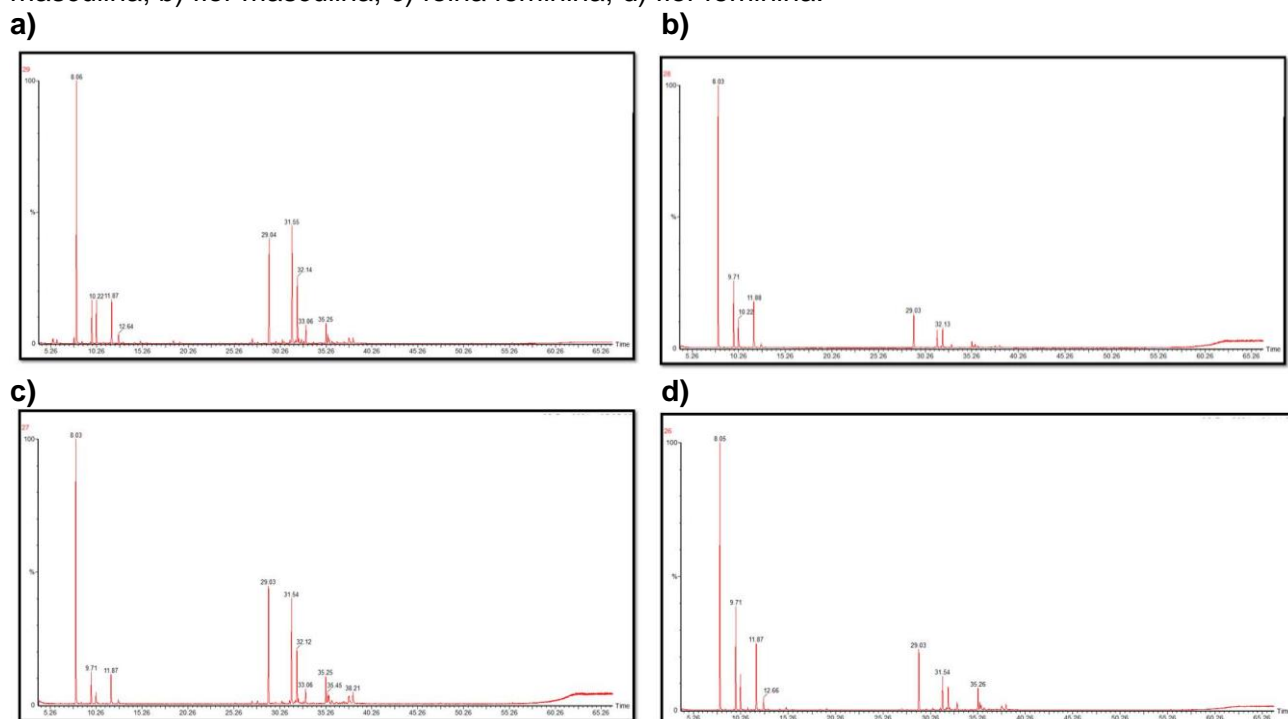
## 5.2.6 Composição química de *Baccharis retusa* D.C.

Para a espécie *B. retusa* foram realizadas quatro diferentes análises. O óleo essencial das folhas masculinas apresentou 1R- $\alpha$ -pineno (31,3%),  $\beta$ -cariofileno (12,5%), germacreno D (14%) e biciclogermacreno (7,8%) como componentes principais, enquanto as flores masculinas apresentaram 1R- $\alpha$ -pineno (53,4%),  $\beta$ -pineno (13,6%), limoneno (9,3%) e  $\beta$ -cariofileno (6,8%) conforme descrito na Tabela 14.

Nas folhas femininas foram identificados 1R- $\alpha$ -pineno (36,6%),  $\beta$ -cariofileno (16,4%), germacreno D (14,6%) e biciclogermacreno (7,5%), enquanto para as flores femininas 1R- $\alpha$ -pinene (39,7 %),  $\beta$ -pineno (15,3%), limoneno (9,9%) e  $\beta$ -cariofileno(9%) (Tabela 13). As diferenças nos picos identificados entre flores e folhas feminina e masculina foram ilustradas no cromatograma da Figura 21.

Os mesmos compostos majoritários foram identificados nas folhas masculinas e femininas e nas flores masculinas e femininas, diferenciando as porcentagens conforme 15, 16, 18 e 19, onde foram descritos os compostos majoritários. Essas diferenças ficaram perceptível nos cromatogramas, onde os picos se assemelham, com diferença nas alturas (Figura 21).

**Figura 21.** Cromatogramas dos óleos essenciais de *Baccharis retusa* D.C. das partes: a) folha masculina; b) flor masculina; c) folha feminina; d) flor feminina.



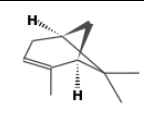
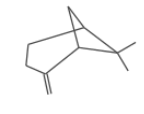
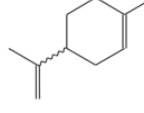
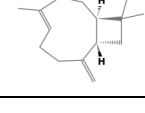
**Tabela 14.** Identificação e quantificação dos compostos identificados no óleo essencial das folhas e flores masculina de *Baccharis retusa* D.C. por cromatografia gasosa.

Componentes	Número CAS	IKE ± D <sup>1</sup> (ED#)	FLOR			FOLHA		
			IKE <sup>2</sup>	Match	AR <sup>3</sup> (%)	IKE <sup>2</sup>	Match	AR <sup>3</sup> (%)
hexanal	66-25-1	800 ± 2 (453)	-	-	-	800	864	0,1
2-hexenal	505-57-7	851 ± 5 (52)	-	-	-	846	867	0,5
(E)-3-hexen-1-ol	928-97-2	852 ± 3 (41)	-	-	-	849	881	0,6
1-hexanol	111-27-3	868 ± 4 (223)	-	-	-	863	846	0,4
3-tujeno	2867-05-2	929 ± 2 (489)	-	-	-	923	881	0,8
1R- $\alpha$ -pineno	7785-70-8	929 ± 7 (7)	930	927	53,4	930	935	31,3
canfeno	79-92-5	952 ± 2 (610)	-	-	-	945	890	0,2
sabineno	3387-41-5	974 ± 2 (619)	-	-	-	969	867	0,1
$\beta$ -pineno	127-91-3	979 ± 2 (849)	974	922	13,6	974	916	5,2
mirceno	123-35-3	991 ± 2 (841)	987	885	5,6	987	925	5,2
3-careno	13466-78-9	1011 ± 2 (336)	-	-	-	1006	874	0,2
m-cimeno*	535-77-3	1023 ± 6 (53)	-	-	-	1021	898	0,1
limoneno	138-86-3	1030 ± 2 (1005)	1026	867	9,3	1026	899	5,2
$\alpha$ -ocimeno	502-99-8	1047 ± 5 (38)	1044	856	0,9	1044	900	1,1
$\gamma$ -terpineno	99-85-4	1060 ± 3 (739)	-	-	-	1055	841	0,2
terpinoleno	586-62-9	1088 ± 2 (607)	-	-	-	1082	856	0,1
linalool	78-70-6	1099 ± 2 (976)	-	-	-	1098	859	0,2
$\alpha$ -terpineol	98-55-5	1189 ± 2 (811)	-	-	-	1191	890	0,1
copaeno	3856-25-5	1376 ± 2 (698)	-	-	-	1372	889	0,6
$\beta$ -damascenona	23726-93-4	1386 ± 5 (187)	-	-	-	1375	761	0,1
$\beta$ -cariofileno	87-44-5	1419 ± 3 (983)	1415	866	6,8	1415	926	12,5
aromandendreno	489-39-4	1440 ± 1 (5)	-	-	-	1434	883	0,2
$\alpha$ -humuleno	6753-98-6	1454 ± 3 (792)	-	-	-	1450	894	0,5
alloaromadendreno	25246-27-9	1461 ± 2 (343)	-	-	-	1455	850	0,2
$\gamma$ -muuroleno	30021-74-0	1477 ± 3 (392)	-	-	-	1471	885	0,4
Germacreno D	23986-74-5	1481 ± 3 (690)	1476	803	3,5	1477	721	14,0
$\beta$ -eudesmeno	17066-67-0	1486 ± 3 (349)	-	-	-	1484	875	0,2
ledeno	21747-46-6	1493 ± 4 (114)	-	-	-	1487	835	0,3
biciclogermacreno	24703-35-3	1495 ± 4 (368)	1491	810	3,8	1491	902	7,8
$\alpha$ -muuroleno	10208-80-7	1499 ± 3 (427)	-	-	-	1495	870	0,5
$\gamma$ -cadineno	39029-41-9	1513 ± 2 (485)	-	-	-	1508	853	0,3
$\beta$ -cadineno	523-47-7	1518 ± 10 (30)	1514	770	0,7	1514	883	2,1

espatulenol	6750-60-3	1576 ± 2 (539)	1571	788	1,3	1571	846	2,5
globulol	489-41-8	1580 ± N/A (1)	1580	768	0,6	1580	861	0,5
viridiflorol	552-02-3	1591 ± 2 (198)	-	-	-	1588	779	0,2
$\alpha$ -epi-cadinol	5937-11-1	1640 ± 2 (241)	-	-	-	1637	833	0,7
$\delta$ -cadinol	19435-97-3	1645 ± 2 (220)	-	-	-	1641	785	0,2
					IP <sup>4</sup> (%):	99,5	IP <sup>4</sup> (%):	96,2

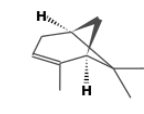
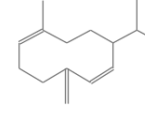
**Legenda:** RKI ± D<sup>1</sup> (ED#): Referência média do Índice de Kovats e desvio padrão seguido pelo número de registros de dados entre parênteses. EKI<sup>2</sup>: Índice de Kovats Experimental; Abundância relativa<sup>3</sup>; IP<sup>4</sup> (%): Picos identificados.

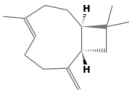
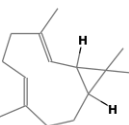
**Tabela 15.** Compostos químicos identificados no óleo essencial de flor masculina da espécie *Baccharis retusa* D.C.

Nº	COMPOSTOS MAJORITÁRIOS	NÚMERO CAS	CLASSIFICAÇÃO QUÍMICA	FÓRMULA MOLECULAR	ESTRUTURA QUÍMICA
1	1R- $\alpha$ -pineno	7785-70-8	MONOTERPENO	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	
2	$\beta$ -pineno	127-91-3	MONOTERPENO	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	
3	limoneno	138-86-3	MONOTERPENO	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	
4	$\beta$ -cariofileno	87-44-5	SESQUITERPENO	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	

**Fonte:** Baseado em dados já publicados Pubchem, 2022 e NIST, 2022<sup>120,121</sup>.

**Tabela 16.** Compostos químicos identificados no óleo essencial de folha masculina espécie *Baccharis retusa* D.C.

Nº	COMPOSTOS MAJORITÁRIOS	NÚMERO CAS	CLASSIFICAÇÃO QUÍMICA	FÓRMULA MOLECULAR	ESTRUTURA QUÍMICA
1	1R- $\alpha$ -Pineno	7785-70-8	MONOTERPENO	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	
2	Germacreno D	23986-74-5	SESQUITERPENO	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	

3	$\beta$ -cariofileno	87-44-5	SESQUITERPENO	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	
4	Biciclogermacreno	24703-35-3	SESQUITERPENO	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	

Fonte: Baseado em dados já publicados Pubchem, 2022 e NIST, 2022<sup>120,121</sup>.

Algumas semelhanças entre os compostos identificados foram observadas nos óleos essenciais das flores e folhas feminina. Os monoterpenos alifáticos tiveram maior representação em porcentagem entre as flores - 72,6% (1R- $\alpha$ -pineno, canfeno,  $\beta$ -pineno, mirceno, 3-careno, limoneno,  $\alpha$ -ocimeno,  $\gamma$ -terpineno e terpinoleno); e nas flores femininas, com 47,1% (1R- $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mirceno, limoneno e  $\alpha$ -ocimeno). No óleo essencial de flores femininas foram encontrados em grande porcentagem sesquiterpenos alifáticos (43,5%) copaeno,  $\beta$ -elemeno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\gamma$ -muurolene, germacrene D,  $\beta$ -guaiano,  $\beta$ -cyclogermacren,  $\alpha$ -muurolene e  $\beta$ -cadineno).

No óleo essencial de flores masculinas foram identificados 82,8% como monoterpenos alifáticos (1R- $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mirceno, limoneno e  $\alpha$ -ocimeno) e 14,8 como sesquiterpenos alifáticos ( $\beta$ -cariofileno, germacrene D,  $\beta$ -ciclogermacreno e  $\beta$ -cadineno). No caso do OE de folhas masculinas, monoterpenos e sesquiterpenos alifáticos foram predominantes. As folhas masculinas com 49,7% para monoterpenos alifáticos representados por 3-tujeno, 1R- $\alpha$ -pineno, canfeno, sabineno,  $\beta$ -pineno, mirceno, 3-careno, m-cimeno, limoneno,  $\alpha$ -ocimeno,  $\gamma$ -terpineno, terpinolene) e 39% para os sesquiterpenos alifáticos ( $\beta$ -cariofileno, aromandendreno,  $\alpha$ -humuleno, alloaromandendreno,  $\gamma$ -muuroleno, germacrene D,  $\beta$ -eudesmeno, ledeno,  $\alpha$ -muuroleno,  $\gamma$ -cadineno e  $\beta$ -cadineno).

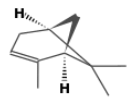
**Tabela 17.** Identificação e quantificação dos compostos identificados no óleo essencial das folhas e flores feminina de *Baccharis retusa* D.C. por cromatografia gasosa.

