UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

Composição química, atividade larvicida, repelente e deterrente da oviposição de *Aedes aegypti* do óleo essencial de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillet (Burseraceae)

RAYANE CRISTINE SANTOS DA SILVA

RECIFE
2013

RAYANE CRISTINE SANTOS DA SILVA

Composição química, atividade larvicida, repelente e deterrente da oviposição de *Aedes aegypti* do óleo essencial de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillet (Burseraceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Nicácio Henrique da Silva
Área de concentração: Florística e Sistemática Vegetal
Linha de Pesquisa: Botânica Aplicada

RECIFE
2013

Catalogação na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Rayane Cristine Santos da
Composição química, atividade larvicida, repelente e deterrente da ovoposição de *Aedes aegypti* do óleo essencial de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gilett (Burseraceae) / Rayane Cristine Santos da Silva. – Recife: O Autor, 2016.
52 f.: il.
.
Orientador: Nicácio Henrique da Silva
Dissertação (graduação) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, 2016.
Inclui referências e apêndices

1. Aedes aegypti 2. Mosquito – Controle I. Silva, Nicácio Henrique da (orient.) II. Título.

595.772 CDD (22.ed.) UFPE/CCB-2016-322

RAYANE CRISTINE SANTOS DA SILVA

"COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE LARVICIDA, REPELENTE E DETERRENTE DA OVIPOSIÇÃO DE *Aedes aegypti* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillet (Burseraceae)".

APROVADA EM 28 DE FEVEREIRO DE 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Nicácio Henrique da Silva (Orientador) – UFPE

Dra. Maria Estrella Legaz Gonzalez – Univ. Complultense de Madrid

---

Dr. Antônio Fernando Morais de Oliveira - UFPE

RECIFE – PE
2013

Dedico:

A José Lindoval, meu pai e herói. Meus maiores passos foram dados porque tive grandes mãos para me sustentar (in memoriam).

Saudades eternas!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Nicácio Henrique por ter me fornecido toda a base de conhecimento cientifico que adquiri durante quase seis anos sob sua orientação, pelas vezes em que foi à minha frente abrindo caminhos e pela presença em momentos importantes da minha vida.

A Profa. Dr[a.] Daniela Navarro por ter me dado a oportunidade de desenvolver meus experimentos no Laboratório de Ecologia Química, onde pude ampliar conhecimentos e aprender novas técnicas.

A todos os integrantes do Laboratório de Produtos Naturais que de forma direta ou indireta me ajudaram e me acompanharam durante essa jornada.

Ao Dr. Paulo Milet-Pinheiro pela disponibilidade de ter me ensinado e ajudado durantes os experimentos eletrofisiológicos.

A Patrícia Bezerra por ter me ajudado nas análises cromatográficas e por ter se tornado uma nova amiga, aguentando minha falta de simpatia todas as vezes que um experimento não dava certo.

A Geanne Novais e Kamilla Dutra por terem me iniciado nas técnicas relacionadas à atividade biológica com *Aedes aegypti*.

A Dr[a]. Kelly Paixão pela disponibilidade e ajuda com os experimentos de olfatometria.

A Alexandre Gomes pela ajuda nas coletas de campo e identificação do material botânico.

As meninas do Laboratório de Ecologia Química e aos rapazes que de forma direta ou indireta me ajudaram.

Aos colegas da turma do mestrado, e em especial a Larissa Trigueiros por ter se tornado uma amiga e ter sido sempre aquela expectadora que coloca um sorriso positivo enquanto você faz as apresentações de trabalho mais tensas da sua vida.

A Dr[a]. Mônica Martins que me acompanhou em todas as minhas experiências científicas e sempre é uma opinião importante em meus trabalhos.

Aos meus amigos que me escutaram, acompanharam, trouxeram alegria e oraram por mim nesses dois anos que nem sempre foram fáceis.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A minha querida família, mãe, pai, e irmã, que me acompanharam, ensinaram valores e deram suporte durante toda a minha vida, vocês são minha base forte. Especialmente a minha mãe pelas idas à Universidade nos finais de semana e feriados desde os tempos da Rural, sempre no sentido de proteção. E ao meu pai que apesar de não estar mais presente nesta vida seus valores, amor e carinho perduram.

E principalmente a Deus pela vida, capacitação, sustento e amor.

Resumo

O *Aedes aegypti* é um mosquito de grande importância epidemiológica por ser o vetor de viroses como a febre amarela e a dengue estando distribuído entre as regiões tropicais e subtropicais do globo. A fim de encontrar uma forma alternativa de combate ao mosquito, objetivou-se avaliar no presente estudo, a caracterização química do óleo essencial de *Commiphora leptophloeos* e sua atividade biológica frente *A. aegypti* através de análises eletrofisiológicas, testes de atividade larvicida, repelente e deterrente de oviposição. As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa revelaram a presença de 55 compostos no óleo essencial de *C. leptophloeos* sendo o α- Felandreno, trans-Cariofileno e β- Felandreno os constituintes do óleo presentes em maior proporção, representando 26,26%, 18,01% e 12,93% respectivamente. Através de cromatografia gasosa acoplada à detecção eletroantenográfica foram obtidas 17 respostas aos constituintes do óleo, sendo em sua maioria a sesquiterpenos, estando entre elas o trans- Cariofileno, um dos compostos majoritários do óleo. A partir dos testes comportamento de oviposição com fêmeas grávidas de *A. aegypti* foi possível observar que o óleo essencial de *C. leptophloeos* apresentou atividade deterrente de oviposição nas concentrações de 100, 50 e 25 ppm, sendo a média de ovos deixadas no recipiente de teste menor que o depositado no controle ($p<0,008$). Testes de oviposição também foram realizados com o composto majoritário do óleo o α-Felandreno, e dois compostos que apresentaram respostas eletrofisiológicas (trans-Cariofileno e α-Humuleno). O α-Felandreno não demonstrou atividade significativa. O trans-Cariofileno, em contrapartida, se mostrou deterrente de oviposição ($p<0,004$), assim como o α-Humuleno ($p<0,003$). O óleo de *C. leptophloeos* não demonstrou atividade biológica em relação ao teste de repelência em olfatômetro de dupla escolha. A atividade larvicida foi constatada com CL_{50} de 99,4 ppm. Nesse contexto, os resultados demonstram que o óleo essencial de *C. leptophloeos* é uma fonte promissora de compostos que induzem respostas comportamentais em fêmeas de *A. aegypti* que buscam por um sítio de oviposição, havendo respostas deterrentes entre os diferentes compostos, além de atuar como agente larvicida.

Palavras-chave: *Aedes aegypti, Commiphora*, cromatografia gasosa, eletroantenografia, oviposição, voláteis.

Abstract

Aedes aegypti has a large epidemiological importance for being the vector of viruses, such as yellow fever and dengue fever, being distributed across the tropical and subtropical regions of the globe. To find an alternative way for eradicating the mosquito, in this study it was evaluated the chemical characterization of the essential oil of *Commiphora leptophloeos* and its biological activity against *A. aegypti* through electrophysiological analyzes and tests of larvicidal activity, repellent and oviposition deterrent. The analysis by gas chromatography-mass spectrometry revealed the presence of 55 compounds in the essential oil of *C. leptophloeos* being the α-phellandrene, trans-caryophyllene and β-phellandrene the constituents present in greater proportion, representing 26.26%, 18.01% and 12.93% respectively. By gas chromatography- electroantennographic detection were obtained 17 responses to the constituents of the oil, most of them being the sesquiterpenes, among them trans-Caryophyllene, one of the major compounds from the oil. From behavior for oviposition, tests with pregnant females of *A. aegypti* reveled that the essential oil of *C. leptophloeos* showed oviposition deterrent activity at concentrations of 100, 50 and 25 ppm and the average of eggs left on the test vessel was smaller than the average deposited in the control vessel. Oviposition test were also carried out with the α-phellandrene, the major compound of the oil, and two compounds that showed electrophysiological responses (trans-caryophyllene and α-humulene). The α-phellandrene showed no significant activity. The trans-Caryophyllene, in contrast, showed oviposition deterrent ($p < 0.004$), as well as α-Humulene ($p < 0.003$). The oil of *C. leptophloeos* not demonstrated biological activity against the test repellency dual choice olfactometer. The larvicidal activity was observed with LC_{50} of 99.4 ppm. In this context, the results show that the essential oil of *C. leptophloeos* is a promising source of compounds that induce behavioral responses in female of *A. aegypti* seeking for an oviposition site, with answers deterrents between the different compounds, in addition to acting as an agent larvicide.

Keywords: *Aedes aegypti*, *Commiphora*, gas chromatography, electroantennography, oviposition, volatile.