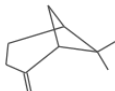
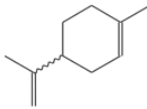
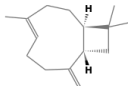
Componentes	Número CAS	IKE $\pm$ D <sup>1</sup> (ED#)	FLOR			FOLHA		
			IKE <sup>2</sup>	Match	AR <sup>3</sup> (%)	IKE <sup>2</sup>	Match	AR <sup>3</sup> (%)
1R- $\alpha$ -pineno	7785-70-8	929 $\pm$ 7 (7)	930	920	39,7	929	908	36,6
canfeno	79-92-5	952 $\pm$ 2 (610)	945	851	0,1	-	-	-
$\beta$ -pineno	127-91-3	979 $\pm$ 2 (849)	973	918	15,3	974	895	4,4

mirreno	123-35-3	991 ± 2 (841)	987	892	5,3	987	837	1,5
3-careno	13466-78-9	1011 ± 2 (336)	1006	849	0,3	-	-	-
limoneno	138-86-3	1030 ± 2 (1005)	1026	885	9,9	1026	850	4,0
α-ocimeno	502-99-8	1047 ± 5 (38)	1044	879	1,7	1044	841	0,6
γ-terpineno	99-85-4	1060 ± 3 (739)	1055	812	0,2	-	-	-
terpinoleno	586-62-9	1088 ± 2 (607)	1083	826	0,1	-	-	-
linalool	78-70-6	1099 ± 2 (976)	1098	855	0,3	-	-	-
α-terpineol	98-55-5	1189 ± 2 (811)	1192	847	0,2	-	-	-
copaeno	3856-25-5	1376 ± 2 (698)	1372	770	0,2	1372	799	0,5
β-elemeno	515-13-9	1391 ± 2 (521)	-	-	-	1386	832	0,4
β-cariofileno	87-44-5	1419 ± 3 (983)	1415	894	9,0	1415	883	16,4
aromandendreno	489-39-4	1440 ± 1 (5)	1434	793	0,2	-	-	-
α-humuleno	6753-98-6	1454 ± 3 (792)	1451	833	0,2	1451	809	0,4
γ-muuroloeno	30021-74-0	1477 ± 3 (392)	1471	790	0,3	1471	772	0,5
germacreno D	23986-74-5	1481 ± 3 (690)	1476	829	5,0	1476	835	14,6
β-eudesmeno	17066-67-0	1486 ± 3 (349)	1484	776	0,1	-	-	-
β-guaieno	88-84-6	1490 ± 3 (69)	1487	762	0,3	1487	640	0,4
biciclogermacreno	24703-35-3	1495 ± 4 (368)	1491	856	3,3	1491	845	7,5
α-muuroloeno	10208-80-7	1499 ± 3 (427)	1495	805	0,3	1495	799	0,7
β-cadineno	523-47-7	1518 ± 10 (30)	1515	813	1,1	1514	820	2,1
espatulenol	6750-60-3	1576 ± 2 (539)	1571	824	3,2	1571	808	4,9
globulol	489-41-8	1580 ± N/A (1)	1580	814	0,6	1580	777	1,1
viridiflorol	552-02-3	1591 ± 2 (198)	1589	745	0,2	1588	728	0,4
α-epi-cadinol	5937-11-1	1640 ± 2 (241)	1639	795	0,6	1638	758	1,0
δ-cadinol	19435-97-3	1645 ± 2 (220)	-	-	-	-	-	-
<b>IP<sup>4</sup> (%):</b>					<b>98,9</b>	<b>IP<sup>4</sup> (%):</b>	<b>98,0</b>	

**Legenda:** RKI ± D<sup>1</sup> (ED#): Referência média do Índice de Kovats e desvio padrão seguido pelo número de registros de dados entre parênteses. EKI<sup>2</sup>: Índice de Kovats Experimental; Abundância relativa<sup>3</sup>; IP<sup>4</sup> (%): Picos identificados.

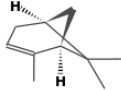
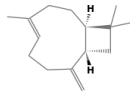
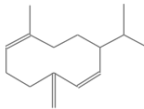
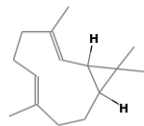
**Tabela 18.** Compostos químicos identificados, no óleo essencial de flor feminina de *Baccharis retusa* D.C.

Nº	COMPOSTOS MAJORITÁRIOS	NÚMERO CAS	CLASSIFICAÇÃO QUÍMICA	FÓRMULA MOLECULAR	ESTRUTURA QUÍMICA
1	1R-α-pineno	7785-70-8	MONOTERPENO	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	

2	$\beta$ -pineno	127-91-3	MONOTERPENO	$C_{10}H_{16}$	
3	limoneno	138-86-3	MONOTERPENO	$C_{10}H_{16}$	
4	$\beta$ -cariofileno	87-44-5	SESQUITERPENO	$C_{15}H_{24}$	

Fonte: Baseado em dados já publicados Pubchem, 2022 e NIST, 2022<sup>120,121</sup>.

**Tabela 19.** Compostos químicos identificados, no óleo essencial de folha feminina espécie *Baccharis retusa* D.C.

Nº	COMPOSTOS MAJORITÁRIOS	NÚMERO CAS	CLASSIFICAÇÃO QUÍMICA	FÓRMULA MOLECULAR	ESTRUTURA QUÍMICA
1	1R- $\alpha$ -pineno	7785-70-8	MONOTERPENO	$C_{10}H_{16}$	
2	$\beta$ -cariofileno	87-44-5	SESQUITERPENO	$C_{15}H_{24}$	
3	germacrene d	23986-74-5	SESQUITERPENO	$C_{15}H_{24}$	
4	biciclogermacreno	24703-35-3	SESQUITERPENO	$C_{15}H_{24}$	

Fonte: Baseado em dados já publicados Pubchem, 2022 e NIST, 2022<sup>120,121</sup>.

### 5.3 ATIVIDADE LARVICIDA

Os nove óleos essenciais obtidos das seis diferentes espécies diferiram no que diz respeito aos seus efeitos larvicidas contra larvas de *Ae. aegypti*. Apenas dois óleos (*A. zerumbet* e *E. langsdorffii*) demonstraram atividade larvicida contra a espécie testada conforme Tabelas 20 e 21, as tabelas demonstram que não houve diferença significativa entre os óleos essenciais das espécies 1 e 2, resultado testado pelo teste Scott Knott. A mortalidade em 24h se aproximou de 99% e em 48h chegou a 100%. De acordo com o

screening realizado, o OE das duas espécies que demonstraram maior potencial larvicida foram selecionados para realizar os testes posteriores em diferentes concentrações.

**Tabela 20.** Mortalidade, média e desvio padrão de larvas de *Aedes aegypti* em 24h.

Nº	Óleo essencial	n	Mortalidade absoluta (%)	X±DP
1	<i>A. zerumbet</i> (folha)	83	82 (98,95) a	20,5 ± 1,73
2	<i>E. langsdorffii</i> (folha)	78	77 (98,75) a	19,25 ± 0,5
3	<i>B. retusa</i> (flor ♀)	81	44 (54,22) b	11 ± 1,82
4	<i>B. retusa</i> (folha ♂)	83	25 (30,15) c	6,75 ± 0,95
5	<i>M.urundeuva</i> (folha)	81	22 (26,73) c	5,5 ± 3,41
6	<i>B. retusa</i> (flor ♂)	86	13 (14,9) d	3,25 ± 1,70
7	<i>B. salicifolius</i> (folha)	85	8 (9,16) d	2 ± 1,41
8	<i>C.densiflorus</i> (folha)	77	6 (7,62) d	1,5 ± 1
9	<i>B. retusa</i> (folha ♀)	86	0 (0) e	0 ± 0

**Legenda:** n: número de larvas expostas, X ± DP: média ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

**Tabela 21.** Mortalidade, média e desvio padrão de larvas de *Aedes aegypti* em 48h.

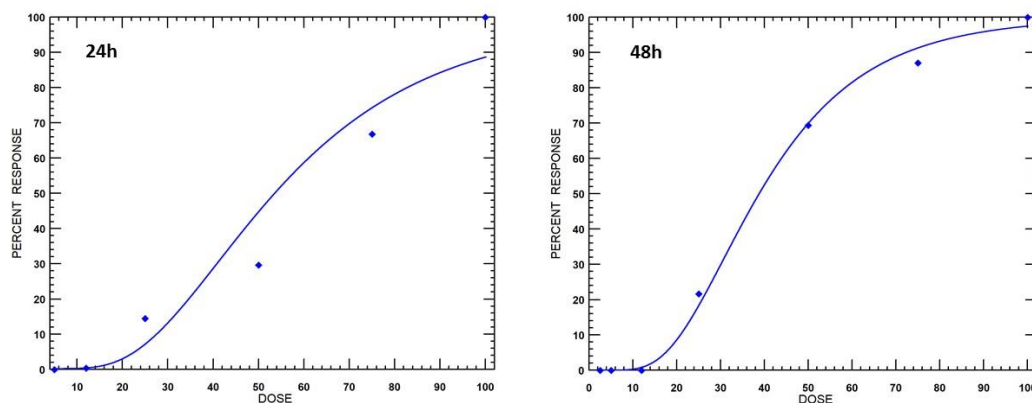
Nº	Óleo essencial	n	Mortalidade absoluta (%)	X±DP
1	<i>A. zerumbet</i> (folha)	83	83 (100) a	20,75 ± 2,21
2	<i>E. langsdorffii</i> (folha)	78	78 (100) a	19,50 ± 0,57
3	<i>B. retusa</i> (flor ♀)	81	46 (56,73) b	11,5 ± 1,91
4	<i>M.urundeuva</i> (folha)	81	29 (35,24) c	7,25 ± 4,85
5	<i>B. retusa</i> (folha ♂)	83	27 (32,53) c	6,75 ± 0,5
6	<i>C.densiflorus</i> (folha)	77	18 (23,14) d	4,50 ± 3,87
7	<i>B. retusa</i> (flor ♂)	86	16 (18,28) d	4,00 ± 1,41
8	<i>B. salicifolius</i> (folha)	85	11 (12,74) d	2,75 ± 1,25
9	<i>B. retusa</i> (folha ♀)	86	1 (1,13) e	0,25 ± 0,5

**Legenda:** n: número de larvas expostas, X ± DP: média ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

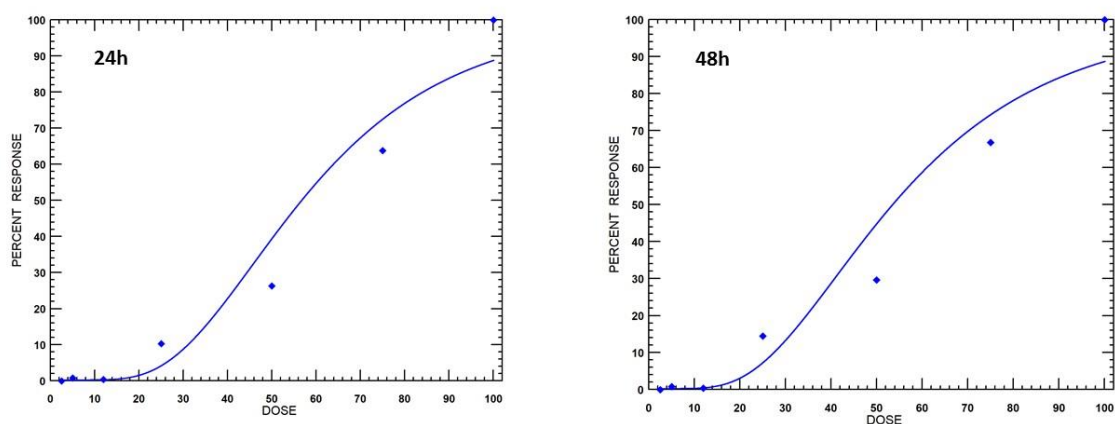
Para *B. retusa* (folha ♀), o screening realizado não demonstrou atividade larvicida, pois nessa concentração o número de larvas mortas foi igual a 1, isso pode revelar a ineficiência desse óleo essencial para a espécie em questão. Enquanto os óleos essenciais das espécies *B. salicifolius*, *B. retusa* (flor ♂) e *C. densiflorus* obtiveram médias próximas, não demonstrando potencial relevante. Possivelmente, os óleos das espécies *B. retusa* (flor ♀), *M. urundeuva* e *B. retusa* (folha ♂) necessitariam de doses maiores para apresentarem maiores letalidades. Na concentração testada, *B. retusa* (flor ♀) causou um pouco mais da metade de mortes 54,22%.

As espécies que promoveram mortalidade de 100% no *screening* com concentração de 100 mg/L foram de *A. zerumbet* e *E. langsdorffii*. As atividades larvicidas dessas duas espécies vegetais foram testadas em sete diferentes concentrações entre 2,5 a 100 mg/L. Na figura 28 é possível identificar a curva de toxicidade dos dois OEs selecionados, em que as doses letais são dependentes da concentração. Os valores das CL<sub>50</sub>, CL<sub>90</sub> e CL<sub>95</sub> dos dois OEs selecionados são mostrados na Tabela 23 e 24, em duas diferentes leituras 24h e 48h e a mortalidade dose dependente demonstrada nas Figuras 28 e 29.

**Figura 22.** Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (Pers.) na mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* após 24h e 48h, em relação à média de mortalidade e concentrações utilizadas.



**Figura 23.** Efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *Eugenia langsdorffii* O. Berg. na mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* após 24h e 48h, em relação à média de mortalidade e concentrações utilizadas.



Observou-se que as duas espécies demonstraram potenciais ativos larvicidas contra larvas de *Ae. aegypti* após 24 e/ou 48h apresentando toxicidade dependente de dose. Assim, o óleo essencial de *A. zerumbet* frente larvas do 3º e 4º estágio apresentou  $CL_{50} = 38,69$  mg/L;  $CL_{90} = 72,2$  mg/L e  $CL_{95} = 86,17$  mg/L. Para a espécie *E. langsdorffii*  $CL_{50} = 56,74$  mg/L;  $CL_{90} = 103,34$  mg/L e  $CL_{95} = 122,49$  mg/L para 24h. As concentrações letais encontradas para *A. zerumbet* foram ( $CL_{50} = 36,644$  mg/L;  $CL_{90} = 66,318$  mg/L  $CL_{95} = 78,4$  mg/L), e para *E. langsdorffii* ( $CL_{50} = 53,522$  mg/L;  $CL_{90} = 103,932$  mg/L  $CL_{95} = 125,4$  mg/L) para 48h.

É importante destacar que as larvas que permaneceram vivas após 24h não continuaram completamente ativas, se mostraram lentas quando expostas à luz direcionada, diferente das larvas do controle que se mantiveram ágeis e ativa.

**Tabela 22.** Concentrações letais dos óleos essenciais de *A. zerumbet* e *E. langsdorffii* em 24h contra larvas de *Aedes aegypti*.

Óleo Essencial	n	$CL_{50}$ (IC 95%)	$CL_{90}$ (IC 95%)	$CL_{95}$ (IC 95%)	Inclinação $\pm$ DP
<i>A. zerumbet</i>	1687	38.69 (34.1 – 43.3)	72.2 (63.0 – 86.7)	86.17 (73.64 – 107.4)	4.730 $\pm$ 0,223
<i>E. langsdorffii</i>	1681	56.74 (40.3 – 75.2)	103.34 (77.29 – 254.71)	122.49 (87.55 – 382.17)	4.922 $\pm$ 0,277

**Legenda:** n: número de larvas expostas, CL: Concentração letal, IC: Intervalo de confiança.

**Tabela 23.** Concentrações letais dos óleos essenciais de *A. zerumbet* e *E. langsdorffii* em 48h contra larvas de *Aedes aegypti*.

Óleo Essencial	n	$CL_{50}$ (IC 95%)	$CL_{90}$ (IC 95%)	$CL_{95}$ (IC 95%)	Inclinação $\pm$ DP
<i>A. zerumbet</i>	1687	36.6 (30.8 – 42.5)	66.3 (55.9 – 85.2)	78.4 (64.6 – 106.3)	4.979 $\pm$ 0,237
<i>E. langsdorffii</i>	1681	53.5 (33.7 – 78)	103.9 (72.9 – 399.9)	125.4 (83.6 – 690.8)	4.447 $\pm$ 0,240

**Legenda:** n: número de larvas expostas, CL: Concentração letal, IC: Intervalo de confiança.

Este é o primeiro relato de OE dessas espécies contra larvas do mosquito *Ae. aegypti*. E as duas que apresentaram maior atividade larvicida estão entre as três espécies com maior rendimento em óleo essencial.

O OE com maior potencial larvicida foi *A. zerumbet*. *E. langsdorffii* e *A. zerumbet* apresentaram predominância de monoterpenos alifáticos e sesquiterpenos oxigenados.

Porém, vale uma investigação mais aprofundada dos principais constituintes desses OE e suas características. Apesar dos componentes químicos do OEs terem sido analisados neste estudo, se faz necessário avaliar a atividade dos compostos puros, bem como determinar o mecanismo de ação dos OE e seus compostos.

O Controle negativo com água e água/DMSO não promoveu mortalidade significativa, não chegando a 10%, por isso não foi necessário corrigir a mortalidade, pois a mortalidade dos grupos controle não ultrapassou o limite descrito no protocolo da OMS<sup>87</sup>. Esse resultado confirma a atividade larvicida das espécies testadas, excluindo a possibilidade de o DMSO causar toxicidade contra as larvas.