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1. Locais de ocorrência de *Commiphora leptophloeos* no Brasil..... **17**

Figura 2. Ciclo de vida de *Aedes aegypti* demonstrando a fase de ovo, larva, pupa e adulto..... **19**

CAPÍTULO 1

Figura 1. Respostas de oviposição de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* ao óleo essencial de *Commiphora leptophloeos*..... **40**

Figura 2. Percepção dos compostos do óleo essencial de *Commiphora leptophloeos* pelas antenas de *Aedes aegypti* através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa..... **42**

Figura 3. Respostas de oviposição de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* aos compostos majoritários do óleo essencial de *Commiphora leptophloeos* e compostos que apresentaram respostas eletrofisiológicas..... **43**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Identificação dos constituintes do óleo essencial obtido de folhas de *Commiphora leptophloeos*..... **37**

Tabela 2. Comparação entre os compostos voláteis de óleos essenciais que se apresentam em maior proporção em espécies de *Commiphora* e suas proporções realtivas no óleo de *Commiphora leptophloeos*..... **39**

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS
RESUMO
ABSTRACT
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
1. APRESENTAÇÃO 12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 13
2.1. Metabólitos secundários vegetais 13
2.2. Considerações sobre família, gênero e espécie: 15
2.2.1. A família Burseraceae 15
2.2.2. O gênero *Commiphora* 15
2.2.3. A espécie *Commiphora leptophloeos* (Mart.) JB Gillett 17
2.3. Biologia e problemática de *Aedes aegypti* L. 18
2.4 Medidas de combate e monitoramento 20
2.4.1 Produtos naturais e o controle de *Aedes aegypti* 21
3. Referencias bibliográficas 23
CAPÍTULO 1 29
Resumo 30
1. Introdução 31
2. Materiais e Métodos 32
2.1. Coleta do material vegetal 32
2.2. Obtenção do óleo essencial 32
2.3. Análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa.. 33
2.4. Análises eletrofisiológicas 34
2.5. Criação das larvas e mosquitos 34
2.6. Bioensaio Larvicida 35
2.7. Bioensaio de oviposição 35
3. Resultados e Discussão 36
4. Conclusão 45
5. Referencias bibliográficas 45
6. APENDICES 51
6.1. Apêndice A: Procedimentos para montagem dos experimentos eletrofisiológicos 52
6.2. Apendice B: Procedimentos para montagem dos experimentos de oviposição 53

1. APRESENTAÇÃO

O Brasil é um país que apresenta uma grande diversidade climática e geográfica, que é refletida na sua fauna e flora, não podendo abdicar do seu potencial para o desenvolvimento de produtos naturais. De modo geral, a natureza tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas, sendo os metabólitos secundários produzidos por plantas, os compostos que tiveram papel fundamental no desenvolvimento da química orgânica sintética moderna (MONTANARI; BOLZANI, 2001). Esses compostos orgânicos, por sua vez, podem ser potencialmente estudados para o desenvolvimento de fármacos de origem natural ou ainda bioinseticidas menos tóxicos aos mamíferos e ao meio ambiente.

O Aedes aegypti é um mosquito de grande importância epidemiológica por ser o vetor conhecido da dengue e febre amarela. Está distribuído nas áreas tropicais e subtropicais do globo, sendo o principal vetor dos quatro sorotipos do vírus da dengue. A temperatura e o fator climático são preponderantes para o seu desenvolvimento, onde a precipitação pluviométrica atua diretamente na abundância do mosquito por aumentar a densidade de criadouros artificiais. Por ser um mosquito antropofílico, os locais de maior incidência são onde há maior concentração humana, onde os ambientes são propícios à sua reprodução (BESERRA et al., 2006).

A prevenção do desenvolvimento de larvas ainda tem sido um método muito eficaz no combate ao mosquito, porém este requer a reeducação da população a fim de que os cuidados domésticos sejam mantidos regularmente, o que normalmente não acontece. A fim de amenizar a proliferação do mosquito, tem sido feito o uso de inseticidas e armadilhas de captura, porém o surgimento de formas resistentes tem se mostrado um dos principais obstáculos no que diz respeito ao seu controle. Essa resistência resulta no aumento da freqüência de aplicação e aumento das dosagens, que podem refletir em efeitos colaterais em plantas e humanos, danos ambientais e surgimento de doenças (SIMAS et al., 2004). Nesse contexto, torna-se importante a investigação de substâncias naturais alternativas que possuam atividade larvicida e repelente de sua oviposição, como uma fonte menos ofensiva ao meio ambiente.

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial do óleo essencial de folhas de *Commiphora leptophloeos*, uma espécie da família Burseraceae bem distribuída

no nordeste brasileiro, contra o *Aedes aegypti*, analisando sua atividade larvicida e de deterrência de oviposição.

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Metabólitos secundários vegetais

As plantas vasculares contêm uma grande variedade de compostos químicos secundários que são diferentes dos seus metabolitos primários, os quais variam de acordo com a família e a espécie. Muitos desses compostos são restritamente distribuídos, podendo ser utilizados como marcadores taxonômicos, sendo os metabólitos secundários os compostos químicos de maior contribuição, e responsáveis por algumas características das plantas como, por exemplo, odor, sabor e cor (BENNETT; WALLSGROVE, 1994). Desde o século XIX estudos sobre plantas foram direcionados com base científica, resultando no isolamento de princípios ativos com características medicinais, os quais até hoje ainda são empregados no tratamento de doenças como a morfina, quinina, cânfora e cocaína (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

A taxa de produção dos metabólitos secundários e a sua constituição também variam de acordo com padrões ambientais, como ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação UV, nutrientes, altitude, ataque de patógenos e outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Os danos causados a uma planta por ataque de um herbívoro ou microrganismo frequentemente resultam na produção de compostos químicos que reduzem a aceitação do órgão ou de toda a planta, prevenindo ataques futuros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Terpenóides e metabólitos secundários relacionados se mostram como fatores importantes na resistência de plantas a insetos, eles atuam com propriedades antialimentares, tóxicas e modificando o seu desenvolvimento (HARBORNE, 1988).

Nesse contexto, os óleos essenciais são compostos orgânicos voláteis produzidos por algumas plantas, que conferem características como aroma e sabor, e também podem ser utilizados na natureza para comunicação com insetos (TISSERAND; YOUNG, 2014). A sua composição frequentemente contém um número variado de constituintes, porém geralmente um ou dois compostos apresentam-se em maior quantidade, e conferem suas propriedades

fisiológicas (TISSERAND; YOUNG, 2014). Os óleos essenciais são formados por terpenóides e por hidrocarbonetos voláteis aos quais um grupo funcional é adicionado, podendo pertencer as classes dos álcoois, aldeídos, ésteres, fenóis e outros (BLUCKLE, 2014). Os terpenos formam o maior grupo de matabólitos secundários e são formados pela via do ácido Mevalônico (BLUCKLE, 2014). Nessa via, o ácido mevalônico contendo seis carbonos é convertido em uma estrutura contendo cinco carbonos, chamada de isopreno. A condensação de duas unidades de isopreno forma estruturas contendo 10 carbonos, conhecidas como monoterpenos, a condensação de três unidades formam os sesquiterpenos (15 carbonos), e de quatro unidades os diterpenos (20 carbonos) (BLUCKLE, 2014).

Os óleos essenciais possuem uma grande importância para indústria sendo utilizados na fabricação de fragrâncias, sabões, cremes, perfumes, bebidas alcoólicas, condimentos, sorvetes, gelatinas e outros artefatos (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993; GUIMARÃES; SOUSA; FERREIRA, 2010). Diversos conglomerados internacionais negociam os óleos essenciais como matéria prima, principalmente para produção de aromas e fragrâncias, nesse contexto, o Brasil tem se destacado pela produção de óleos essenciais de cítricos, que são utilizados como subprodutos da indústria de sucos (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Uma diversidade de aplicações biológicas são encontradas na literatura reportando a ação dos óleos essenciais. Em estudo contra insetos praga de grãos armazenados Regnault-Roger e colaboradores (1993) observaram a atividade tóxica do óleo essencial de *Thymus serpyllum* e *Origanum majorama* contra o caruncho *Acanthoscelides obtectus*. O eugenol, componente majoritário de *Ocimum suave*, foi testado contra *Sitophilus granarius*, *Sitophilus zeamais*, *Tribolium castaneum* e *Prostephanus trucatus*, apresentando mortalidade de todos os besouros dentro de 24h, além de demonstrar repelência e inibição do desenvolvimento de ovos e imaturos, em grãos tratados com eugenol (OBENG-OFORI; REICHMUTH, 1997). Restello, Menegatt e Mossi (2009) ainda, observaram a atividade inseticida e repelente do óleo de *Tagetes pátula* sobre *Sitophilus zeamais*. Estudos sobre o uso de óleos essenciais frente a pragas de plantas também já foram reportados. Tunç e Sahiankaya (2003) observaram uma mortalidade de 99% para o ácaro *Tetranychus cinnabarius*, o pulgão do algodoeiro e *Aphis gossypii* expostos à vapores de óleos essenciais de cominho (*Cuminum cyminum*), anis (*Pimpinella anisum*) e orégano (*Origanum syriacum*). Dessa forma, é possível observar que os óleos essenciais e seus constituintes apresentam um amplo espectro de atividade, exibindo sua importância sob diversas áreas.

2.2 Considerações sobre família, gênero e espécie:

2.2.1 A família Burseraceae

A família Burseraceae possui cerca de 750 espécies em 19 gêneros, possuindo uma distribuição pantropical (DALY, FINE, MARTÍNEZ-HABIBE, 2012). Compõe uma parte importante das florestas úmidas e secas de muitas partes dos trópicos, e por possuírem canais resiníferos em suas cascas, são conhecidas como fonte de resinas (DALY FINE, MARTÍNEZ-HABIBE, 2012; LEENHOUTS, 1956). A família está dividida nas tribos Canarieae, Protieae e Bursereae e pertence à ordem Sapindales (WEEKS; DALY; SIMPSON 2005).

As resinas hidrofóbicas exsudadas da casca de várias espécies de Burseraceae, comumente são usadas como componentes na preparação de vernizes e são conhecidas como Elemi (CRUZ-CAÑIZARES et al., 2005). O gênero *Protium* é um dos mais heterogêneos da família e suas resinas são utilizadas na medicina popular para curar feridas, como antissépticos, e a inalação da fumaça como analgésico (RÜDIGER; SIANI; JUNIOR, 2007).

Algumas rezinas encontradas na família também possuem caráter hidrofílico, a Mirra do gênero *Commiphora* e o Olíbano (incenso) do gênero *Boswellia* são produtos resinosos utilizados na medicina e em cosméticos (SHEN et al., 2012). Em estudo conduzido por Lemenih, Abebe e Olsson (2003), mostrou-se o importante papel econômico que essas óleo-resinas desempenham em comunidas rurais. No Líbano, por exemplo, o incenso obtido de *Boswellia neglecta* e *B. ogadensis*, a mirra obtida de *Commiphora myrrha*, *C. truncata* e *C. borensis* e o Agar obtido de *C. africana*, contribuem para cerca de 32.6% da renda anual das famílias, ficando em segundo lugar, após a pecuária no sustento geral doméstico (LEMENIH; ABEBE; OLSSON, 2003).

2.2.2 O gênero *Commiphora*

O gênero *Commiphora* Jacq. possui cerca de 190 espécies, sendo aproximadamente 150 espécies de origem africana distribuídas no deserto e em regiões secas. Fora do

continente Africano, sua distribuição ocorre em ambientes similares como em Madagascar, Oriente Médio, Índia, Siri Lanka e América do Sul (WEEKS; SIMPSON, 2007). Análises filogenéticas sugerem que *Bursera* é um gênero monofilético intimamente relacionado ao gênero *Commiphora* (BECERRA, 2003). Gillet (1980) demonstrou em seu trabalho a necessidade de avaliar as diferenças entre ambos os gêneros, indicando a presença de *Commiphora* na América do Sul e transferindo *Bursera leptophloeos* para *Commiphora leptophloeos*. Em trabalho de Becerra (2003) essa transferência de gênero pôde ser confirmada através de análises filogenéticas utilizando-se sequências das regiões ITS, 5S-NTS e ETS de DNA ribossomal nuclear, indicando que *Bursera leptophloeos* na verdade estaria dentro do gênero *Commiphora*.

Muitas resinas exsudadas do gênero *Commiphora* são habitualmente utilizadas como perfumes, incensos ou pomadas, e suas propriedades medicinais também são bastante exploradas por comunidades tradicionais. Numerosos canais secretores são encontrados na casca das árvores do gênero, formando cavidades das quais as resinas fluem a partir de um ferimento (LANGENHEIM, 2003). A mirra, por exemplo, é uma resina produzida por várias espécies do gênero *Commiphora.* Existem relatos de que a mirra era utilizada nos processos de mumificação, e queimada dentro dos templos para perfumar as múmias no Egito (LANGENHEIM, 2003).

Mais de 300 moléculas já foram identificadas para o gênero, e dentre os mono e sesquiterpenos, alguns compostos estão distribuídos amplamente entre as espécies, como α-pineno, canfeno, β-pineno, mirceno, limoneno, β-elemeno, α-copaeno, germacreno B e outros, comumente encontrados em óleos voláteis (SHEN et al., 2012).

Em seu trabalho de revisão bibliográfica, Shen e colaboradores (2012) relatam os diversos usos medicinais de espécies de *Commiphora*, dentre eles usos tradicionais como no tratamento de dores, fraturas, inflamações, reumatismo, infecções, congestão nasal, dor de garganta, febre, repelente de pragas em animais, e usos farmacológicos como antitumoral, anti-inflamatório, analgésico, antimicrobiano, hipotensivo, antiparasitário e outros. Em trabalho desenvolvido por PARASKEVA (2008), foi comprovada a atividade anticâncer, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e não citotóxica de várias espécies de *Commiphora* que ocorrem na África do Sul.

2.2.3 A espécie *Commiphora leptophloeos* (Mart.) JB Gillett

Imburana, Imburana de cheiro ou Imburana de espinho são alguns dos nomes vulgares dados à *Commiphora leptophloeos*, uma espécie arbórea de comportamento decíduo, que pode atingir cerca de 12 metros de altura e 60 cm de diâmetro quando em fase adulta. Sua casca possui espinhos, suas folhas possuem disposição alterna e coloração verde clara quando jovens, possuindo um aroma suave quando machucadas, suas flores são pequenas medindo de 3 a 4 mm de comprimento e seus frutos são do tipo drupa (CARVALHO, 2009). *C. leptophloeos* está bem distribuída no Nordeste do Brasil sendo uma espécie nativa e endêmica, podendo também ser encontrada em estados da região Sudeste e Centro-Oeste, como demonstrado na figura 2 (CARVALHO, 2009). Do ponto de vista ecológico é considerada uma espécie pioneira, constituindo cerca de 90 a 95% do extrato arbóreo da caatinga arbóreo-arbustiva, apresentando uma dispersão ampla e descontínua (CARVALHO, 2009).

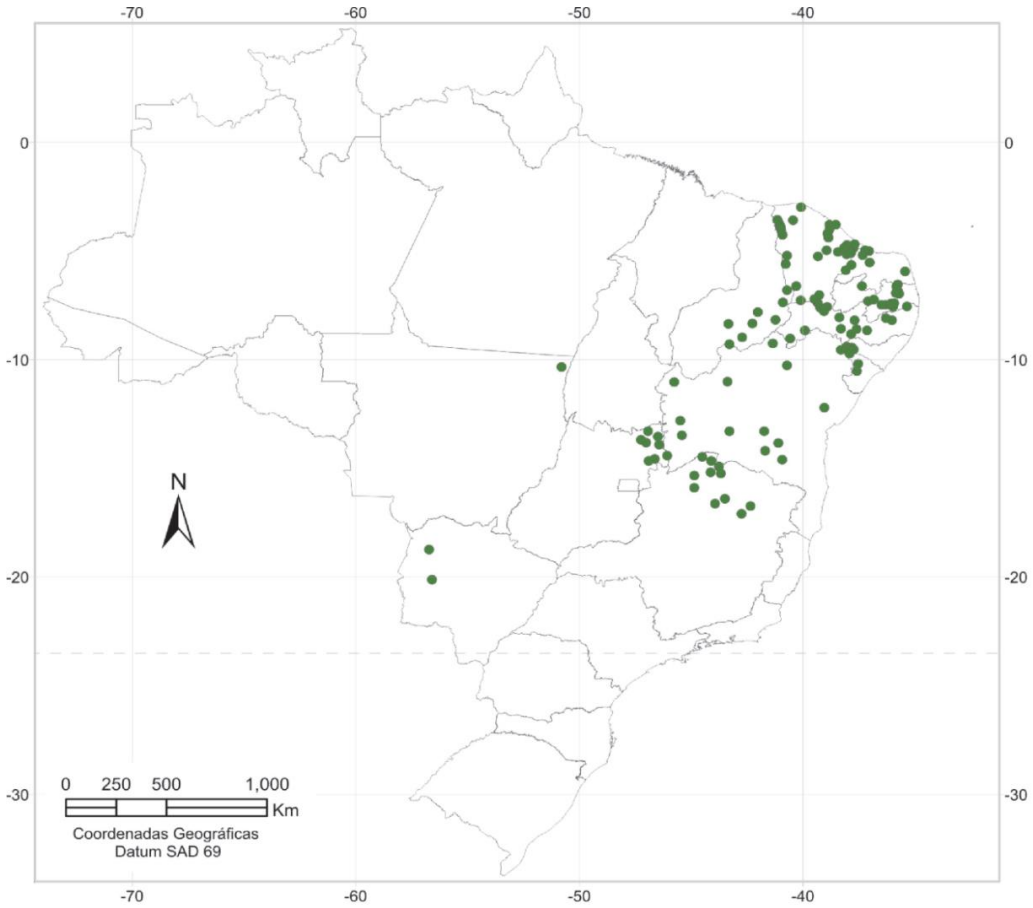

Fig. 1: Locais de ocorrência de *Commiphora leptophloeos* no Brasil.
Fonte: CARVALHO, 2009.

Diversos estudos relatam sobre os usos etnobotânico de *C. leptophloeos*, como por exemplo, o seu potencial no tratamento de doenças como gripe, tosse, bronquite, dor de estômago, problemas renais, inflamações em geral, cólicas, diarreia, dor de dente, disfonia e outras aplicações (ALBUQUERQUE et al., 2007; AGRA et al., 2007; CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010; FERREIRA JÚNIOR et al., 2011). Dentre as formas de preparação empregadas, estão a decocção e o xarope, para ingerir ou passar sobre a área afetada, e a casca e o caule estão entre as partes da planta mais utilizadas (ALBUQUERQUE et al., 2007; AGRA et al., 2007; CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010). Lucena e colaboradores (2012) em seu estudo na comunidade de Barrocas e Cachoeira, Paraíba, observaram que *C. leptophloeos* estava dentre as plantas com maior valor de uso geral, havendo citações para as categorias medicinal, veterinária, tecnológica, construção e combustível.

Trentin e colaboradores (2011) em seu trabalho cientifico, ainda comprovaram a atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis* do extrato aquoso da casca e do caule de *C. leptophloeos*, obtendo umas das menores taxas de formação de biofilme e nenhum crescimento bacteriano no teste de crescimento planctônico a 4 mg/mL dentre as plantas estudadas. Um outro estudo avaliando a atividade do decocto de *Nasutitermes corniger*, crescido sobre diferentes espécies vegetais frente *Escherichia coli*, demonstrou que o extrato de *N. corniger* quando crescido sobre *C. leptophloeos* apresentou um efeito sinérgico ou aditivo junto ao antibiótico gentamicina e neomicina reduzido a MIC no combate à *E. coli*, evidenciando a importância do substrato de crescimento na atividade antimicrobiana de *N. corniger* (COUTINHO et al., 2009).