#### 5.4 ATIVIDADE LARVICIDA DE BTI

6. Todas as larvas expostas ao controle positivo apresentaram mortalidade de 100% após leitura de 24h de exposição.

## 6. DISCUSSÃO

Zoghbi et al.<sup>96</sup>, identificaram como principais constituintes no óleo da folha de *Alpinia speciosa* K. Schum. (sinonímia de *A. zerumbet*) - limoneno (25,1%), terpinen-4-ol (22,7%) e  $\gamma$ -terpineno (17,4%); e no óleo da flor 1,8-cineol (23,1%), terpinen-4-ol (20,4%), sabineno (14,5%) e  $\gamma$ -terpineno (8,8%), compostos também identificados nesse estudo, mas em diferentes concentrações.

Um estudo no Japão analisou duas variedades da espécie *Alpinia zerumbet* (tairin e shima) e encontrou os principais compostos para uma das variações:  $\gamma$ -terpineno (14,5%), cineol (13,8%), p-cimeno (13,5%), sabineno (12,5%), terpinen-4-ol (11,9%), óxido de cariofileno (4,96 %), cinamato de metila (4,24%), cariofileno (2,4%) e  $\gamma$ -terpineol (1,28%). E também cineol (37,8%),  $\beta$ -linalol (17,1%), óxido de cariofileno (10,4%), cinamato de metila (6,34%), benzilacetona (4,21%) e  $\alpha$ -terpineol (3,36%) para a segunda variação analisada<sup>97</sup>. Compostos como o cinamato de metila, cineol, óxido de cariofileno para a primeira variação não foram encontrados e para a segunda variação somente  $\alpha$ -terpineol.

Em estudos anteriores, o teor de óleo essencial obtido de matéria fresca de *E. langsdorffii* a partir das folhas foi de 0,05 %<sup>73</sup>. *B. salicifolius* (Kunth) O. Berg obteve rendimento de 1,2% - com material seco<sup>98</sup> e de 2,29% para folhas frescas<sup>99</sup>. Uma pesquisa realizada com plantas do cerrado demonstrou um rendimento para *B. salicifolius* de 0,12%<sup>100</sup>. Para *A. zerumbet*, obteve um teor de 0,12% por hidrodestilação de folhas frescas e 0,35% de folhas secas<sup>101</sup>, porém o óleo essencial obtido de folhas secas obteve um teor de aproximadamente 0,74% em outro estudo<sup>102</sup>. O óleo essencial das folhas de *C. densiflorus* teve rendimento de 0,22% de folhas frescas<sup>103</sup>, e de aproximadamente 0,09% a partir de folhas secas<sup>104</sup>.

Para *M. urundeuva* o rendimento foi de (0,02%), calculado a partir do peso fresco dos materiais vegetais<sup>105</sup>, e 0,13% comparados com o mesmo horário de coleta 9h<sup>106</sup>.

O teor de óleo essencial varia com a espécie, fatores ambientais, manejo, método de extração e o tipo de material: fresco ou seco<sup>107</sup>.

Os resultados encontrados na literatura utilizaram tanto a razão entre a massa fresca e a quantidade de óleo obtido, como a razão entre a massa seca da planta e o óleo. Logo deve-se considerar que foram utilizadas metodologias diferentes de extração em cada estudo e de acordo com fatores como cultivo, umidade, temperatura, clima,

altitude, há possibilidade de alteração do rendimento, o que justifica as diferenças observadas.

Para a espécie *A. zerumbet*, os compostos encontrados no óleo foram idênticos aos encontrados em estudo anterior, porém a análise foi realizada com o óleo essencial das flores, o único composto diferente foi o Espatuleno<sup>108</sup>. Estudo recente analisou a composição do óleo essencial de diferentes espécies e encontrou os mesmos compostos majoritários para essa espécie diferindo a abundância (22,1% de 4-terpineol, 17,5% de 1,8-cineol, 11,5% de sabinense e 10,9% de Y-Terpineno)<sup>109</sup>. Em 2004, o óleo essencial de *A. zerumbet* foi testada contra larvas de *Ae. aegypti*, mas não obteve boa atividade larvicida entre os óleos essenciais testados (CL<sub>50</sub> 313 µg/mL), mesmo a composição química encontrada teve grande semelhança à encontrada nesse estudo (17,9% de 1-8-cineole, 17,8% de 4-terpineol, 14,5% de Y-Terpineno e 12,9% de p-cimene e 9,2% de sabinene)<sup>110</sup>.

Diferentes compostos majoritários foram encontrados para a espécie *B. salicifolius*, 1,8-cineol (38.5%), limoneno (13.1%) em estudo realizado na Argentina<sup>98</sup>. Um estudo brasileiro realizado em São Paulo demonstrou composição química diferente para *B. salicifolius* e os principais compostos identificados foram biciclogermacreno (17.50%), globulol (14.13%), viridiflorol (8.83%)<sup>111</sup>. Estudo recente avaliou o óleo essencial dessa espécie vegetal do cerrado contra larvas de *Ae. aegypti* e encontrou  $\gamma$ -terpineno (17.1%) em maior concentração em *B. salicifolius*, seguido por  $\beta$ -cariofileno (11.4%), aromadendreno (10.3%) and  $\alpha$ -pineno (8.8%)<sup>57</sup>, resultado muito semelhante ao encontrado nesse estudo. Os mesmos 4 compostos majoritários foram identificados, porém diferindo nas porcentagens encontradas, que pode ser explicado pela sazonalidade, ou seja, a data de coleta da espécie vegetal, já que no estudo citado foi em dezembro de 2019 e nesse estudo foi em Junho e Julho de 2019.

O óleo de folha da espécie *C. densiflorus* (Steud.) Stapf apresentou semelhanças com alguns compostos identificados nesse estudo, po exemplo, trans-p-menta-2,8-dien-1-ol 22,4%, cis-p-menta-1(7),8-dien-2-ol) 11,1%, perillila alcohol 17,2 ou isocarveol, limoneno 3,9%, carveol 3,1%, mas diferenças na quantidade e presença de outros compostos<sup>112</sup>. Um estudo recente mostrou semelhanças na composição química com a presença dos compostos majoritários trans-p-menta-2,8-dien-1-ol, cis-p-menta-2,8-dien-1-ol, trans-p-menta1(7),8-dien-2-ol, cis-p-menta-1(7),8-dien-2-ol<sup>113</sup>.

Em 2012, foi a primeira vez que a composição do óleo essencial da espécie *E. langsdorffii* é relatada, e apresentou epi-longipinanol (13,6%),  $\gamma$ -eudesmol (12,3%), limoneno (11,8%) e 10-epi- $\gamma$ -eudesmol (10,6%) como constituintes principais, neste estudo, o composto majoritário encontrado também foi o limoneno 15,5%, porém vários compostos diferentes foram identificados<sup>73</sup>.

O composto majoritário da espécie *M. urundeuva* Allemão, relatado em estudo anterior, também foi o  $\delta$ -3-careno (80,41%). Este óleo apresentou maior teor de terpinoleno do que de  $\alpha$ -limoneno, contrário ao que foi encontrado neste estudo<sup>114</sup>.

O óleo essencial da *B. retusa* foi relatado apenas uma vez em 1971, mas os dados sobre os principais compostos não estão disponíveis<sup>115</sup>. No presente estudo, quatro análises diferentes foram realizadas para *B. retusa*. O óleo essencial das folhas masculinas teve  $\alpha$ -pineno (31,3%), cariofileno (12,5%), germacreno D (14%) e biciclogermacreno (7,8%) como componentes principais. Em comparação, as flores masculinas apresentaram  $\alpha$ -pineno (53,4%),  $\beta$ -pineno (13,6%), limoneno (9,3%) e cariofileno (6,8%). Nas folhas femininas  $\alpha$ -pineno (36,6%), cariofileno (16,4%), germacreno D (14,6%) e biciclogermacreno (7,5%) foram encontrados em concentrações semelhantes às folhas masculinas, enquanto as flores femininas apresentaram  $\alpha$ -pineno (39,7%),  $\beta$ -pineno (15,3%), limoneno (9,9%) e cariofileno (9%).

Os resultados encontrados nos testes larvicidas demonstraram duas espécies com grande potencial, *A. zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm. e *E. langsdorffii* O. Berg.

O óleo essencial da espécie *A. zerumbet* foi testado contra *Ctenocephalides felis felis* (pulga de gato) adultas e estágios imaturos. Para larvas da pulga foi encontrada CL<sub>50</sub> igual a 7,29<sup>109</sup>.

Cavalcanti et al.<sup>110</sup> observaram a atividade larvicida de eugenol e 1,8-cineol da espécie *Ocimum gratissimum* contra *Ae. aegypti* (CL<sub>50</sub> = 60  $\mu$ g/mL).

Atividade larvicida moderada foi observada para o composto eucaliptol (1,8-cineol) com valor de CL<sub>50</sub> de 181,33  $\mu$ g/mL em 24 h contra os estágios larvais de *Ae. aegypti*<sup>116</sup>.

Foi avaliada atividade larvicida para o composto químico  $\gamma$ -terpineno que apresentou forte atividade contra *H. armigera* - lagarta do algodão - com CL<sub>50</sub> = 150,15  $\mu$ g/mL<sup>117</sup>.

Um estudo avaliou a atividade larvicida de seis monoterpenos contra *Ae. aegypti* e encontrou CL<sub>50</sub> = 0,4  $\mu$ g/mL para  $\gamma$ -terpineno, 38,77 para 4-terpineol, 53,63 para 1,8-

cineol<sup>118</sup>. Esses compostos majoritários foram encontrados na espécie *A. zerumbet* nesse estudo.

Outro avaliou compostos larvicidas contra *Ae. aegypti*, os monoterpenos selecionado e avaliados foram: R-carvona, S-carvona, RS-carvona, R-limoneno, S-limoneno, RS-mentol,  $\gamma$ -terpineno, 3-careno. R- e S-limoneno exibiram a maior potência larvicida (CL<sub>50</sub>= 27 e 30  $\mu$ g/mL, respectivamente), seguido por  $\gamma$ -terpineno (CL<sub>50</sub> = 56 ppm) e RS-carvona (CL<sub>50</sub> =118 ppm)<sup>119</sup>.

Compostos puros foram testados por Ali et al.<sup>122</sup>, que obtiveram  $\beta$ -cariofileno (CL<sub>50</sub> = 26 ppm) o composto mais potente seguido por óxido de cariofileno (CL<sub>50</sub> = 29 ppm), que também foi semelhante ao -pineno (CL<sub>50</sub> = 35,9 ppm) contra larvas de *Ae. aegypti* 24 horas após o tratamento. Os compostos (-)- $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno apresentaram atividade larvicida semelhante.

Existem poucos estudos de *A. zerumbet* frente às larvas de *Ae. aegypti*. Um estudo avaliou a atividade larvicida do óleo essencial de *A. zerumbet* frente às larvas do mosquito e obteve 50,70 mg/mL<sup>123</sup>. Da mesma forma, um estudo anterior avaliou o potencial do óleo essencial das sementes foi demonstrado que o OE possui ação larvicida frente as larvas do mosquito *Ae. aegypti* apresentando CL<sub>50</sub> = 125 e 87 $\mu$ g/mL e CL<sub>50</sub> 64 e 32  $\mu$ g/mL das folhas<sup>124</sup>.

Um estudo com *B. salicifolius* testou o OE dessa espécie contra larvas de *Ae. aegypti* e diversos compostos isolados. *B. salicifolius* apresentou resposta positiva em todos os testes larvicida, adulticida e repelência espacial. Além disso, foram determinados valores de CL<sub>50</sub>: p-cimeno (CL<sub>50</sub> 9,5  $\mu$ g/mL); (R)-(+)-limoneno (CL<sub>50</sub> 4,6  $\mu$ g/mL); (S)-(-)-limoneno (CL<sub>50</sub> 6,5  $\mu$ g/ mL) e  $\beta$ -pineno (CL<sub>50</sub> 8,7  $\mu$ g/mL), estes apresentaram mortalidade  $\geq$  80% após 24 h de exposição na mesma concentração<sup>125</sup>. A diferença dos resultados aqui descritos pode ser explicada pela diferença na concentração da composição química encontrada: no estudo citado, foi encontrado  $\gamma$ -terpineno (17,1%) e  $\beta$ -cariofileno (11.4%) em maior quantidade e no presente trabalho, 1R- $\alpha$ -Pineno (44%), seguidos por  $\gamma$ -Terpineno (12,1%). O que condiz com os testes realizados com outras substâncias testadas por Silva et al. <sup>125</sup>, que encontraram  $\beta$ -cariofileno, óxido de cariofileno, linalol,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno e  $\alpha$ -terpineol (todos a 25  $\mu$ g/mL) apresentaram mortalidade < 10%.

Poucos estudos demonstram a relação do efeito larvicida e a composição química dos óleos essenciais, pois é difícil determinar como os óleos essenciais influenciam a

atividade das larvas do mosquito, porém alguns estudos descrevem possíveis causas e modos de ação dos OEs<sup>49</sup>.

A relação entre o efeito larvicida e a composição química dos óleos essenciais é difícil apontar, já que a combinação entre os compostos presentes em um óleo essencial pode afetar diretamente sua ação biológica. Substâncias isoladas possuem ações individuais, mas o conjunto dos compostos pode aumentar significativamente a eficácia além de evitar resistência a pragas<sup>126</sup>.

De acordo com Luz et al.<sup>50</sup>, os óleos essenciais com maior potencial larvicida são aqueles ricos em hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos monoterpênicos, o que corrobora com o presente estudo que apresentou, para a espécie *A. zerumbet*, predominância de monoterpênicos alifáticos (55,3%) e 41,3% de monoterpênicos oxigenados. Para a espécie *E. langsdorffii*, monoterpênicos alifáticos 36,5%, e sesquiterpenos oxigenados 32,9%.

A lipofilia desempenha um papel fundamental na modulação da atividade larvicida, a hidrofobicidade é fortemente correlacionada com a atividade larvicida, isso foi demonstrado em um estudo realizado em 2013 que utilizou ferramentas quimiométricas, são métodos populares para modelar permitindo a análise de grandes conjuntos de dados colineares multivariáveis. Foi realizada uma análise para investigar compostos larvicidas e estudar as relações estrutura-atividade entre a atividade larvicida e um conjunto de compostos encontrados principalmente em plantas, um total de 55 compostos com atividade contra larvas de *Ae. aegypti*<sup>127</sup>.

A inibição da acetilcolinesterase (AChE) também desempenha um papel na modulação da atividade larvicida. A acetilcolinesterase (AChE) é uma das enzimas mais essenciais da família das serina hidrolases, catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, que desempenha um papel fundamental na memória e na cognição. Um potencial eficaz de inibição de AChE de *Artemisia maderaspatana* foi encontrado em um estudo que caracterizou os componentes voláteis da espécie *A. maderaspatana* e avaliou seu potencial de inibição da acetilcolinesterase. O principal componente identificado foram  $\alpha$ -humuleno (46,3%), o papel de outros constituintes menores parece ter influência, não podendo ser desconsiderados, já que apesar de  $\alpha$ -humuleno tenha sido o principal composto identificado em *A. maderaspatana*, o estudo demonstrou que esse composto possui baixa inibição da AChE. Sendo assim, a atividade inibitória do óleo da espécie

analisada pode ser esperada do efeito da sinergia, ou seja, pela combinação de  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno, como também componentes menores<sup>128</sup>.

Luz et al.<sup>50</sup>, descreveram o modo de ação dos óleos essenciais e seus componentes correlacionando com a inibição da acetilcolinesterase (AChE) e inibição da tripsina. De acordo com o autor, a partir do momento que os óleos essenciais e componentes são absorvidos pelas larvas através da cutícula, do sifão respiratório ou ingestão, eles agem localmente ou sistemicamente causando ruptura da matriz lipoprotéica larval. Como consequência, microscopicamente pode haver paralisia ou excitação, ruptura, escurecimento ou liberação da matriz piretrófica. Além disso, as inibições enzimáticas, inibição da acetilcolinesterase ou tripsina, pode causar absorção negativa de nutrientes, comprometimento do crescimento, e indução de mortalidade.

Uma revisão realizada em 2015 avaliou as pesquisas sobre o uso de OEs como potenciais larvicidas com base em sua composição química e eficácia biológica e 122 espécies de plantas de 26 famílias atenderam aos critérios do estudo. Do total (68,8%) eram de 5 famílias: Lamiaceae (19,7%), Cupressaceae (14,7%), Rutaceae (12,3%), Apiaceae (11,5%) e Myrtaceae (10,6%) e curiosamente algumas substâncias ocorrem repetidamente em várias espécies de plantas da mesma família, portanto, podem ser consideradas típicas para essas famílias. São elas: Lamiaceae: 1,8-Cineole, thymol, p-cymene; Cupressaceae:  $\alpha$ -pineno,  $\delta$ -3-careno, sabineno, limoneno; Rutaceae: limoneno,  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno; Apiaceae: limoneno,  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno, sabineno, trans-anetol e Myrtaceae: 1,8-cineol; p-cimeno<sup>49</sup>.

As duas espécies nesse estudo que tiveram potencial larvicida, *A. zerumbet* e *E. langsdorffii* pertencem as famílias Zingiberaceae e Myrtaceae, respectivamente. Os componentes majoritários identificados de *A. zerumbet* apesar de não ser uma espécie que se encaixa dentro das principais famílias avaliadas na revisão, 1,8-cineol (22,6%) e sabineno (21%) estão dentro da lista dos compostos repetidos nas famílias que tiveram potencial larvicida. Em *E. langsdorffii* foram  $\alpha$ -limoneno (15,5%) e  $\delta$ -cadinol (10,6%), sendo que limoneno encontra-se na lista. Possivelmente, os compostos majoritários citados são os principais responsáveis pela ação larvicida avaliada nesse estudo.

## 7. CONCLUSÃO

A atividade larvicida dos OE foi avaliada e investigada neste estudo. Os óleos essenciais obtidos das seis diferentes espécies diferiram quanto aos seus efeitos larvicidas sobre *Ae. aegypti*. Dois óleos (*A. zerumbet* e *E. langsdorffii*) apresentaram alta atividade larvicida contra *Ae. aegypti*. *E. langsdorffii* teve predominância de monoterpenos alifáticos e sesquiterpenos oxigenados. No entanto, os principais constituintes desses OE são característicos e merecem uma investigação mais aprofundada. *A. zerumbet* também teve predominância de monoterpenos alifáticos e monoterpenos oxigenados. Este é o primeiro relato de OE dessas espécies contra larvas do mosquito *Ae. aegypti*. O OE mais potente foi *A. zerumbet*. As concentrações letais encontradas para *A. zerumbet* foram ( $CL_{50} = 36,644$  mg/L;  $CL_{90} = 66,318$  mg/L), e para *E. langsdorffii* ( $CL_{50} = 53,522$  mg/L;  $CL_{90} = 103,932$  mg/L). Embora os componentes químicos do OE tenham sido analisados neste estudo, os componentes ativos ainda precisam ser identificados, além do modo de ação que precisa ser esclarecido. Dentre as três espécies que apresentaram os maiores rendimentos de OE, essas duas apresentaram a maior atividade larvicida.

*A. zerumbet* e *E. langsdorffii* apresentaram alta atividade larvicida contra *Ae. aegypti*. Bioensaios de campo com *A. zerumbet* e *E. langsdorffii* devem ser realizados para analisar a resposta de mortalidade de *Ae. aegypti*.

Assim, o modo exato de ação e alvo dos OE das espécies testadas neste estudo e seus principais componentes químicos precisam de mais experimentos para revelar e confirmar a atividade larvicida. Esses resultados são promissores para desenvolvimento de novos produtos biodegradáveis de plantas do bioma Cerrado, estratégia sustentável e potencial para controlar mosquito vetor *Ae. aegypti* e, portanto, da dengue, Zika, Chikungunya e Febre Amarela.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Paixão ES, Teixeira MG, Rodrigues LC. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. *BMJ Global Health*. 2017;3(1):e000530. doi: 10.1136/bmjgh-2017-000530
2. World Health Organization Dengue and severe dengue. [online]. 29 set 2019. Available from: <https://www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/dengue-and-severe-dengue/> [Accessed 02 July 2022]
3. Prophiro JS. Arboviroses e mudanças climáticas. *Gestão & Sustentabilidade Ambiental* [online]. 14 mar 2022 [Accessed 5 July 2022];11(1):1-2. Available from: [https://portaldeperiodicos.animaeducacao.com.br/index.php/gestao\\_ambiental/articloe/view/12605](https://portaldeperiodicos.animaeducacao.com.br/index.php/gestao_ambiental/articloe/view/12605)
4. Leff, Enrique. Saber ambiental; sustentabilidade, racionalidade, complexidade, poder Petrópolis, RJ vozes, 2001. 343 p.
5. Pörtner HO, Roberts DC, Adams H, Adler C, Aldunce P, Ali E et al. *Climate change 2022: impacts, adaptation and vulnerability*. Netherlands: IPCC, 2022. 3675 p.
6. Halstead S, O'Rourke E. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *Journal of Experimental Medicine*. 1 July 1977;146(1):201-17. doi: 10.1084/jem.146.1.201
7. Beckham JD, Tyler KL. Arbovirus infections. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*. Dez 2015;21:1599-611. doi: 10.1212/con.0000000000000240
8. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. Apr 2013;496(7446):504-7. doi: 10.1038/nature12060
9. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. Genetic and serologic properties of zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*. Ago 2008;14(8):1232-9. doi: 10.3201/eid1408.080287
10. Krishna Mr, Reddy Mk, Reddy Sr. Chikungunya outbreaks in Andhra Pradesh, South India [9]. *Current Science*. Set 2006;91(5):570-1.
11. World Health Organization. Guidelines on clinical management of chikungunya fever. [online]. WHO Regional Office for South-East Asia. 2008. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/205178> / [Accessed 02 Jun 2022].
12. World Health Organization [online]. Chikungunya. c2022a. Available from: <https://www.who.int/health-topics/chikungunya> [Accessed 05 Jun 2022].
13. World Health Organization. Zika virus disease. [online]. c2022b. Available from: <https://www.who.int/health-topics/zika-virus-disease> [Accessed 02 Jun 2022].
14. World Health Organization. Zika epidemiology update - July 2019. [online]. 30 Jun 2019. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/zika-epidemiology-update> [Accessed 05 Jun 2022].
15. World Health Organization. Yellow fever virus disease. [online]. c2022c. Available from: <https://www.who.int/health-topics/yellow-fever> [Accessed 02 Jun 2022].
16. Shearer FM, Longbottom J, Browne AJ, Pigott DM, Brady OJ, Kraemer MU, Marinho F, Yactayo S, de Araújo VE, da Nóbrega AA, Fullman N, Ray SE, Mosser JF, Stanaway JD, Lim SS, Reiner RC, Moyes CL, Hay SI, Golding N. Existing and

- potential infection risk zones of yellow fever worldwide: a modelling analysis. *The Lancet Global Health*. Mar 2018;6(3):e270-e278. doi: 10.1016/s2214-109x(18)30024-x
17. Schrauf S, Tschismarov R, Tauber E, Ramsauer K. Current efforts in the development of vaccines for the prevention of zika and chikungunya virus infections. *Frontiers in Immunology*. 9 abr 2020;11. doi: 10.3389/fimmu.2020.00592
  18. Ferguson NM, Rodríguez-Barraquer I, Dorigatti I, Mier-y-Teran-Romero L, Laydon DJ, Cummings DA. Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur dengue vaccine: modeling optimal deployment. *Science*. 1 set 2016;353(6303):1033-6. doi: 10.1126/science.aaf9590
  19. Silva JV, Lopes TR, Oliveira-Filho EF, Oliveira RA, Durães-Carvalho R, Gil LH. Current status, challenges and perspectives in the development of vaccines against yellow fever, dengue, Zika and chikungunya viruses. *Acta Tropica*. Jun 2018;182:257-63. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.03.009
  20. Cheng G, Liu Y, Wang P, Xiao X. Mosquito defense strategies against viral infection. *Trends in Parasitology*. Mar 2016;32(3):177-86. doi: 10.1016/j.pt.2015.09.009
  21. Hopp, M.J., Foley, J.A. Global-Scale Relationships between Climate and the Dengue Fever Vector, *Aedes Aegypti*. *Climatic Change*. 2001;48, 441–463. doi: 10.1023/A:1010717502442
  22. Eisen L, Monaghan AJ, Lozano-Fuentes S, Steinhoff DF, Hayden MH, Bieringer PE. The Impact of Temperature on the Bionomics of *Aedes*(*Stegomyia*) *aegypti*, With Special Reference to the Cool Geographic Range Margins. *Journal of Medical Entomology*. 1 maio 2014;51(3):496-516. doi: 10.1603/me13214
  23. Beserra EB, Fernandes CR, Silva SA, Silva LA, Santos JW. Efeitos da temperatura no ciclo de vida, exigências térmicas e estimativas do número de gerações anuais de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Iheringia. Série Zoologia*. Jun 2009;99(2):142-8. doi: 10.1590/s0073-47212009000200004
  24. Costa EA, Santos EM, Correia JC, Albuquerque CM. Impact of small variations in temperature and humidity on the reproductive activity and survival of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*. 2010;54(3):488-93. doi: 10.1590/s0085-56262010000300021
  25. Wu P, Yu X, Wang P, Cheng G. Arbovirus lifecycle in mosquito: acquisition, propagation and transmission. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2019;21. doi: 10.1017/erm.2018.6
  26. Nelson JM. *Aedes aegypti: Biologia y Ecologia*. Organizacion Panamericana de la Salud. Washington, DC. September, 1986.
  27. Silva HH, Silva IG. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Ago 1999.32(4):349-55. doi: 10.1590/s0037-86821999000400003
  28. Kean J, Rainey S, McFarlane M, Donald C, Schnettler E, Kohl A, Pondeville E. Fighting Arbovirus Transmission: Natural and Engineered Control of Vector Competence in *Aedes* Mosquitoes. *Insects*. 23 mar 2015;6(1):236-78. doi: 10.3390/insects6010236
  29. Rueda LM. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue Virus Transmission. *Zootaxa*. 3 ago 2004;589(1):1. doi: 10.11646/zootaxa.589.1.1

30. Forattini OP. *Culicidologia médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia* Vol. 2 Ed. Universidade de São Paulo, 2002.
31. Darsie RF Jr. Key characters for identifying *Aedes bahamensis* and *Aedes albopictus* in North America, north of Mexico. *J Am Mosq Control Assoc.* 1992;8(3):323-324. PMID: 1402873
32. Natal D. Bioecologia do *Aedes aegypti* [online]. *Biológico.* 2002;64(2): 205-207. Available from: [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v64\\_2/natal.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v64_2/natal.pdf) [Accessed 22 jul 2022]
33. Consoli RA. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.* Rio de Janeiro, RJ: Editora FIOCRUZ; 1994. 225 p.
34. Savage HM, Niebylski ML, Smith GC, Mitchell CJ, Craig GB. Host-Feeding patterns of *aedes albopictus* (diptera: culicidae) at a temperate north american site. *Journal of Medical Entomology.* 1 jan 1993;30(1):27-34. doi: 10.1093/jmedent/30.1.27
35. CDC Blogs | Blogs | CDC. Zika, Mosquitoes, and Standing Water [online]. Blogs; CDC; Available from: <https://blogs.cdc.gov/publichealthmatters/2016/03/zikaandwater> [Accessed 22 july 2022].
36. Laura de Sene Amâncio Zara A, Maria dos Santos S, Synthia Fernandes-Oliveira E, Gomes Carvalho R, Evelim Coelho G. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiologia e Serviços de Saúde.* Jun 2016;25(2):1-2. doi: 10.5123/s1679-49742016000200017
37. World Health Organization. Report of the Scientific Working Group on dengue. Document WHO/TDR/SWG/08, Geneva, Switzerland, World Health Organization; [online]. 2006. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69787/> [Accessed 01 july de 2022]
38. World Health Organization. *Progress and Prospects for the Use of Genetically Modified Mosquitoes to Inhibit Disease Transmission.* [online]. World Health Organization; Geneva, Switzerland: 2010.
39. Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, della Torre A, Ranson H. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* Out 2012;104(2):126-31. doi: 10.1016/j.pestbp.2012.05.008
40. Ranson Hilary, Burhani Joseph, Lumjuan Nongkran, Black IV William C. Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA.net* [serial on the Internet]. 2010 Mar [cited 2022 July 22] ; 1(1): . Available from: [http://journal.tropika.net/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2078-86062010000100003&lng=en](http://journal.tropika.net/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2078-86062010000100003&lng=en).
41. Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, Leong YS, Dong Y, Axford J, Kriesner P, Lloyd AL, Ritchie SA, O'Neill SL, Hoffmann AA. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature.* Ago 2011;476(7361):450-3. doi: 10.1038/nature10355
42. McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AW, Sidhu M, Wang YF, O'Neill SL. Stable introduction of a life-shortening *wolbachia* infection into the mosquito *aedes aegypti*. *Science.* 2 jan 2009;323(5910):141-4. doi: 10.1126/science.1165326
43. Niang EH, Bassene H, Fenollar F, Mediannikov O. Biological control of mosquito-borne diseases: the potential of *wolbachia*-based interventions in an IVM framework. *Journal of Tropical Medicine.* 15 nov 2018;2018:1-15. doi: 10.1155/2018/1470459

44. Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites. 2nd edition. San Diego: Elsevier; 1992. doi.org/10.1016/c2009-0-03210-3.
45. Yaoita Y, Kikuchi M, Machida K. Terpenoids and related compounds from plants of the family compositae (asteraceae). Natural Product Communications. Abr 2012;7(4):1934578X1200700. doi: 10.1177/1934578x1200700430
46. Potzernheim MC, Bizzo HR, Silva JP, Vieira RF. Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of piper aduncum L. from distrito federal, brazil. Biochemical Systematics and Ecology. Jun 2012;42:25-31. doi: 10.1016/j.bse.2011.12.025
47. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology. Fev 2008;46(2):446-75. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106
48. Isman MB. Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection. Set 2000;19(8-10):603-8. doi: 10.1016/s0261-2194(00)00079-x
49. Pavela R. Óleos essenciais para o desenvolvimento de larvicidas de mosquito ecologicamente corretos: Uma revisão. Culturas e Produtos Industriais. Dez 2015; 76:174-87. Disponível em: doi: 10.1016/j.indcrop.2015.06.050
50. Luz TR, de Mesquita LS, Amaral FM, Coutinho DF. Essential oils and their chemical constituents against *Aedes aegypti* L. (Diptera: culicidae) larvae. Acta Tropica. Dez 2020;212:105705. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105705
51. Pavela R. Larvicidal property of essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: culicidae). Industrial Crops and Products. Set 2009;30(2):311-5. doi: 10.1016/j.indcrop.2009.06.005
52. Rehman JU, Ali A, Khan IA. Plant based products: use and development as repellents against mosquitoes: a review. Fitoterapia. Jun 2014;95:65-74. doi: 10.1016/j.fitote.2014.03.002
53. Dias CN, Moraes DF. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: culicidae) larvicides: review. Parasitology Research. 22 nov 2013;113(2):565-92. doi: 10.1007/s00436-013-3687-6
54. Dussault D, Vu KD, Lacroix M. In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. Meat Science. Jan 2014;96(1):514-20. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.08.015
55. Schalcher Pereira ÁI, Guia Schalcher Pereira AD, Lopes Sobrinho OP, Pereira Cantanhede ED, Saldanha Siqueira LF. Atividade antimicrobiana no combate as larvas do mosquito *Aedes aegypti*: homogeneização dos óleos essenciais do linalol e eugenol. Educación Química. Out 2014;25(4):446-9. doi: 10.1016/s0187-893x(14)70065-5
56. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química Nova. Abr 2007;30(2):374-81. doi: 10.1590/s0100-40422007000200026
57. Silva RL, Mello TR, Sousa JP, Albernaz LC, Magalhães NM, Morais LS, Francisco LR, Leal WS, Espindola LS. Brazilian Cerrado biome essential oils to control the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Industrial Crops and Products. Abr 2022;178:114568. doi: 10.1016/j.indcrop.2022.114568
58. Lorenzi H, Souza HM. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3.ed. São Paulo: Instituto Plantarum; 2001. 1067p.