2.3 Biologia e problemática de *Aedes aegypti* L.

O *Aedes aegypti* é um mosquito oriundo da África, originalmente descrito no Egito, o que lhe atribuiu o nome específico (BRAGA; VALLE, 2007). Está distribuído em geral, entre as latitudes 35º Norte e 35º Sul, ocupando as regiões tropicais e subtropicais do hemisfério (BRAGA; VALLE, 2007). Este mosquito possui preferência por recipientes contendo água relativamente limpa para depositar seus ovos, principalmente em lugares sombreados e de fundo ou paredes escuras, como potes, pneus e garrafas (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; FORATTINI; BRITO, 2003). No tocante ao comportamento de oviposição os Aedini, tribo que contempla o gênero *Aedes*, possuem um comportamento diferenciado dos outros

culicídeos, depositando seus ovos próximos a água ou em locais potencialmente inundáveis (NATAL, 2002). Essa característica permite que seus ovos depositados fora da água tenham a capacidade de entrar em um estado quiescente antes de serem inundados (FOSTER; WALKER, 2002).

Sob condições ideais de temperatura e alimento a fase larval de *A. aegypti* dura de cinco a seis dias, sendo este período dividido em quatro instares (fig. 3) (FOSTER; WALKER, 2002). Para maioria dos mosquitos o período de pupa dura aproximadamente dois dias e após esse período ocorre a emergência dos adultos. A ingestão de açúcar, obtido pela ingestão de seiva de plantas, é fundamental para a vida dos mosquitos de ambos os sexos, para obtenção de energia para voo e cópula (FOSTER, 1995). As fêmeas necessitam de uma alimentação sanguínea para a maturação dos ovos e esse hábito hematófago em *A. aegypti* se dá principalmente no período diurno, geralmente no amanhecer e pouco antes do crepúsculo vespertino (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994)

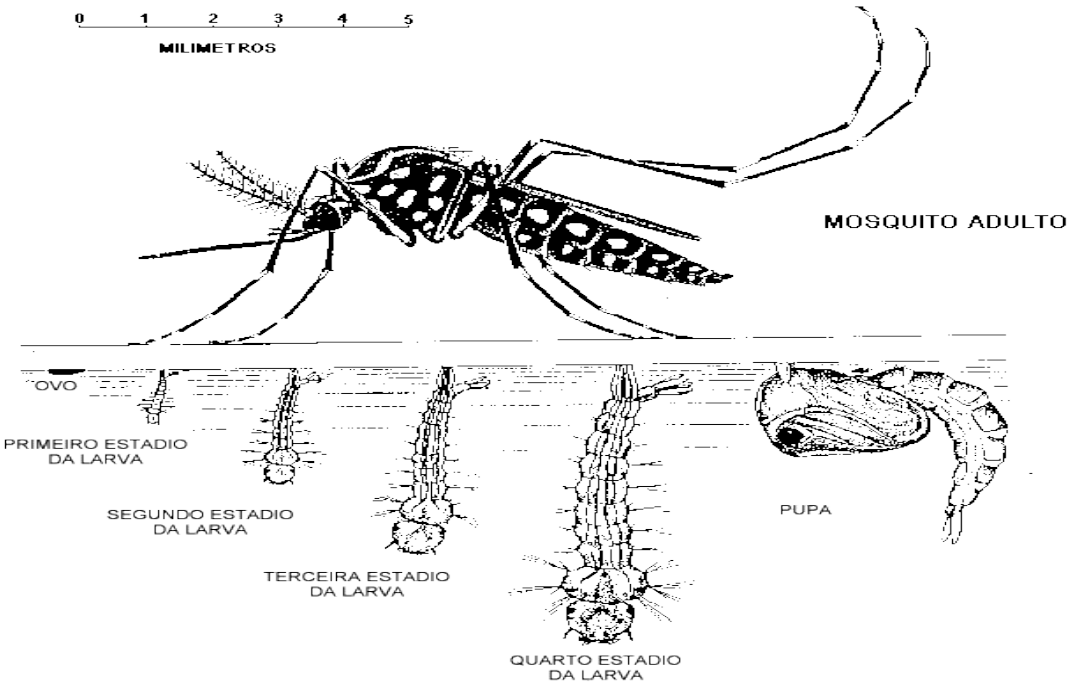

Fig. 2: Ciclo de vida de *Aedes aegypti* demonstrando a fase de ovo, larva, pupa e adulto.
Fonte: www.prefeitura.unicamp.br

O mosquito *A. aegypti* é vetor de algumas arboviroses causadas por flavivírus da família Flaviviridae como a febre amarela e a dengue. A dengue é a virose mais dominante, sendo manifestada em quatro sorotipos, que causam tanto a forma clássica como a forma severa da doença. A incidência de casos no mundo vem crescendo bastante ao longo das décadas. Cerca

de 2,5 bilhões de pessoas estão sobre o risco da doença e é estimado que aproximadamente 50 milhões de pessoas sejam infectadas anualmente em mais de 100 países, sendo estimado que 500 mil pessoas são infectadas com casos severos de dengue e 2,5% desses casos são levados ao óbito (WHO, 2012). No Brasil foram relatados de mais de 4.000 municípios infectados em 2010 (FIOCRUZ, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, registrou-se um total de 286.011 mil casos de dengue no país, de janeiro a abril de 2012, onde a região Sudeste obteve o maior número de casos (41,7%), seguida da região Nordeste (36,3%), da Centro-Oeste (10,3%), da Norte (10,5%) e da Sul (1,2%).

2.4 Medidas de combate e monitoramento

Devido à ausência de vacinas disponíveis para prevenção das doenças transmitidas pelo *A. aegypti*, as medidas de combate e monitoramento são voltadas para a eliminação do vetor. Dessa forma, lança-se mão de três linhas, o saneamento do meio ambiente, as atividades educacionais para redução de criadouros e o combate direto através de agente químicos, físicos e biológicos (TEIXEIRA et al., 2002). A vigilância entomológica visa, entre outros fatores, monitorar a presença do vetor, os índices de infestação e a eficiência dos métodos de controle, mapeando áreas de risco (BRAGA; VALLE, 2007).

Fay e Eliason (1966) propuseram a armadilha de coleta de ovos como um método para vigilância de *A. aegypti*, o qual consistia num recipiente de vidro pintado pelo lado de fora com verniz preto, contendo uma espátula de madeira como substrato de oviposição, colocada verticalmente no recipiente em contato com a água, de modo que a espátula úmida ficasse exposta na borda superior do frasco. O monitoramentos das formas adultas também é feito através de armadilhas como a MosquiTRAP, que é constituída de um frasco contento um atraente de oviposição e um cartão adesivo removível posicionado acima do nível da água, onde os mosquitos ficam aderidos (RESENDE; SILVA; EIRAS, 2010).

Braga e colaboradores (2000) realizaram um estudo comparativo entre duas técnicas para detecção de *A. aegypti*, a pesquisa de larvas e a armadilha de oviposição, e evidenciou que a armadilha de oviposição se mostrou um método mais efetivo para vigilância do mosquito.

O desenvolvimento de inseticidas com efeito prolongado foi um grande avanço para controle de insetos, como o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), o primeiro inseticida com efeito residual desenvolvido (BRAGA; VALLE, 2007). O uso de inseticidas químios para eliminação de adultos e larvas tem sido a principal forma de combate ao *A. aegypti*. Os organofosforados e piretróides são os inseticidas mais frequentemente utilizados durante as epidemias de dengue, pois agem no sistema nervoso central dos insetos (LIMA et al., 2006; BRAGA; VALLE, 2007). Porém, o uso frequente dessas substancias inseticidas pode levar ao desenvolvimento de resistência pelo mosquito, inviabilizando o uso desse meio de controle. Segundo Braga e colaboradores (2004) desde 1986 o organofosforado temefós é usado para combater larvas e adultos de *A. aegypti*, porém em seu estudo foi detectado a resistência ao temefós em 12 municípios brasileiros. O piretróide cipermetrina foi utilizado como substituto aos organofosforados desde 1999 em diversos estados do Brasil (Braga et al., 2004), entretanto Luna e colaboradores (2004) relataram resistência a este inseticida na cidade de Curitiba.

Análogos do hormônio de crescimento também são utilizados no controle de larvas de culicídeos. O Methoprene é o mais utilizado e indicado pela Organização Mundial de Saúde para o controle de *A. aegypti*, sua ação atua na inibição da emergência de adultos e pode ser uma boa alternativa desde que acompanhada de uma avaliação de campo capaz de estimar a densidade larvária (BRAGA; VALLE, 2007). O controle biológico com organismos capazes de predar ou parasitar mosquitos ou alguma de suas fases também vem sendo estudado. A bactéria *Bacillus thuringiensis israelensis* possui elevada atividade larvicida devido à produção de algumas toxinas que destroem o epitélio do estomago das larvas levando-as à morte (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

2.4.1 Produtos naturais e o controle de *Aedes aegypti*

Com o surgimento de formas resistentes de *A. aegypti* à inseticidas comumente usados, a busca por extratos vegetais e substâncias naturais eficientes no combate ao mosquito, suas larvas e ovos tem crescido. Objetivando determinar a atividade ovicida de extratos de plantas contra *A. aegypti*, Govindarajan e colaboradores (2011), testaram o extrato de *Ervatamia*

coronaria e *Caesalpinia pulcherrima* observando zero eclodibilidade dos ovos para as concentrações de 200 ppm e 300 ppm respectivimente.