59. Ghosh S, Rangan L. *Alpinia*: the gold mine of future therapeutics. 3 Biotech. 18 set 2012;3(3):173-85. doi: 10.1007/s13205-012-0089-x
60. Teschke R, Xuan T. Viewpoint: a contributory role of shell ginger (*alpinia zerumbet*) for human longevity in okinawa, japan? Nutrients. 31 jan 2018;10(2):166. doi: 10.3390/nu10020166
61. Mendes FR, Silva FG, Sousa EO, Rodrigues FF, Costa JG, Monte FJ, Lemos TL, Assunção JC. Essential oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. (Zingiberaceae): chemical composition and modulation of the activity of aminoglycoside antibiotics. Journal of Essential Oil Research. 26 fev 2015;27(3):259-63. doi: 10.1080/10412905.2015.1014935
62. Leal-Cardoso JH, Moreira MR, Pinto da Cruz GM, de Moraes SM, Lahlou MS, Coelho-de-Souza AN. Effects of essential oil of *Alpinia zerumbet* on the compound action potential of the rat sciatic nerve. Phytomedicine. Set 2004;11(6):549-53. doi: 10.1016/j.phymed.2003.07.008
63. Denardi L, Marchiori JN. Anatomia ecológica da madeira de *blepharocalyx salicifolius* (H. B. K.) berg. Ciência Florestal. 30 jun 2005;15(2):119. doi: 10.5902/198050981829
64. Poncio S. Bioatividade de inseticidas botânicos sobre *Microtheca ochroloma* stal (coleoptera: chrysomelidae) [published version na Internet]. [local desconhecido]: Universidade Federal de Santa Maria; 2010. doi: <http://repositorio.ufsm.br/handle/1/5026>
65. Vasconcelos, TNC, Proença, CEB. *Blepharocalyx* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available from: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB10259/> [Acessed 21 July 2022]
66. Lima JD, Castro JM, Sabino LB, Lima AC, Torres LB. PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF GABIROBA (*Campomanesia lineatifolia*) AND MYRTLE (*Blepharocalyx salicifolius*) NATIVE TO THE MOUNTAINOUS REGION OF IBIAPABA-CE, BRAZIL. Revista Caatinga. Set 2016;29(3):753-7. doi: 10.1590/1983-21252016v29n327rc
67. Khanuja SP, Shasany AK, Pawar A, Lal RK, Darokar MP, Naqvi AA, Rajkumar S, Sundaresan V, Lal N, Kumar S. Essential oil constituents and RAPD markers to establish species relationship in *Cymbopogon Spreng.* (Poaceae). Biochemical Systematics and Ecology. Fev 2005;33(2):171-86. doi: 10.1016/j.bse.2004.06.011
68. Takaisi-Kikuni NB, Krüger D, Gnann W, Wecke J. Microcalorimetric and electron microscopic investigation on the effects of essential oil from *Cymbopogon densiflorus* on *Staphylococcus aureus*. Microbios. 1996;88(354):55-62. PMID: 9121380
69. Takaisi-Kikuni NB, Tshilanda D, Babady B. Antibacterial activity of the essential oil of *Cymbopogon densiflorus*. Fitoterapia. Fev 2000;71(1):69-71. doi: 10.1016/s0367-326x(99)00097-0
70. Landrum LR, Kawasaki ML. The genera of myrtaceae in brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. Brittonia. Out 1997;49(4):508. doi: 10.2307/2807742
71. Mazine FF, et al. Flora e Funga do Brasil. Re flora. 2020. Available from: <https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/FB10338> [Acessed 18 July 2022]
72. Mazine FF, Souza VC. Three new species of *eugenia* sect. *racemosae* (myrtaceae) from the cerrados of the state of mato grosso, brazil. Revista Brasileira de Botânica. Jun 2010;33(2):285-90. doi: 10.1590/s0100-84042010000200009

73. Moraes MM, Camara CA, Santos ML, Fagg CW. Essential oil composition of *Eugenia langsdorffii* O. Berg.: relationships between some terpenoids and toxicity against *Tetranychus urticae*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. Set 2012;23(9):1647-56. doi: 10.1590/s0103-50532012005000029
74. Lago JH, Souza ED, Mariane B, Pascon R, Vallim MA, Martins RC, Baroli AA, Carvalho BA, Soares MG, Santos RT, Sartorelli P. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of Myrtaceae — *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. berg) kausel. *Molecules*. 25 nov 2011;16(12):9827-37. doi: 10.3390/molecules16129827
75. Lorenzi H. *Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa, SP, Brasil: Editora Plantarum, 1992.
76. Figueiredo YG, Corrêa EA, de Oliveira Junior AH, Mazzinghy AC, Mendonça HD, Lobo YJ, García YM, Gouvêia MA, de Paula AC, Augusti R, Reina LD, da Silveira CH, de Lima LH, Melo JO. Profile of myracrodruon urundeuva volatile compounds ease of extraction and biodegradability and in silico evaluation of their interactions with COX-1 and inos. *Molecules*. 1 mar 2022;27(5):1633. doi: 10.3390/molecules27051633
77. Albuquerque UP, Andrade LD. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. Set 2002;16(3):273-85. doi: 10.1590/s0102-33062002000300004
78. Souza SM, Aquino LC, Jr AC, Bandeira MA, Nobre ME, Viana GS. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in Rodents. *Phytotherapy Research*. 2007;21(3):220-5. doi: 10.1002/ptr.2011
79. Viana GS, Bandeira MA, Matos FJ. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. *Phytomedicine*. Jan 2003;10(2-3):189-95. doi: 10.1078/094471103321659924
80. Souza TM, Farias DF, Soares BM, Viana MP, Lima GP, Machado LK, Morais SM, Carvalho AF. Toxicity of brazilian plant seed extracts to two strains of *aedes aegypti* (diptera: culicidae) and nontarget animals. *Journal of Medical Entomology*. 1 jul 2011;48(4):846-51. doi: 10.1603/me10205
81. Verdi LG, Brighente IM, Pizzolatti MG. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química Nova*. Fev 2005;28(1):85-94. doi: 10.1590/s0100-40422005000100017
82. Heiden, G. *Baccharis* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available from: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB5242/> [Accessed 21 July 2022]
83. World Health Organization and UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme For Research And Training In Tropical Diseases. Global vector control response 2017-2030. [Online]. 2017. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259205> [Accessed 27 June 2022].
84. Beltrán-Silva SL, Chacón-Hernández SS, Moreno-Palacios E, PereyraMolina JA. Clinical and differential diagnosis: dengue, chikungunya and Zika. *Rev Med Hosp Gen*. 2016; 81 (3): 146-153. <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.09.011>
85. Imperato PJ. The convergence of a virus, mosquitoes, and human travel in globalizing the Zika epidemic. *J. Community Health*. 2016; 41 (3): 674–679.

86. Rios Cadavid JF. Aspectos entomológicos da dengue. *Infectio*. 2004; 8 (3): 231 - 235.
87. World Health Organization. Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations: interim guidance for entomologists. [Online]. 2016. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204588> [Accessed 26 June 2022].
88. Ghosh A, Chowdhury N, Chandra G. Plant extracts as potential mosquito larvicides. *The Indian journal of medical research*. 2012;135(5):581.
89. ICMR Bulletin. Prospects of using products in the control of insect vectors. 2003; 33:1-10, 2003.
90. Tisserand, R, Young, R. *Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals* . (2<sup>o</sup> ed.). : Churchill Livingstone; 2013.
91. Huong LT, Huong TT, Huong NTT, Hung NH, Dat PTT, Luong NX, Ogunwande IA. Mosquito Larvicidal Activity of the Essential Oil of *Zingiber collinsii* against *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus*. *J Oleo Sci*. 2020; 69(2):153-160.
92. de Souza MA, da Silva L, Dos Santos MAC, Macêdo MJF, Lacerda-Neto LJ, Coutinho HDM, de Oliveira LCC, Cunha FAB. Larvicidal Activity of Essential Oils Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Current Pharmaceutical Design*. 2020;26(33):4092-4111.
93. Jesus GS, Micheletti AC, Padilha RG, de Souza de Paula J, Alves FM, Leal CRB, Garcez FR, Garcez WS, Yoshida NC. Antimicrobial Potential of Essential Oils from Cerrado Plants against Multidrug-Resistant Foodborne Microorganisms. *Molecules*. 2020; 25 (14) : 3296.
94. Pinheiro, NO. Aplicação do Método Scott-Knott em estudo de Brusone no trigo . Brasília, Brazil: Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Estatística) - Universidade de Brasília ; 2017
95. Dool HD, Kratz PD. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*. 1963; 11(1963): 463-471.
96. Zoghbi MGB, et al. Volatile constituents from leaves and flowers of *Alpinia speciosa* K. Schum. and *A. pupurata* (Viell.) Schum. *Flavour and Fragrance Journal*. 1999; 14 (6): 411-4.
97. Tu PT, Tawata S. Anti-Oxidant, Anti-Aging, and Anti-Melanogenic Properties of the Essential Oils from Two Varieties of *Alpinia zerumbet*. *Molecules*. 2015 (9): 16723-40.
98. Hernández JJ, Ragone MI, Bonazzola P, Bandoni AL, Consolini AE. Antitussive, antispasmodic, bronchodilating and cardiac inotropic effects of the essential oil from *Blepharocalyx salicifolius* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 2018;210:107-117. doi:10.1016/j.jep.2017.08.013
99. Bianchini NH, Da Silva DT, Schindler B, Muniz MF, Heinzmann BM. Antifungal activity of essential oils from native tree species in southern Brazil. *Floresta*. 2022;52(2):304. doi:10.5380/ufv.v52i2.78343
100. Castelo AVM, Menezzi CHSD, Resck IS. Rendimento e análises espectroscópicas (RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C; IV) da composição química dos óleos essenciais de quatro plantas do cerrado. *Cerne*. 2010; 16 (4): 573-584.
101. de Pooter, HL., Aboutabl, EA., El-Shabrawy, A.O. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of leaf, stem and rhizome of *Alpinia speciosa*. *Flavour Fragr. J.*, 1995;10: 63-67.

102. Rezende ME, Jasmim JM, Caprini GP, Sousa EF, Schripsema J, Thiébaud JT. Teor e composição química do óleo essencial de *Alpinia* em razão da adubação e da disponibilidade de água no solo. *Revista Ceres*. 2011;58(2):208-215. doi:10.1590/s0034-737x2011000200012
103. Etou Ossibi AW, Elouma Ndinga MA, Epa C *et al.* Chemical composition and diuretic potential of the essential oil of *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf. (Poaceae) in the mouse. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2020;13(6):2777. doi:10.4314/ijbcs.v13i6.28
104. Seibert JB, Viegas JS, Almeida TC *et al.* Nanostructured systems improve the antimicrobial potential of the essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves. *Journal of Natural Products*. 2019;82(12):3208-3220. doi:10.1021/acs.jnatprod.8b00870
105. Rebouças de Araújo ID, Coriolano de Aquino N, Vêras de Aguiar Guerra AC *et al.* Chemical composition and evaluation of the antibacterial and Cytotoxic activities of the essential oil from the leaves of *Myracrodruon urundeuva*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017;17(1). doi:10.1186/s12906-017-1918-6
106. Costa OB, Del Menezzi CH, Benedito LE, Resck IS, Vieira RF, Ribeiro Bizzo H. Essential Oil Constituents and Yields from Leaves of *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg and *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) Collected during Daytime. *International Journal of Forestry Research*. 2014;2014:1-6. doi:10.1155/2014/982576
107. Kerrola K, Galambosi B, Kallio H. Volatile Components and Odor Intensity of Four Phenotypes of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1994; 42 (3): 776–781.
108. Kerdudo A, Ellong EN, Burger P, Gonnot V, Boyer L, Chandre F, Adenet S, Rochefort K, Michel T, Fernandez X. Chemical Composition, Antimicrobial and Insecticidal Activities of Flowers Essential Oils of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burtt & R.M.Sm. from Martinique Island. *Chemistry & Biodiversity* [Internet]. 20 mar 2017 [citado 21 jul 2022];14(4):e1600344. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600344>
109. Dos Santos JVB, de Almeida Chaves DS, de Souza MAA, Riger CJ, Lambert MM, Campos DR, Moreira LO, Dos Santos Siqueira RC, de Paulo Osorio R, Boylan F, Correia TR, Coumendouros K, Cid YP. Share In vitro activity of essential oils against adult and immature stages of *Ctenocephalides felis felis*. *Parasitology*. 2020 Mar;147(3):340-347. doi: 10.1017/S0031182019001641.
110. Cavalcanti, ES, *et al.* Larvicidal Activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99(5): 541–544. doi:10.1590/s0074-02762004000500015
111. Furtado F, Borges B, Teixeira T *et al.* Chemical Composition and Bioactivity of Essential Oil from *Blepharocalyx salicifolius*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(1):33. doi:10.3390/ijms19010033
112. Chisowa EH. Chemical Composition of Flower and Leaf Oils of *Cymbopogon densiflorus* Stapf from Zambia. *Journal of Essential Oil Research*. 1997;9(4):469-470.
113. Pereira GL, Almeida TC, Seibert JB *et al.* Antitumor effect of *Cymbopogon densiflorus* (Linneu) essential oil in bladder cancer cells. *Natural Product Research*. 2020:1-5. doi:10.1080/14786419.2020.1747453