A atividade larvicida de extratos de algas foi avaliada por Beula e Ravikumar (2011), onde os extratos de *Enteromorpha intestinalis* e *Dictyota dichotoma* apresentaram CL_{50} nas concentrações de 0.074 4±0.008 6 µg/mL e 0.068 3±0.008 4 µg/mL, e análises químicas desses extratos demonstraram a presença de saponinas, esteroides, terpenóides, fenóis, proteínas e açúcares. Os óleos essenciais de plantas e seus constituintes químicos também apresentam uma boa atividade biológica contra as larvas de *A. aegypti*. Cavalcanti e colaboradores (2004) reportaram que os óleos essenciais de *Ocimum americanum* e *Ocimum gratissimum* apresentaram atividade larvicida com CL_{50} de 67 e 60 ppm respectivamente. Os óleos essenciais de *Syzigium aromaticum*, *Lippia sidoides* e *Hyptis martiusii* também são citados como bioativos contra as larvas de *A. aegypti*, demonstrando CL_{50} de 21,4 19,5 e 18,5 ppm respectivamente (COSTA et al., 2005). Morais e colaboradores (2006) estudaram a atividade larvicida do óleo essencial de espécies de *Croton* ocorrentes no Nordeste do Brasil e observaram a atividade larvicida *C. nepetaefolius* (CL_{50} de 84 ppm), *C. argyrophyloides* (CL_{50} de 102 ppm), *C. sonderianus* (CL_{50} 104 ppm) e *C. zenhtneri* (CL_{50} 28ppm), sendo este ultimo, o que apresentou atividade mais elevada e seu principal constituinte ativo foi identificado como sendo o anetol, um fenilpropanóide. Os hidrolatos obtidos a partir do processo de destilação por arraste à vapor, também podem apresentar atividade larvicida. Lima e colaboradores (2006) avaliaram a atividade larvicida dos hidrolatos de caule e folhas de diversas espécies de *Croton*, e constataram a mortalidade de 100% das larvas dos hidrolatos do caule e folhas de *C. nepetaefolius* e *C. zehntneri* e da folha de *C. argyrophylloides* após 24h de tratamento.

Ainda são encontrados trabalhos que avaliam a atividade repelente e deterrente de produtos produzidos por plantas. Govindarajan e colaboradores (2011) analisaram a repelência dos extratos metanólicos de *Ervatamia coronaria* e *Caesalpinia pulcherrima* contra *A. aegypti*, obtendo 100 % de repelência em até 180 min para *E. coronaria* e 150 min para *C. pulcherrima*, na concentração de 5.0 mg/cm^2. Da mesma forma, Venkatachalam e Jebanesan (2001) comprovaram a repelência do extrato metanólico de folhas de *Ferronia alephantum* contra *A. aegypti*, observando 100% de proteção nas concentrações de 1.0 e 2.5 mg/cm^2, em 2.14 ± 0,16 h e 4,0 ± 0,24 h, respectivamente. Prajapati e colaboradores (2005) testaram a deterrência de alguns óleos essenciais, verificando a atividade deterrente da

oviposição do óleo essencial de *Cinnamomum zaylanicum* na concentração de 33.5 µg/mL, sendo este óleo eficaz na prevenção da postura de ovos pelas fêmeas de *A. aegypti*.

Dessa forma é possível destacar a efetividade dos produtos naturais e suas vantagens como biopesticidas, por serem rapidamente degradados, obtidos de recursos renováveis e demandarem baixo custo de produção, se tornando uma importante linha de combate ao *A. aegypti.*

3. Referencias bibliográficas

AGRA, M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. 111: 383-395, 2007.

ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brasil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**. 114: 325-354, 2007.

BECERRA, J. X. Evolution of Mexican *Bursera* (Burseraceae) inferred from ITS, ETS, and 5S nuclear ribosomal DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 26 (2): 300-309, 2003.

BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Phytologist**. 127: 617-633, 1994.

BESERRA, E. B. et al. Biologia e Exigências Térmicas de Aedes aegypti (L.) (Diptera: Culicidae) Provenientes de Quatro Regiões Bioclimáticas da Paraíba. **Neotropical Entomology**. 35: 853-860, 2006.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**. 32 (3). 588-594, 2009.

BRAGA, I. A. et al. Comparação entre pesquisa larvária e armadilha de oviposição, para detecção de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 33 (4), 347-353, 2000.

BRAGA, I. A. et al. *Aedes aegypti* resistance to themephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 99 (2): 199-203, 2004.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. 16 (4): 295-302, 2007.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: Inseticidas, mecanismos de ação e resistência*. **Epidemiologia e serviços de saúde**. 16: 279-293, 2007.

BUCKLE, J. **Clinical Aromatherapy: Essential oils in healthcare**. Third edition, Churchill Linvingstone Elsevier. 432 p, 2014.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. 131: 326-342, 2010.

CARVALHO, P. E. R. **Comunicado Técnico 228: *Commiphora leptophloeos***. Colombo: Embrapa Florestas, ISSN: 1517-5030, 2009.

CAVALCANTI, E. S. B. et al. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 99 (5): 541-544, 2004.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Edt. Fiocruz, Rio de Janeiro, 1994.

COSTA, J. G. M. et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 15 (4): 304-309, 2005.

COUTINHO, H. D. M. et al. Termite usage associated with antibiotic therapy: enhancement of aminoglycoside antibiotic activity by natural products of *Nasutitermes corniger* (Motschulsky 1855). **Bmc. Complementary & Alternative Medicine**. 9: 1-4, 2009.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais de química fina. **Química Nova**. 16: 224-228, 1993.

CRUZ- CAÑIZARES, J. et al. Study of Burseraceae resins used in binding media and varnishes from artworks by gás chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of. Chromatografy A**. 1093: 177-194, 2005.

DALY, D. C. B.; FINE, P. V. A.; MARTÍNEZ-HABIBE, M. C. Burseraceae: a model for studying the Amazon flora. **Rodriguésia**. 63: 021-030. 2012.

FAY, R. W.; ELIASON, D. A. A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. **Mosquito News**. 26 (4): 531-535, 1966.

FERREIRA JÚNIOR, W. S. et al. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. **Journal of Ethnopharmacology**. 138: 238-252, 2011.

FORATTINI, O. P.; BRITO, M. Reservatórios domiciliares de água e controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**. 37 (5): 676-677, 2003.

FOSTER, W. A.; WALKER, E, D. Mosquitoes (Culicidae). In: Mullen, G., Durden, L., **Medical and Veterinary Entomology**. Academic Press Inc, London, 2002.

FOSTER, W. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. **Annul Reviews Entomology**. 40:443-74, 1995.

FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ. Dengue vírus e vetor. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/index.html>. Acessado em 04 dez 2012.

GILLETT, J.B. *Commiphora* (Burseraceae) in South America and its relationship to *Bursera*. **Kew Bulletin**. 34: 569–587, 1980.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. 30: 374-381, 2007.

GOVINDARAJAN, M. et al. Ovicidal and repellent activities of botanical extracts against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 1: 43-48, 2011.

GUIMARÃES, R.; SOUSA, M. J.; FERREIRA, C. F. R. Contribution of essential oils and phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants. **Industrial Crops and Products**. 32: 152-156, 2010.

HARBORNE, J. B. **Introduction to ecological chemistry**, third ed. Academic Press Inc, New York, 1988.

LANGENHEIM, J. H. **Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany**. Timber Press, Cambridge, 2003.

LEMENIH, M.; ABEBE, T; OLSSON, M. Gum and resin resources from some *Acacia, Boswellia* and *Commiphora* species and their economic contributions in Liban, south-east Ethiopia. **Journal of Arid Environments**. 55: 465-482, 2003.

LEENHOUTS, P. W. Burseraceae. **Flora Malesiana**. 5:209-296, 1956.

LIMA, M. G. A. et al. Effect of stalk and leaf extracts from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidade) Larvae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** 48 (4): 211-214, 2006.

LIMA, P. E. et al. Resistência do *Aedes aegypti* ao Temefós em Municípios do estado do Ceará. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**. 39: 259-264, 2006.

LUCENA, R. F. P. et al. The ecological appearance hypothesis and the importance of useful plants in rural communities from Northeastern Brazil: An assessment based on use value. **Journal of Environmental Manegent**. 96: 106-115, 2012.

LUNA, J. D. et al. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. 38 (6): 842-843, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dengue: situação epidemiológica. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/index.cfm?portal=pagina.visualizarTexto&codConteudo=6407&codModuloArea=783&chamada=boletim-1/2012-_-dengue:-situacao-%20%20epidemiologica> Acessado em 04 dez 2012.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S.. Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. **Química Nova**. 1: 105- 111, 2001.

MORAIS, S. M. et al., Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association.** 22 (1): 161-164, 2006.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**. 64: 205-207, 2002.

OBENG-OFORI, D.; REICHMUTH, C. Bioactivity of eugenol, a major component of essential oil of *Ocimum suave* (Wild.) against four species of stored-product Coleoptera. **International Journal of Pest Management**. 43: 89-94, 1997.

PARASKEVA, M, P. et al. The *in vitro* biological activity of selected South African *Commiphora* species. **Journal of Ethnopharmacology**. 119: 673-679, 2008.

PRAJAPATI, V. et al. Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity os selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Bioresource Technology**. 96: 1749-1757, 2005.

BEULA, J. M.; RAVIKUMAR, S. Mosquito larvicidal afficacy of seaweed extracts against dengue vector of *Aedes aegypti***. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 1 (2): 143-146, 2011.

RESTELLO, R. M.; MENEGATT, C.; MOSSI, A. J. Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais*Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. 53 (2): 304-307, 2009.

REGNAULT-ROGER, C. et al. Insecticidal effect of essential oils from Mediterranean plants upon *Aconthoscelides obtectus* SAY (Coleoptera, Bruchidae), a pest of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Chemical Ecology**. 19 (6): 1233-1244, 1993.