114. Figueredo FG, Lucena BF, Tintino SR et al. Chemical composition and evaluation of modulatory of the antibiotic activity from extract and essential oil of *Myracrodruon urundeuva*. *Pharmaceutical Biology*. 2013;52(5):560-565. doi:10.3109/13880209.2013.853810
115. Bonzani da Silva J, Grotta A de S. Anatomia da folha e óleo essencial de *Baccharis retusa* DC., Compositae [Anatomy of the leaf and essential oil of *Baccharis retusa* DC., Compositae]. *Rev Farm Bioquim Univ Sao Paulo*. 1971;9(2):321-326.
116. Sarma R, Adhikari K, Mahanta S, Khanikor B. Combinations of plant essential oil based terpene compounds as larvicidal and adulticidal agent against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Scientific Reports*. 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-45908-3
117. Gong X, Ren Y. Larvicidal and ovicidal activity of carvacrol, p-cymene, and  $\gamma$ -terpineno from *Origanum vulgare* essential oil against the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Environmental Science and Pollution Research*. 23 mar 2020 ;27(15):18708-16. Disponível em: doi:10.1007/s11356-020-08391-2
118. Lucia A, Zerba E, Masuh H. Knockdown and larvicidal activity of six monoterpenes against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and their structure-activity relationships. *Parasitology Research*. 2013;112(12):4267-4272. doi:10.1007/s0\0436-013-3618-6
119. Santos SR, Melo MA, Cardoso AV, Santos RL, de Sousa DP, Cavalcanti SC. Structure–activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. *Chemosphere*. 2011 Jun;84(1):150-3. Available from: doi:10.1016/j.chemosphere.2011.02.018
120. Pubchem - National Library Of Medicine. Explore Chemistry. [Online]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> [Accessed 29 Jun 2022].
121. National Institute of Standards and Technology (NIST). Base de dados de Referência padrão do NIST número 69. [Online]. Available from: <https://webbook.nist.gov/chemistry/> [Accessed 29 Jun 2022].
122. Ali A, Tabanca N, Kurkcuoglu M, Duran A, Blythe EK, Khan IA, Can Baser KH. Chemical Composition, Larvicidal, and Biting Deterrent Activity of Essential Oils of Two Subspecies of *Tanacetum argenteum* (Asterales: Asteraceae) and Individual Constituents Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 2014 Jul 1;51(4):824-30. Available from: doi:10.1603/me13249
123. Santos Júnior PS, Everton GO, Rosa PV, Souza LD, Conceição FO, Soares LB, Farias WK, Souza LD, Batista CL, Pinheiro FS, Araújo Neto AP, Mouchrek Filho VE. Atividade larvicida do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* frente as larvas do mosquito *Aedes aegypti*. *Research, Society and Development*. 29 jun 2020;9(8):e194985578. doi: 10.33448/rsd-v9i8.5578
124. Chan EW, Wong SK, Chan HT. *Alpinia zerumbet*, a ginger plant with a multitude of medicinal properties: An update on its research findings. *Journal Of Chinese Pharmaceutical Sciences*. 30 nov 2017;26(11). Disponível em: doi:10.5246/jcps.2017.11.088
125. Silva RL, Mello TR, Sousa JP, Albernaz LC, Magalhães NM, Morais LS, Francisco LR, Leal WS, Espindola LS. Brazilian Cerrado biome essential oils to control the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Industrial Crops and Products*. 2022 Apr;178:114568. Available from: doi:10.1016/j.indcrop.2022.114568

126. Rattan RS. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*. 2010 Sep;29(9):913-20. Available from: doi:10.1016/j.cropro.2010.05.008
127. Scotti L, Scotti M, Silva V, Santos S, Cavalcanti S, Junior F. Chemometric Studies on Potential Larvicidal Compounds Against *Aedes Aegypti*. *Medicinal Chemistry*. 31 jan 2014;10(2):201-10. Disponível em: doi:10.2174/15734064113099990005
128. Seo SM, Jung CS, Kang J, Lee HR, Kim SW, Hyun J, Park IK. 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*. 6 nov 2015;63(45):9977-86. Disponível em: doi:10.1021/acs.jafc.5b03586

## 9. APÊNDICE

### 9.1 APÊNDICE A

À Secretaria de Pós-Graduação do Programa de Ciências e Tecnologias em Saúde

Prezada equipe do Programa de Pós-Graduação do Programa de Ciências e Tecnologias em Saúde,

Tendo em vista as orientações descritas no documento “PROCEDIMENTOS BÁSICOS PARA MARCAÇÃO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO”, no que diz respeito aprovação de pesquisa em Comitê de Ética em Pesquisa (CEP): “Quando se tratar de pesquisas que não exigem a aprovação do CEP o discente deverá entregar um documento solicitando a dispensa de entrega deste comprovante com as devidas justificativas, assinado e com a anuência do orientador”, informamos:

A pesquisa de mestrado, intitulada “Atividade larvicida de óleos essenciais do cerrado brasileiro contra larvas de *Aedes aegypti* (diptera: culicidae)”, a ser apresentada na modalidade de monografia, não envolve seres humanos e está dispensada de submissão e aprovação por Comitê de Ética de Pesquisa com Seres Humanos, de acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e Conforme a Lei Federal nº 11.794/08, pois não envolve animais vertebrados ou materiais e dados derivados destes ou parte destes. São utilizados material vegetal além de testes de suscetibilidade com larvas da espécie *Aedes aegypti*. A criação e manutenção da espécie *Aedes aegypti* foi autorizada pela Comissão de Ética no uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, sob protocolo nº 85/2018.

Dessa forma, solicitamos dispensa de entrega de comprovante de aprovação do protocolo de pesquisa no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

Data: 05/08/22



---

Orientador



---

Discente

## 9.2 APÊNDICE B

## Activity of Essential oils from Brazilian Cerrado against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae

Raíssa Rosa Pessoa Cruzeiro<sup>1</sup>, Noel William Davies<sup>3</sup>, Marcos Takashi Obara<sup>1</sup>, Damaris Silveira<sup>2</sup>, Kicia Karinne Pereira Gomes-Copeland<sup>2</sup>, Daniela Aparecida de Castro Nizio<sup>4</sup>, Christopher William Fagg<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia, Centro Metropolitano, Ceilândia 72220-900, DF, Brazil, <sup>2</sup>Universidade de Brasília, Controle da qualidade lab., Department of Pharmacy, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília 70910-900, DF, Brazil, <sup>3</sup>University of Tasmania, Central Science Lab., Hobart, TAS7005, Australia, <sup>4</sup> Universidade Federal de Sergipe, Avenida Marechal Rondon, Sergipe, 49100-000 Brazil.

\*corresponding author. email: [acaciafagg@gmail.com](mailto:acaciafagg@gmail.com)

### ABSTRACT

The mosquito *Aedes aegypti* is the main vector of viral diseases such as dengue, Zika, Chikungunya, and urban yellow fever. Essential oils are a set of organic compounds from a single plant species composed of volatile molecules. Usually toxic to humans in relatively high doses, they have been found present repellent activity against many mosquito species. However, only a few studies still address the therapeutic potential of plant extracts from the Brazilian Cerrado. Therefore, the larvicidal activity of different essential oils (EO) from native and cultivated plants in the Brazilian Cerrado against *Aedes aegypti* larvae was evaluated. Essential oils were obtained from *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burtt & R.M.Sm., *Baccharis retusa* DC., *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf, *Eugenia langsdorffii* O. Berg., *Myracrodruon urundeuva* Allemão. *Baccharis retusa* DC. is dioecious; hence it was separated into male and female, leaves and flowers. The two most potent EOs were from *A. zerumbet* and *E. langsdorffii*, which resulted in 100% larvae mortality at 100mg/L and LC<sub>50</sub> = 36.6 mg/L, LC<sub>90</sub> = 66.3 mg/L (*A. zerumbet*) and LC<sub>50</sub> = 53.5 mg/L, LC<sub>90</sub> = 103.9 mg/L (*E. langsdorffii*). The major essential oil components were 1,8-cineole, sabinene, terpinen-4-ol and  $\gamma$ -terpineno in *A. zerumbet*; and limoneno,  $\delta$ -cadinol, mirceno and espatulenol in *E. langsdorffii*. However, the active components still need to be identified, as well as a clarification of their mode of action.

**Key words:** Essential oils, larvicides, monoterpenes, vector control, *Aedes aegypti*.

### 1. INTRODUCTION

Due to climate and other severe environmental changes and increased international travel and trade, vector-borne diseases have been spread from tropical zones to temperate areas (WHO, 2017). The *Aedes aegypti* mosquito is the principal vector of viral diseases such as dengue, Zika, Chikungunya, and yellow fever (Imperato, 2016). In 2021, there were 1,256,181 cases of dengue, 134,817 of Chikungunya, and 21,043 Zika in the Americas (Gutiérrez, 2022). In Brazil alone, 502,983 cases of

dengue, 93,043 of Chikungunya, and 6,020 of Zika were recorded (de Medeiros et al., 2022). For mosquito control, the main strategy currently used is the use of synthetic insecticides, but technical, ecological, economic, and operational factors make this strategy limited (Ghosh, 2012). Although presenting good results, the most recent initiatives, such as biocontrol using *Wolbachia* spp., genetic modification for sterile insects, and others, are still not widely used. The harmful effects of synthetic insecticides, the main worldwide tool for mosquito control, are well known. Mosquito resistance to insecticides is another negative factor for this method, whereas for mixtures of complex plant-based compounds there is less possibility of resistance development (Ghosh, 2012). An alternative is vector control, preventing most vector-borne conditions (WHO, 2017). In this sense, using volatile compounds from plants as mosquito repellents or reducing the mosquito population can be a green alternative in vector-borne disease control. Essential oils are usually less toxic to humans than conventional insecticides, exhibiting repellent activity against numerous species of mosquitoes (Huong, 2020). Essential oils from 175 plant species against *A. aegypti* larvae were analyzed, and species from Piperaceae, Asteraceae, Rutaceae, Euphorbiaceae, and Lauraceae had the highest number of larvicidal effects (de Souza, 2020). Although such success cases have been reported, scented plants from Cerrado are still little explored. And have great potential as a rich source of natural products (Jesus et al., 2020). Therefore, the susceptibility of *A. aegypti* larvae to different essential oils from six plant species growing in the Cerrado was assessed.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Collection and extraction of essential oils

The plant material was previously identified in the field by the botanist Christopher Fagg and vouchers were deposited in the University of Brasilia Herbarium (UB). The information about the 6 species used in this study is in Table 1.

Leaves and flowers of *Baccharis retusa* DC., and leaves of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burt & R.M.Sm., *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf and *Myracrodruon urundeuva* Allemão were collected in the Cerrado *sensu stricto* from the APA Gama Cabeça de Veado and *Eugenia langsdorffii* O. Berg., at the Campus Darcy Ribeiro, University of Brasília (UnB), Brazil, both located in the Federal District at ca. 1000m altitude, between 9 and 10 am in June and July 2019. As *B. retusa* DC. is dioecious, leaves and flowers from the male and female plants were collected separately, totalling 9 samples.

The freshly collected species were immediately cut in small pieces inserted into a Clevenger-type apparatus for hydrodistillation. The hydrodistillation procedure followed that described in the Brazilian Pharmacopoeia 6a Edition (Brasil, 2010). Briefly, 200 g of leaves or flowers were used, and the extraction time was 3h. The obtained oil was immediately stored in dark brown glass bottles in a freezer at  $-20^{\circ}$  C until the analysis. Experiments were carried out in triplicate. Total oil yields were expressed as percentages of fresh plant material (m/m). This research was registered in the Brazilian Biodiversity Authorization and Information System (SisGen) under the number A44EB9F.

### 2.2. Chromatographic profile of essential oils

Compound identification was performed using combined gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). A gas chromatograph (Clarus 680 GC, Perkin Elmer) was coupled to a quadrupole mass spectrometer (Clarus SQ8 MS, Perkin Elmer) under the following conditions: injection temperature of 280 °C with a split ratio of 1:20; Perkin Elmer Elite-5MS capillary column (length 30m x inner diameter 0.25mm x film thickness 0.25 µm); column oven with an initial temperature of 50 °C, maintained for 1.5 min, then gradually increased by 3 °C/min to 200 °C, followed by heating at 10 °C/min to 300 °C, maintaining this last temperature for 5 minutes (total running time: 66.5 min); the GC-MS interface temperature was 280°C, electron ionization energy 70 eV, and detector source temperature 220°C; the mass spectrometer was scanned over the range m/z 35 to 550 with a duration of 0.35 seconds and between scans 0.1 seconds. The sample was prepared in GC Grade ethyl acetate (Merck - Suprasolv), at a concentration of 0.25 µL/mL. Total volume injected was 0.25 µL.

The chromatograms and mass spectra were analyzed by Turbo Mass (version 6.1.0.1963), AMDIS (version 2.72) software and compared with the NIST MS Search library (version 2.2), and other libraries kindly provided by Prof. Noel Davies (University of Tasmania). Kovats' Indices of all peaks were determined against a standard suite of n-alkanes and compared to literature values to improve the confidence of peak assignments.

The relative percentage of each compound was calculated by the ratio between the peak area and the sum of the peak areas of all compounds in the chromatogram of a given sample. That is, the relative percentages of the Total Ion Current (TIC) were measured, not the actual relative percentages by weight in the oil. Compounds with the relative area above 1% were identified, and those above 10% were considered predominant.

### 2.3 Larvicidal activity

The larvicidal activity was tested by the immersion method according to standard procedures recommended by the World Health Organization (WHO, 2016), with minor modifications. First, 100mg/L of essential oil (EO) in DMSO stock solution was prepared. Then, 1 mL of stock solution was added to 249 mL of water, making a test solution of 100 mg/L and a total volume of 250 mL. Subsequently, 20 larvae were transferred to the solution, with a volume of 250 mL. Larvae were not fed during the testing time. Mortality was analyzed 48 hours after exposure. Four replicates were performed for each sample. For samples that promoted 100% mortality, lethal concentration (LC) LC<sub>50</sub>, LC<sub>90</sub> and LC<sub>95</sub> were calculated.

*Aedes aegypti* eggs were obtained from Laboratory of Entomology (UnB) from susceptible strains (Rockefeller) of *A. aegypti*, originally provided by the Federal University of Ceará. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) larvicide, used as positive control, was donated by the Brazilian Agricultural Research Corporation – EMBRAPA, National Center for Genetic Resources and Biotechnology.

After incubation, the larvae were kept in distilled water, fed daily with cat food in a low-light area until the L3 and L4 development stages (WHO 2005). The tests were performed with three replications, with 20 larvae per treatment. For the first larvicide *screening* test trials, solutions from the nine essential oils were prepared in DMSO (100 mg/L). 20 larvae (L3 and L4) were distributed in transparent plastic cups containing 249 mL of distilled water under controlled temperature (25 ± 30°C) and humidity between 30-50%. The negative controls were 1 mL of DMSO in 249 mL of distilled water and a water-only. During the trial no nutritional supplement

was added. Mortality was checked after 48 hours. Larvae were considered dead when they did not show movement or response to stimulation with a Pasteur pipette and direct light.

For the EO exhibited mortality around 100 %, Lethal Doses was calculated. Briefly, EO were tested in a concentration set (2.5 to 100 mg/L), in triplicate, and on three different days. For this step, the positive control was distilled water with two drops of 1.2% Bti larvicide for each repeat day. Mortality was checked after 48 hours. Larvae were considered dead when they did not show movement or response to stimulation with a Pasteur pipette and direct light.

## 2.4 Statistical analyses

All data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the differences between means compared by the Scott Knott test (at 5% probability) for the mortality tests to define the most promising treatments. Results were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . No correction was necessary, as the mortality in the control groups did not exceed 10% (WHO, 2016). The LC ratios were considered significant ( $P \leq 0.05$ ). Mortality data obtained from concentration-mortality bioassays were submitted to probit analysis with limits of 0.95 (confidence interval) using the PoloPlus statistical program (LeOra Software, 2002-2007). The results were expressed by the Lethal Concentration (LC) parameter. The response of the populations tested in the concentration-mortality bioassays was used to obtain the curve slopes. The  $LC_{50}$ ,  $LC_{90}$ , and  $LC_{95}$  were estimated to assess the larval mortality.