RÜDIGER, A.L.; SIANI, A.C.; JUNIOR, V.F.V. The chemistry andpharmacology of the South America genus Protium Burm. f. (Burseraceae). **Pharmacognosy Review**. 1:93-104, 2007.

SHEN, T. et al. The genus *Commiphora*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**. 142: 319-330, 2012.

SIMAS, N. K. et al. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de myroxylon balsamum (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**. 27:46-49, 2004.

TEIXEIRA, M. G. et al. Avaliação de impacto de ações de combate ao *Aedes aegypti* na cidade de Salvador, Bahia. **Revista brasileira de epidemiologia**. 5:108-115, 2002.

TISSERAND, R.; YOUNG, R. **Essential oil safety: A guide for health care professionals**. Second Edition, Churchill Livingstone Elsevier. 780 p, 2014.

TRENTIN, D. S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**. 137: 327-335, 2011.

TUNÇ, I.; ŞAHIANKAYA Ş. Sensitivity of two greenhouse pests to vapours of essential oils. **Entomologia Experimentalist et Epplicata**. 86 (2): 183-187, 2003.

VENKATACHALAM, M. R.; JEBANESAN, A. Repellent activity of *Ferronia alephantum* Corr. (Rutaceae) leaf extract against *Aedes aegypti* (L.) **Bioresource Technology**. 76: 287-288, 2001.

WEEKS, A.; DALY, D. C.; SIMPSON, B. B. The phylogenetic history and biogeography of the frankincense and myrrh family (Burseraceae) based on nuclear and chloroplast sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 35:85-101, 2005.

WEEKS, A.; SIMPSON, B. B. Molecular phylogenetic analysis of *Commiphora* (Burseraceae) yields insight on the evolution and historical biogeography of an "impossible" genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 42, 62-79, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue and severe dengue. Disponível em : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/> Acesso em 04 dez. 2012.

CAPÍTULO 1

Caracterização química, atividade larvicida, repelente e deterrente da oviposição de *Aedes aegypti* (L.) do óleo essencial de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillet (Burseraceae)

Manuscrito a ser submetido à revista *Plos one*

Caracterização química, atividade larvicida, repelente e deterrente da oviposição de *Aedes aegypti* (L.) do óleo essencial de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillet (Burseraceae)

Resumo

Por serem óleos essenciais de plantas fonte de vários princípios ativos, mas poucos trabalhos estudaram a atividade deterrente de oviposição frente a *Aedes aegypti*. Por isso, este trabalho objetivou avaliar e caracterizar o óleo essencial de *Commiphora leptophloeos* e sua atividade biológica frente *Aedes aegypti* através de análises eletroantenográficas, análises comportamentais e testes de atividade larvicida. Através de análises cromatográficas foram encontrados 55 compostos no óleo essencial de *C. leptophloeos* sendo o α- Felandreno (26,26%), trans- Cariofileno (18,01%) e β- Felandreno (12,93%) os compostos majoritários. A partir dos testes de oviposição com fêmeas grávidas de *A. aegypti* observou-se que o óleo essencial de *C. leptophloeos* apresentou atividade deterrente de oviposição nas concentrações de 100, 50 e 25 ppm ($p<0,008$). Nas análises eletroantenográficas para se identificar quais compostos do óleo são responsáveis por esta atividade, foram obtidas sete respostas aos constituintes do óleo, estando entre elas o trans- Cariofileno e α-Humuleno. Testes de oviposição foram realizados com os padrões α-Felandreno, trans- Cariofileno e α-Humuleno. O α-Felandreno foi testado por ser o majoritário apesar de não ter tido resposta no EAD, mas não demonstrou atividade frente à oviposição de *A. aegypti*. O trans- Cariofileno, em contrapartida, se mostrou deterrente de oviposição ($p<0,004$), assim como o α-Humuleno ($p<0,003$) nas proporções em que se encontram no óleo essencial. O teste de atividade larvicida demonstrou CL_{50} na concentração de 99,4 ppm. Os resultados demonstram que o óleo essencial de *C. leptophloeos* é uma fonte promissora de compostos que induzem respostas comportamentais na oviposição de fêmeas de *A. aegypti*, havendo respostas deterrentes entre os diferentes compostos, além de atuar como agente larvicida.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, *Commiphora*, Cromatografia Gasosa, Eletroantenografia (EAD), Oviposição, Dengue.

1. Introdução

A família Burseraceae inclui cerca de 20 gêneros e 500 espécies, dos quais sete gêneros e aproximadamente 60 espécies ocorrem no Brasil. Uma de suas características peculiares é a produção de óleo-resinas perfumadas, que são utilizadas especialmente na perfumaria e na produção de incensos (Langenheim, 2003). Diversas espécies da família são citadas quanto aos seus usos etonobotânicos (Shen et al.,2012) e atividade biológica (Pontes et al, 2010). O extrato de *Canarium zeylanicum*, por exemplo, é citado por apresentar atividade larvicida frente à *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* e *A. albopictus* (Ranaweera, 1996) e o óleo essencial de *Commiphora molmol* por atuar como larvicida frente *Culex pipiens* (Habeeb et al., 2009). Também são reportadas atividades repelente, deterrente de oviposição, inseticida, antialimentar e anti-infestação de diversas espécies desta família de plantas (Abdel-Aziz e Ismail, 2000; Carroll et al., 1989; Junor et al., 2008; Meshram, 2000; Pontes et al., 2007; Pontes et al., 2010).

O gênero *Commiphora* contempla cerca de 190 espécies, sendo *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillet uma espécie nativa e endêmica do Brasil. Diversas propriedades etnofarmacológicas são atribuídas a esta espécie, podendo-se citar seu uso no tratamento de dores, gripes, problemas renais e inflamações (Albuquerque et al., 2007; Agra et al., 2007; Cartaxo et al., 2010; Ferreira Júnior et al., 2011), além de possuir atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis* (Trentin et al., 2011).

As plantas têm sido amplamente avaliadas como fontes promissoras para combater mosquitos vetores de doenças tropicais. O *Aedes aegypti* é um mosquito de grande importância epidemiológica por ser conhecido como o vetor da dengue, Chikungunya e febre amarela. Atualmente estima-se que cerca de 50 milhões de pessoas sejam infectadas com o vírus da dengue anualmente (Who, 2012). A fim de amenizar a proliferação do mosquito, tem sido feito o uso de inseticidas e armadilhas de captura, porém o surgimento de cepas resistentes aos inseticidas e larvicidas tem se mostrado um dos principais obstáculos no que diz respeito ao seu controle. Essa resistência resulta no aumento da frequência de aplicação e aumento das dosagens, que podem refletir em efeitos colaterais em plantas, humanos e danos ambientais (Simas et al., 2004).

Compostos fitoquímicos, como por exemplo, óleos essenciais, são utilizados como atraentes/repelentes e deterrentes de mosquitos (Maciel et al., 2010) podendo ser utilizados no

combate da disseminação das doenças transmitidas por mosquitos. Em diversas plantas são encontrados compostos voláteis que podem ser detectados pelas antenas ou tarsos dos insetos, os quais podem gerar efeitos comportamentais nesses organismos (Maciel et al., 2010). Dessa forma, substâncias extraídas de plantas podem ser utilizadas como iscas para captura de mosquitos adultos, repelentes ou deterrentes de oviposição, impedindo picadas ou que ovos sejam depositados por fêmeas em determinados sítios de oviposição, respectivamente.

No presente trabalho objetivou-se realizar a caracterização química do óleo essencial de folhas de *Commiphora leptophloeos,* assim como avaliar sua resposta eletrofisiológica frente *Aedes aegypti* e sua atividade larvicida, repelente e deterrente de oviposição a fim de se encontrar princípios ativos para serem usados no combate a disseminação do *mosquito Aedes aegypti*.

2. Materiais e Métodos

2.1 Coleta do material vegetal

Amostras *Commiphora leptophloeos* foram coletadas na trilha da Pedra do Cachorro no Parque Nacional do Catimbau, município de Buíque, Pernambuco. O material foi identificado e uma exsicata de número 84.037 foi depositada no Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA).

2.2 Obtenção do óleo essencial

Para obtenção do óleo essencial de *C. leptophloeos* foram utilizados cerca de 150 g de folhas frescas, as quais foram trituradas juntamente com 250 mL de água destilada. Posteriormente o material vegetal foi transferido para um balão de fundo redondo de 1L, adicionando-se mais água destilada, perfazendo um volume final de 500 mL. O balão volumétrico foi transferido para uma manta aquecedora (160 ^{o}C – 170 ^{o}C), acoplada à um

aparato de Clevenger modificado e um condensador durante um período de 4h. Em seguida, o óleo foi coletado e tratado com sulfato de sódio anidro para retirada da água remanescente. O óleo obtido foi mantido sob refrigeração (-24 ^{o}C) até o uso nos experimentos (Autran et al., 2009; Santos et al., 2012).