## 3. Results and discussion

### 3.1 Essential oil extraction yield

The yield determination of each essential oil was calculated based on the arithmetic mean of three extractions (Table 1).

**Table 1.** Extraction yield percentages of 9 essential oils

Plant species	Voucher	Plant material	Family	Yield
<i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B. L. Burtt & R.M. Sm.	Fagg 2525	Leaf	Zingiberaceae	0,26
<i>Baccharis retusa</i> D.C.	Fagg 2524	Leaf (♂)	Asteraceae	0,12
<i>Baccharis retusa</i> D.C.	Fagg 2524	Flower (♂)	Asteraceae	0,11
<i>Baccharis retusa</i> D.C.	Fagg 2523	Leaf (♀)	Asteraceae	0,15
<i>Baccharis retusa</i> D.C.	Fagg 2523	Flower (♀)	Asteraceae	0,09
<i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) O. Berg	Fagg 2521	Leaf	Myrtaceae	0,28
<i>Cymbopogon densiflorus</i> (Steud.) Stapf	Fagg 2411	Leaf	Poaceae	0,24
<i>Eugenia langsdorffii</i> O. Berg.	Faria Jn & Fagg 918	Leaf	Myrtaceae	0,39
<i>Myracrodruon urundeuva</i> Alemão	Fagg 2520	Leaf	Anacardiaceae	0,13

*Eugenia langsdorffii*, *B. salicifolius*, *A. zerumbet* and *C. densiflorus* showed the highest yields of extracted essential oil (0.39%, 0.28%, 0.26%, and 0.24% respectively), and differed significantly from the *M. urundeuva* and *B. retusa* with both male and female leaves and flowers (0.13%, 0.12%, 0.11%, 0.15%, and 0.09%, respectively).

Our results differed from those found in previous studies. The essential oil content obtained from fresh leaves of *E. langsdorffii* was 0.05% from the same plant population (Moraes, 2012). *B. salicifolius* provided 1.2% yield from dried material (Hernández et al., 2018) and 2.29% from fresh leaves (Bianchini et al., 2022). For *A. zerumbet* 0.12% was obtained by hydrodistillation of fresh leaves and 0.35% from dry leaves (de Pooter et al., 1995). Also, the essential oil obtained from dry leaves had a content of approximately 0.74% in another study (Rezende et al., 2011). The essential oil from the leaves of *C. densiflorus* had a yield of 0.22% from fresh leaves (Etou et al., 2020), and approximately 0.09% from dry leaves (Seibert, 2018). For *M. urundeuva*, the yield was (0.02%), calculated from the fresh weight of plant material (Rebouças et al., 2017), and 0.13% compared to the same 9h collection time varying to 0.08% at 17h (Costa et al., 2014). It should be noted that different extraction methodologies were used in each study and according to factors such as cultivation, humidity, temperature, climate, altitude, and seasonality, there is a possibility of changing the yield, which could explain the observed differences.

### 3.2 Chemical composition of extracted essential oils

The results of the GC-MS analysis are listed in Table 2. The dominant constituent of the essential oil of *A. zerumbet* was 1,8-cineole (22.6%) followed by sabinene (21%), terpinen-4-ol (17.3%) and  $\gamma$ -terpineno (12.9%). In the case of *A. zerumbet* EO, monoterpene hydrocarbons showed an abundance of 55.3% (sabinene and  $\gamma$ -terpineno) and oxygenated monoterpenes 41.3% with the main representatives being 1,8-cineole and terpinen-4-ol. In the northeast of Brazil, Cavalcanti et al. 2004 found 1-8 cineole (17.9%) and terpinen-4-ol (17.8%) with slightly more  $\gamma$ -terpineno (14.5%) and much less sabinene (9.2%). It is interesting to observe the authors found the essential oil was much less effective as a larvicide than in the present work. All compounds found in *A. zerumbet* leaf oil were also found in the essential oil of flowers in a previous study, except for espatulenol (Kerdudo et al., 2017). Another study analyzed the composition of the essential oil of different species and found the same major compounds for *A. zerumbet* differing in abundance (22.1% of terpinen-4-ol, 17.5% of 1,8-cineole, 11.5% of sabinene and 10.9 %  $\gamma$ -terpineno) (dos Santos et al., 2020).

The main constituents of the EO of *B. salicifolius* were  $\alpha$ -pineno (44%), followed by  $\gamma$ -terpineno (12.1%), cariofileno (5.3%), and aromadendreno (5.3%). The main constituents were almost entirely monoterpene hydrocarbons (67.3%) ( $\alpha$ -pineno and  $\gamma$ -terpineno) and sesquiterpene hydrocarbons (19.3%). Costa et al. (2014) collected the same species in Brasilia and also found the major components were monoterpene hydrocarbons:  $\alpha$ -pineno (9.0 %), *p*-cymene (25.9 %), and  $\gamma$ -terpineno (12.5%). Cariofileno oxide (9.6%), aromadendreno (4.6%), *trans*-calamenene (3.5%), and cariofileno (3.2%) were the main sesquiterpenes. Recently another study found  $\gamma$ -terpineno (17.1%), cariofileno (11.4%), aromadendreno (10.3%) and  $\alpha$ -pineno (8.8%) as the major components (Silva, 2022). Different major compounds were found for the species in Argentina, with 1,8-cineole (38.5%) and limoneno (13.1%) (Hernández et al., 2018). A Brazilian study carried out in São Paulo also showed a different chemical composition for *B. salicifolius* and the main

compounds identified were bicyclogermacrene (17.50%), globulol (14.13%), and viridiflorol (8.83%) (Furtado et al., 2018).

The major component of *C. densiflorus* EO was *trans-p*-mentha-2,8-dien-1-ol (19.2%), in addition to isocarveol (18.9%), *cis-p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol (15.1%), limoneno (12.2%) and cosmene (12%). For the EO of *C. densiflorus*, mostly oxygenated monoterpenes (73%) were found (isocarveol, carveol and *cis-p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol) and monoterpene hydrocarbons 24,5% (*trans-p*-mentha-2,8-dien-1-ol, cosmene, limoneno).

In 1997, a study compared the chemical composition of *C. densiflorus* leaves and flowers (Chisowa, 1997). Both leaves and flowers contained *trans-p*-mentha-2,8-dien-1-ol, verbenol, perillyl alcohol, and *cis-p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol as the major compounds, (Chisowa, 1997). Another study also showed similarities in chemical composition with the presence of the major compounds *trans-p*-mentha-2,8-dien-1-ol, *cis-p*-mentha-2,8-dien-1-ol, *trans-p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol, *cis-p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol (Pereira et al., 2020).

The *E. langsdorffii* oil was characterized by limoneno (15.5%),  $\delta$ -cadinol (10.6%), mirceno (9.0%) and espatulenol (8.1%) among others. *E. langsdorffii* had a predominance of 36.5% monoterpene hydrocarbon, such as limoneno, mirceno and  $\alpha$ -pineno, in addition to oxygenated sesquiterpenes 32.9% with  $\delta$ -cadinol, espatulenol, iso-espatulenol and  $\alpha$ -epi-cadinol as the main major compounds of this chemical family. In 2012, the essential oil composition of *E. langsdorffii* was reported for the first time, with epi-longipinanol (13.6%),  $\gamma$ -eudesmol (12.3%), limoneno (11.8%) and 10-epi- $\gamma$ -eudesmol (10.6%) as the main constituents, and in this study using the same population of plants, the major compound found was also limoneno at 15.5%, but several different compounds were also identified (Moraes et al., 2012).

In the case of the species *M. urundeuva* Alemão, the monoterpene hydrocarbons made up to around 98%.  $\delta$ -3-Carene (90.2%) was the major constituent followed by terpinolene (4.1%) and limoneno (1.3%). Costa et al. (2014) found that in this species mirceno was predominant at 66.4% as opposed to 0.6% in our study. In another study in 2013, the major compound reported was also  $\delta$ -3-carene (80.41%) with a higher content of terpinolene than limoneno (Figueredo et al., 2013).

The essential oil of the *B. retusa* was reported only once in 1971, but data on the main compounds were not provided by the authors (Bonzani & Grotta, 1971). In the present study, four different analyses were performed for *B. retusa*. The essential oil of male leaves had  $\alpha$ -pineno (31.3%), cariofileno (12.5%), germacrene D (14%), and bicyclogermacrene (7.8%) as main components. In comparison, male flowers had  $\alpha$ -pineno (53.4%),  $\beta$ -pineno (13.6%), limoneno (9.3%) and cariofileno (6.8%). In female leaves  $\alpha$ -pineno (36.6%), cariofileno (16.4%), germacrene D (14.6%) and bicyclogermacrene (7.5%) were found in similar concentrations to the male leaves, while the female flowers had  $\alpha$ -pineno (39.7%),  $\beta$ -pineno (15.3%), limoneno (9.9%) and cariofileno (9%).

Similarities were found between the essential oils of the flowers and the leaves. Monoterpene hydrocarbons dominated the flowers, 72.6% for female flowers and 82.8% for male flowers, with the main compounds being  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno, and mirceno. Monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons were predominant in female and male leaves EOs. Female leaves had 47.1% monoterpene hydrocarbons represented by  $\alpha$ -pineno and  $\beta$ -pineno, and 43.5% for sesquiterpene hydrocarbons (cariofileno, germacrene D, and bicyclogermacrene), while in male leaves monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons were 49.7% and 39%, respectively. Ferracini et al. (1996) found that in male and female plants of *B. dracunculifolia* the monoterpene/sesquiterpene ratio varied more in the flowers than the leaves over the day, with the highest values in the male flowers except early in the morning when it was inverted.

Chemical composition can differ considerably depending on factors such as seasonality (harvest at different times of the year), climate or soil (Araujo et al., 2007), as well as different

chemotypes of the species under genetic control. Cerrado on poor acidic latosols at Brasilia (1100 m) has a strong climatic variation between the dry and wet seasons, which could partly explain the differences in composition.



Terpinen-4-ol	562-74-3	1177 ± 2 (764)	1177	17,3														
Isocarveol	35907-10-9	1186 ± N/A (1)												1184	18,9			
α-Terpineol	98-55-5	1189 ± 2 (811)	1191	0,5			1191	0,1	1192	0,2			1190	0,9				
2-Pinen-10-ol	515-00-4	1195 ± 2 (203)												1202	1,6			
Trans-Carveol	1197-07-5	1217 ± 2 (216)												1214	4,5			
Carveol	99-48-9	1219 ± 19 (11)												1196	9,2			
Cis-carveol	1197-06-4	1229 ± 3 (115)												1228	0,7			
Cis-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	22626-43-3	1231 ± N/A (1)												1226	15,1			
Carvone	99-49-0	1242 ± 4 (307)												1239	3,8			
Isopentyl hexanoate	2198-61-0	1252 ± 2 (33)												1249	0,3			
Copaeno	3856-25-5	1376 ± 2 (698)					1372	0,6	1372	0,2	1372	0,5	1371	0,3				
β-Damascenone	23726-93-4	1386 ± 5 (187)					1375	0,1										
β-Elemeno	515-13-9	1391 ± 2 (521)									1386	0,4			1386	0,2		
α-Gurjunene	489-40-7	1409 ± 2 (196)											1402	0,8				
Cariofileno	87-44-5	1419 ± 3 (983)	1415	1,2	1415	6,8	1415	12,5	1415	9,0	1415	16,4	1414	5,3	1415	2,4	1415	0,8
Aromandendrene	489-39-4	1440 ± 1 (5)					1434	0,2	1434	0,2			1433	5,3	1434	0,2		
Seline-5-11-diene	52026-55-8	1447 ± N/A (1)											1440	0,4				
α-Humuleno	6753-98-6	1454 ± 3 (792)					1450	0,5	1451	0,2	1451	0,4	1450	0,6	1450	0,6		
Alloaromadendreno	25246-27-9	1461 ± 2 (343)					1455	0,2					1454	0,4				
γ-Muurolene	30021-74-0	1477 ± 3 (392)					1471	0,4	1471	0,3	1471	0,5			1476	0,8		
γ-Himachalene	53111-25-4	1477 ± 3 (31)													1484	0,3		
Germacrene D	23986-74-5	1481 ± 3 (690)			1476	3,5	1477	14,0	1476	5,0	1476	14,6						
β-Eudesmene	17066-67-0	1486 ± 3 (349)					1484	0,2	1484	0,1							1484	0,3
β-Guaieno	88-84-6	1490 ± 3 (69)								0,3			1483	0,5			1491	0,4
Ledeno	21747-46-6	1493 ± 4 (114)					1487	0,3					1486	1,8	1487	0,4		
Bicyclogermacrene	24703-35-3	1495 ± 4 (368)			1491	3,8	1491	7,8	1491	3,3	1491	7,5			1491	5,2		
α-Muurolene	10208-80-7	1499 ± 3 (427)					1495	0,5	1495	0,3	1495	0,7			1494	0,6		

$\gamma$ -Cadineno	39029-41-9	1513 $\pm$ 2 (485)			1508	0,3								1508	0,9	
$\beta$ -cadineno	523-47-7	1518 $\pm$ 10 (30)	1514	0,7	1514	2,1	1515	1,1	1515	2,1	1513	0,6		1514	4,6	
Calamenene	483-77-2	1523 $\pm$ 5 (145)									1517	0,7				
Cubenene	29837-12-5	1532 $\pm$ 1 (119)									1527	1,5				
$\alpha$ -Cadineno	24406-05-1	1538 $\pm$ 1 (31)												1532	0,2	
Guaia-3,9-diene	489-83-8	1556 $\pm$ N/A (1)									1556	0,6				
Germacrene B	15423-57-1	1557 $\pm$ 3 (233)												1553	0,8	
Espatuleno	6750-60-3	1576 $\pm$ 2 (539)			1571	1,3	1571	2,4	1571	3,2	1571	3,7	1570	0,5	1571	8,1
Isopathulenol	77171-55-2		1576	0,8			1576	1,0	1576	1,1	1576	1,2	1575	0,6	1576	5,4
Globulol	489-41-8	1580 $\pm$ N/A (1)			1580	0,6	1580	0,5	1580	0,6	1580	1,1	1579	3,1	1580	1,6
Viridiflorol	552-02-3	1591 $\pm$ 2 (198)					1588	0,2	1589	0,2	1588	0,4	1588	0,5	1588	1,0
$\alpha$ -epi-Cadinol	5937-11-1	1640 $\pm$ 2 (241)					1637	0,7	1639	0,6	1638	1,0		1639	4,5	
Cubenol	21284-22-0	1642 $\pm$ 3 (127)												1641	1,7	
$\delta$ Cadinol	19435-97-3	1645 $\pm$ 2 (220)					1641	0,2						1650	10,6	
			IP <sup>d</sup> (%):	IP <sup>d</sup> (%):	IP <sup>d</sup> (%):	IP <sup>d</sup> (%):	IP <sup>d</sup> (%):	IP <sup>d</sup> (%):	IP <sup>d</sup> (%):	IP <sup>d</sup> (%):	IP <sup>d</sup> (%):	IP <sup>d</sup> (%):	IP <sup>d</sup> (%):	IP <sup>d</sup> (%):	IP <sup>d</sup> (%):	
			98,6	99,5	96,3	98,8	98,0	93,4	97,8	86,6	99,2					

Turbo Mass (version 6.1.0.1963), AMDIS (version 2.72) e NIST MS Search (version 2.2). <sup>a</sup>Reference Kovats Index average and standard deviation followed by the number of data records in parentheses. <sup>b</sup>EKI: Experimental Kovats Index; <sup>c</sup>Relative abundance; <sup>d</sup>Identified Peaks.

### 3.3 Larvicide activity

Larvicidal activity of the nine essential oils (mg/L) against 3rd and 4th instar mosquito larvae were first screened. The 48h mortality results are shown in Table 3. The most potent samples were those from *A. zerumbet* and *E. langsdorffii*, which resulted in 100% mortality, and these essential oils were selected for further tests. Interesting differences in mortality were noticed between different parts of the male and female plants of *B. retusa*, with the female flowers or inflorescences significantly more lethal (56.7%) than the female leaves (1.1%), male flowers (18.2%) and male leaves (32.5%).

Then larvicidal activities of these two plant species were tested at seven different concentrations ranging from 2.5 to 100 mg/L. The LC<sub>50</sub>, LC<sub>90</sub> and LC<sub>95</sub> values for the two chosen EOs are shown in Table 4. All larvae exposed to the positive control Bti larvicide showed 100% mortality after 24 hours of exposure.

**Table 3.** Mortality, mean and standard deviation of *Aedes aegypti* larvae after 48h exposure to essential oil from selected species

N <sup>o</sup>	Plant species	n <sup>a</sup>	Absolute Mortality (%)	X±DP
1	<i>A. zerumbet</i>	83	83 (100) a	20,75 ±2,21
2	<i>E. langsdorffii</i>	78	78 (100) a	19,50 ± 0,57
3	<i>B. retusa</i> (flower ♀)	81	46 (56.73) b	11,5 ± 1,91
4	<i>M. urundeuva</i>	81	29 (35.24) c	7,25 ± 4,85
5	<i>B. retusa</i> (leaf ♂)	83	27 (32.53) c	6,75 ± 0,5
6	<i>C. densiflorus</i>	77	18 (23.14) d	4,50 ± 3,87
7	<i>B. retusa</i> (flower ♂)	86	16 (18.28) d	4,00 ± 1,41
8	<i>B. salicifolius</i>	85	11 (12.74) d	2,75 ± 1,25
9	<i>B. retusa</i> (leaf ♀)	86	1 (1.13) e	0,25 ±0,5

<sup>a</sup> number of exposed larvae, X ± SD: mean ± standard deviation. Means followed by the same letter do not differ from each other by the Scott Knott test at 5% probability.

**Table 4.** Lethal concentrations of essential oils of *A. zerumbet* and *E. langsdorffii* in 48h against *Aedes aegypti* larvae.

Essential oil	n <sup>a</sup>	LC <sub>50</sub> (mg/L, CI 95%),	LC <sub>90</sub> (mg/L, CI 95%)	LC <sub>95</sub> (mg/L, CI 95%)	Inclination ± DP
<i>A. zerumbet</i>	1687	36.6 (30.8 – 42.5)	66.3 (55.9 – 85.2)	78.4 (64.6 – 106.3)	4.979 ± 0,237
<i>E. langsdorffii</i>	1681	53.5 (33.7 – 78)	103.9 (72.9 – 399.9)	125.4 (83.6 – 690.8)	4.447 ± 0,240

<sup>a</sup> number of exposed larvae, LC: Lethal concentration, CI: Confidence interval.

Larvicidal test showed two predominant species with great potential, *A. zerumbet* and *E. langsdorffii*. The most potent EO was *A. zerumbet* (LC<sub>50</sub> = 36.6 mg/L, LC<sub>90</sub> = 66.3 mg/L), followed by *E. langsdorffii* (LC<sub>50</sub> = 53.5 mg/L, LC<sub>90</sub> = 103.9 mg/L). These results differ from a previous work that found the essential oil of *A. zerumbet* with a LC<sub>50</sub> of 313 µL/mL against *A. aegypti* larvae even though its chemical composition was found to be very similar to that found in this study (17.9% of 1-8-cineole, 17.8% terpinen-4-ol, 14.5% γ-terpineno, 12.9% p-cymene and 9.2% sabinene) (Cavalcante et al., 2004). In another study, the essential oil of this species showed

mortality 100% of the larvae after 5 min (2.5 and 2.0  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), with  $\text{LC}_{50} = 0.94 \mu\text{L}/\text{mL}$  and  $\text{LC}_{90} = 1.2 \mu\text{L}/\text{mL}$  (Freitas et al., 2010).

The major compounds found in *A. zerumbet* ( $\gamma$ -terpineno, terpinen-4-ol, and 1,8-cineole) were evaluated for larvicidal activity against *A. aegypti* and presented  $\text{LC}_{50}$  values of 0.4, 38.77 and, 53.63  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , respectively (Lucia & Masuh, 2013). Another study showed a mild larvicidal activity for 1,8-cineole ( $\text{LC}_{50} = 181.3 \mu\text{L}/\text{mL}$ ) against the larval stages of *A. aegypti* (Sarma, 2019).

*A. zerumbet*, popularly known in Brazil as cologne due to its aromatic scent, is native to the tropical and subtropical regions of Asia (Kress et al., 2005) and was brought to Brazil in the 19th century (Corrêa, 1975). It is easily found in the northeast region of Brazil (Mendes et al., 2015), from where it spread throughout the country. *E. langsdorffii* is endemic to the Cerrado (Mazine et al., 2022).

#### 4. Conclusion

The larvicidal activity of EOs of plants native or cultivated in the Cerrado was investigated in this study. The essential oils obtained from the six different species differed regarding their larvicidal effects on *A. aegypti*. All species are easily cultivated. Two oils (*A. zerumbet* and *E. langsdorffii*) showed high larvicidal activity against *A. aegypti*. And as far as we know, this is the first time *E. langsdorffii* larvicidal effects have been reported. Field bioassays with *A. zerumbet* and *E. langsdorffii* should be performed to analyse the mortality response of *Ae. aegypti*.

#### CRediT authorship contribution statement

**Raíssa Rosa Pessoa Cruzeiro:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft. **Noel William Davies:** Methodology, Investigation, Writing – review & editing. **Marcos Takashi Obara:** Methodology, Validation, Resources, Formal analysis, Writing – review & editing, Supervision. **Damaris Silveira:** Methodology, Validation, Resources, Formal analysis, Writing – review & editing, Supervision. **Kicia Karinne Pereira Gomes-Copeland:** Conceptualization, Methodology, Supervision. **Daniela Aparecida de Castro Nizio:** Methodology, Statistical Analysis. **Christopher William Fagg:** Methodology, Resources, Plant material, Formal analysis, Writing – review & editing, Supervision.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the financial support of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos/MCTI). Also, of FAPDF (Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal), for Dr Davies Visiting Professor Grant (Process number 0193.00000542/2018-63).

#### REFERENCES

Araújo JP, Araújo ME, Souto A, Parente CL, Geise L. The influence of seasonality, tide and time of activities on the behaviour of *Sotalia guianensis* (Van Bénédén) (Cetacea, Delphinidae) in Pernambuco, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 2007;24(4):1122-1130. doi:10.1590/s0101-81752007000400032

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2010. *Farmacopeia Brasileira*. Brasília: ANVISA. V.2, 546p.

Bianchini NH, Da Silva DT, Schindler B, Muniz MF, Heinzmann BM. Antifungal activity of essential oils from native tree species in southern Brazil. *FLORESTA*. 2022;52(2):304. doi:10.5380/rf.v52i2.78343

Bonzani da Silva J, Grotta A de S. Anatomia da folha e óleo essencial de *Baccharis retusa* DC., Compositae [Anatomy of the leaf and essential oil of *Baccharis retusa* DC., Compositae]. *Rev Farm Bioquim Univ Sao Paulo*. 1971;9(2):321-326.

Cavalcanti ES, Morais SM, Lima MA, Santana EW. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004;99(5):541-544. doi:10.1590/s0074-02762004000500015

Chisowa EH. Chemical Composition of Flower and Leaf Oils of *Cymbopogon densiflorus* Stapf from Zambia. *Journal of Essential Oil Research*. 1997; 9(4):469-470. <https://doi.org/10.1080/10412905.1997.9700752>

Corrêa, P., 1975. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura e IBDF. v.6, 345p.

Costa OB, Del Menezzi CH, Benedito LE, Resck IS, Vieira RF, Ribeiro Bizzo H. Essential Oil Constituents and Yields from Leaves of *Blepharocalyx salicifolius* (Kunt) O. Berg and *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) collected during Daytime. *International Journal of Forestry Research*. 2014; 2014:1-6. doi:10.1155/2014/982576

de França GVA, Rocha MS, de Araújo VEM, Alves R S de M, Gomes J do A, Bezerra AB. Boletim epidemiológico vol 53 - nº 7. de Medeiros AC, Soares BL, Fernandes Cde FR, Rohlf DB, eds. *Boletim Epidemiológico*. 2022;53(7):1-36.

de Jesus GS, Micheletti AC, Padilha RG et al. Antimicrobial potential of essential oils from cerrado plants against multidrug-resistant foodborne microorganisms. *Molecules*. 2020;25(14):3296. doi:10.3390/molecules25143296

de Pooter, HL., Aboutabl, EA., El-Shabrawy, A.O. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of leaf, stem and rhizome of *Alpinia speciosa*. *Flavour Fragr. J.*, 1995;10: 63-67. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730100202>.

de Souza MA, da Silva L, dos Santos MA et al. Larvicidal activity of essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Current Pharmaceutical Design*. 2020;26(33):4092-4111. doi: 10.2174/1381612826666200806100500

Etou Ossibi AW, Elouma Ndinga MA, Epa C et al. Chemical composition and diuretic potential of the essential oil of *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf. (Poaceae) in the mouse. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2020;13(6):2777. doi:10.4314/ijbcs.v13i6.28

Ferracini VL, Paraíba LC, Leitão Filho HF, da Silva AG, Nascimento LR, Marsaioli AJ. Essential oils of seven Brazilian *Baccharis* species. *Journal of Essential Oil Research*. 1995;7(4):355-367. doi:10.1080/10412905.1995.9698542

Figueredo FG, Lucena BF, Tintino SR et al. Chemical composition and evaluation of modulatory of the antibiotic activity from extract and essential oil of *Myracrodruon urundeuva*. *Pharmaceutical Biology*. 2013;52(5):560-565. doi:10.3109/13880209.2013.853810

Furtado F, Borges B, Teixeira T et al. Chemical Composition and Bioactivity of Essential Oil from *Blepharocalyx salicifolius*. International Journal of Molecular Sciences. 2018;19(1):33. doi:10.3390/ijms19010033

Ghosh A, Chowdhury N, Chandra G. Plant extracts as potential mosquito larvicides. The Indian journal of medical research. 2012;135(5):581

Gong X, Ren Y. Larvicidal and ovicidal activity of carvacrol, p-cymene, and  $\gamma$ -terpinene from *Origanum vulgare* essential oil against the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). Environmental Science and Pollution Research. 2020;27(15):18708-18716. doi:10.1007/s11356-020-08391-2

Gutiérrez LA. Paho/who data - annual Arbovirus Bulletin 2021: Paho/WHO. Pan American Health Organization / World Health Organization. <https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/annual-arbovirus-bulletin-2021.html>. Published April 25, 2022. Accessed June 28, 2022.

Hernández JJ, Ragone MI, Bonazzola P, Bandoni AL, Consolini AE. Antitussive, antispasmodic, bronchodilating and cardiac inotropic effects of the essential oil from *Blepharocalyx salicifolius* leaves. Journal of Ethnopharmacology. 2018;210:107-117. doi:10.1016/j.jep.2017.08.013

Huong LT, Huong TT, Huong NT et al. Mosquito Larvicidal Activity of the Essential Oil of *Zingiber collinsii* against *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus*. Journal of Oleo Science. 2020; 69(2):153-160. doi:10.5650/jos.ess19175

Imperato PJ. The Convergence of a Virus, Mosquitoes, and Human Travel in Globalizing the Zika Epidemic. Journal of Community Health. 2016;41(3):674-679. doi:10.1007/s10900-016-0177-7

Kerdudo A, Ellong EN, Burger P et al. Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of flowers essential oils of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burt & R.M.Sm. from Martinique island. Chemistry & Biodiversity. 2017;14(4):e1600344. doi:10.1002/cbdv.201600344

Kress WJ, Liu AZ, Newman M, Li QJ. The molecular phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): a complex and polyphyletic genus of ginger. American Journal of Botany. 2005;92(1):167-178. doi:10.3732/ajb.92.1.167

Lucia A, Zerba E, Masuh H. Knockdown and larvicidal activity of six monoterpenes against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and their structure-activity relationships. Parasitology Research. 2013;112(12):4267-4272. doi:10.1007/s00436-013-3618-6

Mazine FF, et al. Eugenia in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB10338>>. Accessed on: 18 Jul. 2022.

Mendes FR, Silva FG, Sousa EO et al. Essential oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt. & R.M. Sm. (Zingiberaceae): chemical composition and modulation of the activity of aminoglycoside antibiotics. Journal of Essential Oil Research. 2015;27(3):259-263. doi:10.1080/10412905.2015.1014935

Moraes MM, Camara CA, Santos ML, Fagg CW. Essential oil composition of *Eugenia langsdorffii* O. Berg.: relationships between some terpenoids and toxicity against *Tetranychus urticae*. Journal of the Brazilian Chemical Society. 2012;23(9):1647-1656. doi:10.1590/s0103-50532012005000029

Pereira GL, Almeida TC, Seibert JB et al. Antitumor effect of *Cymbopogon densiflorus* (Linneu) essential oil in bladder cancer cells. *Natural Product Research*. 2020;1-5. doi:10.1080/14786419.2020.1747453

Rebouças de Araújo ÍD, Coriolano de Aquino N, Vêras de Aguiar Guerra AC et al. Chemical composition and evaluation of the antibacterial and Cytotoxic activities of the essential oil from the leaves of *Myracrodruon urundeuva*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017;17(1). doi:10.1186/s12906-017-1918-6

Rezende ME, Jasmim JM, Caprini GP, Sousa EF, Schripsema J, Thiébaud JT. Teor e composição química do óleo essencial de Alpinia em razão da adubação e da disponibilidade de água no solo. *Revista Ceres*. 2011;58(2):208-215. doi:10.1590/s0034-737x2011000200012

Santos SR, Melo MA, Cardoso AV, Santos RL, de Sousa DP, Cavalcanti SC. Structure–activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. *Chemosphere*. 2011;84(1):150-153. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.02.018

Sarma R, Adhikari K, Mahanta S, Khanikor B. Combinations of plant essential oil-based terpene compounds as larvicidal and adulticidal agent against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Scientific Reports*. 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-45908-3

Seibert JB, Viegas JS, Almeida TC et al. Nanostructured systems improve the antimicrobial potential of the essential oil from *Cymbopogon densiflorus* leaves. *Journal of Natural Products*. 2019;82(12):3208-3220. doi:10.1021/acs.jnatprod.8b00870

Silva RL, Mello TR, Sousa JP et al. Brazilian Cerrado biome essential oils to control the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Industrial Crops and Products*. 2022;178:114568. doi:10.1016/j.indcrop.2022.114568

World Health Organization & UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 2017. Global vector control response 2017-2030. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259205>

World Health Organization, 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69101>

World Health Organization, 2016. Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations: interim guidance for entomologists. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204588>