2.3 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa

Os compostos voláteis foram analisados através de cromatografia gasosa/ espectrometria de massas (CG/EM) em um sistema quadrupolo Agilent 5975C Series CG/EM (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), equipado com uma coluna apolar DB-5 (Agilent J&W; 60 m x 0.25 mm d.i., 0.25 μm espessura da película). Para a análise, 1 μL de uma solução de 3000 ppm do óleo essencial dissolvido em hexano, foi injetado em modo split 1:20. Posteriormente injetou-se 1μL em split (1:20) da mistura de padrões de hidrocarbonetos (C9-C34). E finalmente, injetou-se a mistura do óleo essencial e a mistura de padrões de hidrocarbonetos, 1μL (0.2μL de alcanos e 0.8μL de óleo) em splitless. A solução hexânica de hidrocarboneto foi preparada com padrões comerciais Sigma-Aldrich®. A temperatura do CG foi ajustada em 60 °C por 3 min, aumentada em 2,5 °C min^{-1}, até 240 °C e mantida por 10 min. O fluxo de hélio foi mantido em pressão constante de 100 kPa. A interface do EM foi definida em 200 °C e os espectros de massa registrados em 70eV (em modo IE) com uma velocidade de escaneamento de 0.5 scan-s de m/z 20-350. Os compostos foram identificados a partir de comparação de seus espectros de massa e tempos de retenção com aqueles de padrões autênticos disponíveis na biblioteca de referência MassFinfer 4, NIST 08 e Wiley Registry^{TM} 9th Edition, integradas ao software Agilet MSD Productivity do Chemstation (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA). As áreas dos picos nos cromatogramas foram integradas para obtenção do sinal iônico total e seus valores utilizados para determinar as proporções relativas de cada campo.

A partir da análise dos tempos de retenção dos compostos na amostra do óleo essencial, dos padrões de hidrocarboneto e a combinação do óleo essencial com a mistura de padrões foi calculado o índice de retenção para cada componente do óleo, segundo a equação de Van den Dool and Kratz (1963) e comparado com dados da literatura (Adams, 2009).

2.4 Análises eletrofisiológicas

As análises eletrofisiológicas (CG/DEA) foram realizadas em um cromatógrafo gasoso (Trace GC Ultra, Thermo Scientific, Milão, Itália) equipado com um detector de ionização de chama (DIC) e um detector eletroantenográfico (DEA) fornecido pelo Syntech (Kirchzarten, Alemanha). Para as análises uma coluna VB-5 (30m x 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 μm de espessura de filme, ValcoBond) foi utilizada. Hélio foi utilizado como gás de arraste e mantido a um fluxo constante de 1mL/min. Uma alíquota de 1 μL de uma solução hexânica do óleo a 500 ppm foi injetada em modo splitless a uma temperatura de forno de 60°C e de injetor de 200°C, seguido da abertura da válvula divisória após 1min e aumento da temperatura de forno a uma taxa de 7°C/min até 200°C. A temperatura final foi mantida por 5 min. No final da coluna foi acoplado um divisor em forma de T que direcionou parte do efluente para o DIC e parte para a antena do mosquito conectada ao DEA. O efluente foi direcionada à antena do mosquito por um fluxo de ar estéril e umidificado.

Para as análises foram utilizadas as duas antenas de cerca de 10 fêmeas do mosquito, com média de 10 a 20 dias de idade, após o terceiro dia do repasto sanguíneo. Com o auxílio de uma lâmina a cabeça e a extremidade das antenas das fêmeas foram cortadas. Posteriormente, a cabeça e as antenas foram conectadas a dois capilares de vidro preenchidos com uma solução fisiológica para insetos (Ringer, 8.0 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 04 g/L $CaCl_2$). Dois eletrodos de fio de prata foram então inseridos no interior de cada capilar, fechando um circuito elétrico com a cabeça do mosquito. Os compostos foram considerados ativos quando estimularam respostas em pelo menos três indivíduos.

2.5 Criação das larvas e mosquitos

A criação de larvas e mosquitos de *A. aegypti* foi mantida no insetário do Laboratório de Ecologia Química da UFPE, sendo proveniente da cepa RockFeller. O ambiente foi mantido à temperatura constante de 28 ^{o}C, umidade relativa de 58% e fotoperiodismo de 14D:10N (dia/noite).

2.6. Bioensaio Larvicida

A atividade larvicida do óleo essencial foi avaliada utilizando-se uma adaptação do método recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 1981) segundo Navarro et al., (2003). Para a análise da atividade larvicida, uma solução estoque de 100 ppm foi preparada utilizando-se, 0,005 g do óleo diluído em 0,7 mL de etanol, adicionando-se água destilada até um volume final de 50 mL. As demais concentrações foram preparadas através de diluições feitas a partir da solução estoque com água destilada. Para o bioensaio preliminar foram realizados testes com as concentrações de 100, 50 e 10 ppm. Os testes foram realizados utilizando-se 20 larvas de *A. aegypti*, no quarto instar do desenvolvimento, separadas em um béquer contendo a solução do óleo a ser testada. Para cada ensaio, foram realizadas três repetições e um controle negativo contendo apenas água destilada e a mesma quantidade de acetona utilizada no ensaio correspondente. A mortalidade das larvas foi determinada após 48h de incubação a 27± 0,5 ^{o}C. As larvas foram consideradas mortas quando as mesmas não responderam a estímulos ou não subiram a superfície da solução. Os valores das concentrações letais para CL_{10} e CL_{50} foram calculados pela análise de Probit usando o StatusPlus 2006 software (Autran et al., 2009).

2.7 Bioensaio de oviposição

Para o ensaio de oviposição fêmeas não virgens de *A. aegypti* com idade de 10 a 20 dias, foram alimentadas com sangue de galinha três dias antes dos experimentos para o desenvolvimento dos ovos. As fêmeas foram postas em gaiolas de bioensaio (33 x 21 x 30cm) contendo dois recipientes plásticos e papel de filtro utilizado como substrato para oviposição. Um dos recipientes continha 25 mL da solução controle, e o outro a solução a ser testada. Os recipientes foram dispostos dentro das gaiolas de bioensaio de forma que ficassem em extremidades opostas da gaiola. As amostras testadas foram diluídas em 1,4 mL de acetona ou etanol usados como co-solventes, e água destilada foi adicionada até um volume final de 200 mL. Para o preparo da solução controle foi utilizado apenas a mesma quantidade de solvente e água. O óleo essencial foi testado nas concentrações de 100, 50, 25 e 10 ppm e os compostos isolados do óleo que foram selecionados para teste, tiveram suas concentrações determinadas a partir de suas respectivas proporções na constituição do óleo. Os insetos foram mantidos a 27± 0,5 ^{o}C, 73± 0,4 % de umidade relativa e 16h de escuro. A resposta de oviposição foi determinada de acordo com o

número de ovos depositados em cada papel de filtro. Utilizou-se 10 fêmeas por gaiola e realizaram-se oito repetições. Para análise dos dados foi utilizado o Teste-*t*- *Student*, no qual valores de $p < 0,05$ foram considerados para representar diferenças significativas entre os valores médios (Navarro et al., 2003).

3. Resultados e Discussão

A partir das análises cromatográficas é possível observar a presença de 55 compostos na constituição do óleo essencial das folhas de *C. leptophloeos*, dos quais 46 foram identificados. O constituinte majoritário do óleo essencial de *C. leptophloeos* é o α-Felandreno, com cerca de 26% do total do óleo, porém também podemos evidenciar a presença do trans-Cariofileno (18,01%) e do β-Felandreno (12,93%) em concentrações proeminentes. Dentre os compostos de menor proporção podemos destacar o Germacreno D (5,99%) e o α-Humuleno (5,46). Cerca de 11 constituintes apresentam-se em proporções entre 1 e 3% do teor óleo e 39 com menos de 1% (Tabela 1).

Os compostos estão distribuídos entre seis classes, sendo os sesquiterpenos a classe dominante representando 41,8% do total do óleo, seguido dos monoterpenos (18,2%), compostos não identificados (16,3 %), sesquiterpenos oxigenados (14,5%), e monoterpenos oxigenados (7,3%). Em menor proporção estão compostos de éster (1,8%).

Tabela 1
Identificação dos constituintes do óleo essencial obtido de folhas de *Commiphora leptophloeos*.

		Índices de Retenção		%
Pico	**Compostos [a]**	**Calculado [b]**	**Literatura [c]**	
1	α-Pineno	932	932	1,41
2	β-Pineno	975	974	0,13
3	β-Mirceno	991	988	0,38
4	α-Felandreno	1003	1002	26,26
5	(Z)-3-Hexenil acetato	1008	1004	0,16
6	α-Terpineno	1016	1014	0,28
7	o-Cimeno	1024	1022	1,36
8	β-Felandreno	1028	1025	12,93
9	Eucaliptol	1030	1026	0,59
10	trans-Ocimeno	1049	1044	0,23
11	γ-Terpineno	1058	1054	0,20
12	α-Terpinoleno	1088	1086	0,18
13	Linalol	1100	1095	0,41
14	Terpine-4-ol	1177	1174	0,14
15	α-Terpineol	1190	1186	0,24
16	ð-Elemeno	1337	1335	0,14
17	α-Copaeno	1378	1374	0,18
18	Composto não identificado	1387		0,06
19	β-Elemeno	1394	1389	1,60
20	trans -Cariofileno	1423	1417	18,01
21	β-Copaeno	1432	1432	0,29
22	Aromadendreno	1442	1439	0,18
23	Compostos não identificado	1444		0,14
24	trans-Muurola-3,5-dieno	1455	1451	0,16
25	α-humuleno	1458	1452	5,46
26	Cariofileno <9-epi-(E)->	1465	1464	2,26
27	γ-Muuroleno	1481	1478	1,72
28	Germacreno D	1486	1480	5,99
29	β-Selineno	1491	1489	1,14
30	cis-beta- Guaiene	1493	1489	0,15
31	ð-Selineno	1496	1492	0,45
32	α-Selineno	1500	1498	2,74
33	β-Alaskene	1501	1498	2,74
34	α-Muuroleno	1505	1500	0,89
35	Germacreno A	1510	1508	1,51
36	γ-Cadineno	1519	1513	0,43
37	ð-Cadineno	1528	1522	2,33
38	Composto não identificado	1530		0,15
39	Cadina-1,4-dieno	1537	1533	0,13
40	α-Cadineno	1542	1537	0,10
41	Germacreno B	1561	1559	0,07
42	Palustrol	1571	1567	0,19
43	Composto não identificado	1587		0,65

44	Composto não identificado	1595		0,44
45	Cubenan-11-ol	1597	1595	0,40
46	Rosifoliol	1605	1600	0,27
47	Composto não identificado	1616		0,25
48	Junenol	1622	1618	0,13
49	Composto não identificado	1626		0,19
50	Composto não identificado	1628		0,19
51	Cubenol <1-epi->	1631	1627	0,13
52	Comsposto não identificado	1635		0,10
53	Muurolol <epi-alpha->	1645	1640	0,86
54	α-Muurolol	1649	1644	0,25
55	α-Cadinol	1657	1652	1,74
	Total			99,79

[a] Constituintes listados em ordem de eluição numa coluna apolar DB-5; [b] Índices de retenção calculados através dos tempos de retenção em relação aos da série de n-alcanos (C9-C19), em 30 minutos, em uma coluna DB-5; [c] Valores obtidos da literatura, Adams, 2009;

Comumente os derivados de terpenóides constituem a maior parte dos compostos dos óleos essenciais, sendo os monoterpenos e os sesquiterpenos as classes mais frequentes (Simões e Spitzer, 1999). A composição dos óleos essenciais variam bastante entre as espécies de *Commiphora*. Dentre os monoterpenos o α-Pineno, Canfeno, β-Pineno, Mirceno e Limoneno já foram encontrados (Shen et al., 2012). Entre os sesquiterpenos, compostos como β-Elemeno, α-Copaeno, α-Humuleno, β-Selineno e Germacreno B são amplamente distribuídos entre diferentes espécies do gênero *Commiphora* (Shen et al., 2012). Ao comparar dos compostos majoritários de algumas espécies de *Commiphora*, e correlacioná-los a alguns constituintes do óleo de *C. leptophloeos*, pudemos fazer algumas atribuições, Tabela 2.

Alguns compostos também são comumente encontrados em espécies do gênero *Bursera*, considerado grupo irmão de *Commiphora*. Noge e Becerra (2009) observaram a presença do Germacreno D em cinco espécies de *Bursera*, sendo também citado para algumas espécies de *Commiphora* (Tabela 2). Outros compostos como α-Pineno, β-Pineno, β-Mirceno, α-Felandreno, β-Felandreno, trans-Cariofileno e α-Humuleno foram encontrados em *B. copallifera, B. excelsa, B. mirandae, B. ruticola* e *B. fagaroides* var. *purpusii* sendo também vistos no óleo essencial de *C. leptophloeos* (Noge e Becerra, 2009).

Tabela 2: Comparação entre os compostos majoritários de óleos essenciais de espécies de *Commiphora* e suas proporções realtivas no óleo de *Commiphora leptophloeos*.

Espécies de *Commiphora*	*C. africana*[1]	*C. tenuis*[2]	*C. kua*[3]	*C. gileadensis*[4]	*C. parvifolia*[5]	*C. sphaerocarpa*[6]	*C. holtziana*[6]	*C. kataf*[6]	*C. habessinica*[7]	*C. leptophloeos*
Compostos	**Teor em %**									
α-Oxobisaboleno	60,0									
γ-Bisaboleno	10,0									
β-Sesquifelandreno	19,1									
α-Felandreno										12,93
β-Felandreno										26,26
α-Pineno		60,8		7,21						1,41
α-Tujeno		8,9								
β-Pineno		8,8								0,13
Sabineno		6,3		21,11						
α-Cadinol			33,0							1,74
γ-Cadineno			22,5							0,43
δ—Cadineno			17,01							2,33
Iso-Cariofileno			3,7							
Allo-Aromadendreno			2,8							
α-Muuroleno			2,7							0,89
α-Humuleno			2,4							5,46
trans- Cariofileno				20,12						18,01
Germacreno D				19,62			23,0	9,0		5,99
Oxido de Cariofileno					14,2					
β-Eudesmol					7,7					
α-Selineno						11,0			18,9	2,74
β-Selineno						8,0				1,14
α-Gurjeneno						7,0				
β-Elemeno						6,7		6,4	32,1	1,60
Germacreno B							7,2	7,1		0,07
Cadina-1,4-dieno									7,14	0,13

Referencial bibliográfico, [1]: Ayédoun, M. A. et al., 1998, Avlessi, F. et al., 2005; [2]: Asres, K. et al., 1998; [3]: Ali, N. A.A., et al., 2008;[4]: Amiel, E. et al., 2012; [5]: Monthana, R. A. et al., 2010; [6]: Hanuš, L. O. et al., 2005; [7]: Ali, N. A. A. et al., 2009.

Para avaliar a atividade deterrente de oviposição do óleo essencial de *C. leptophloeos* frente às fêmeas grávidas de *A. aegypti*, experimentos comportamentais foram realizados. Os testes comportamentais mostraram que o óleo essencial de *C. leptophloeos* foi significativamente ativo nas concentrações de 100, 50 e 25 ppm, apresentando um menor número de ovos deixados nos recipientes contendo as soluções de teste em comparação com a solução controle, Figura 1. Um ensaio foi realizado utilizando controle versus controle para excluir quaisquer dúvidas atribuídas a fatores abióticos do ambiente de teste.

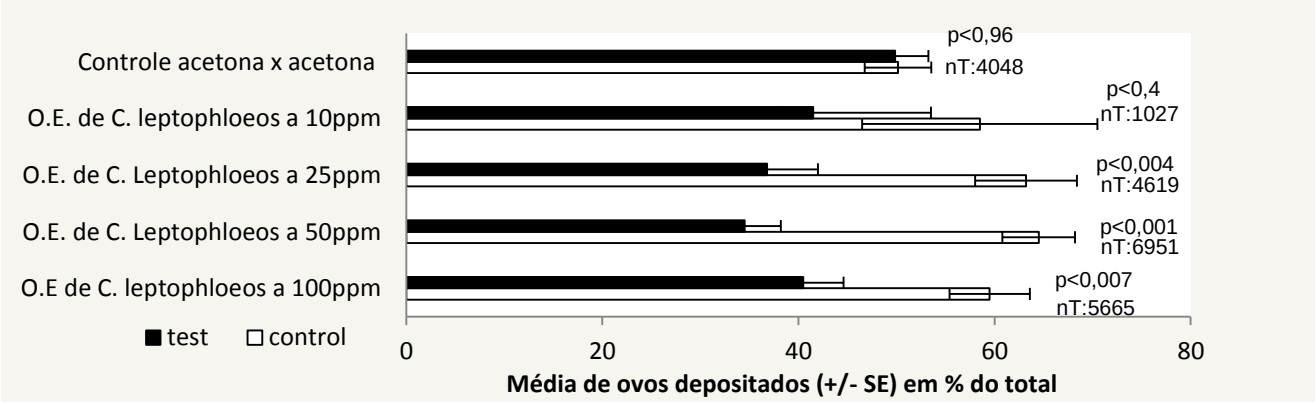

Fig. 1. Respostas de oviposição de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* ao óleo essencial de *Commiphora leptophloeos*. Os valores representam a porcentagem do total de ovos depositados em resposta ao tratamento. O.E.- óleo essencial; nT- número total de ovos.

Estes resultados se mostraram melhores do que alguns encontrados na literatura. Autran e colaboradores (2009) avaliaram a atividade deterrente de oviposição do óleo essencial de folhas, caule e inflorescência de *Piper marginatum* e observaram efeito deterrente em concentrações de 100 e 50 ppm do óleo de folas e caule, e apenas em 100 ppm para o óleo de inflorescências. Santos e colaboradores (2012) também avaliaram a atividade deterrente de oviposição do óleo essencial de *Alpinia purpurata* obtendo resultados de deterrencia na concentração de 100 ppm. Prajapati e colaboradores (2005) reportaram o efeito deterrente do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* para *A. aegypti* em concentração de 33,5 µg/mL, além de observar ação semelhando para *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus* nas concentrações de 32,4 e 50,1 µg/mL, respectivamente. Os óleos essenciais de *Mentha piperita* e *Achyranthes aspera* foram avaliados por apresentarem uma forte deterrencia em concentração de 10% e 0,1% do óleo, respectivamente, inibindo as fêmeas de depositarem seus ovos no recipiente teste em cerca de 97% para a primeira e 100%

para a segunda (Warikoo et al., 2011; Khandagle et al., 2011). Diante desse cenário podemos destacar a ação deterrente do óleo essencial de *C. leptophloeos*, o qual foi capaz de inibir em cerca de 63% a quantidade de ovos depositada no recipiente contendo a solução de teste na concentração de 25 ppm.

Algumas espécies de *Commiphora* são apontadas por apresentarem atividade repelente sobre insetos. *C. erythreae*, *C. holtziana* e *C. swynnertonii* apresentam atividade repelente contra diferentes espécies de carrapatos (Bissinger e Roe, 2010). Porém a análise da influencia no comportamento de oviposição do óleo essencial de espécies de *Commiphora* sobre mosquitos vetores de doenças é escasso, sendo difícil a avaliação de estudos comparativos.

Experimentos de CG/DEA foram realizados com antenas de fêmeas de *A. aegypti* para verificar se os componentes do óleo essencial de *C. leptophloeos* poderiam promover alguma resposta à antena do mosquito, mostrando indícios de princípios ativos presentes no óleo. As análises eletrofisiológicas em CG/DEA mostram respostas que aparecem num eletroantenograma simultaneamente a saída dos compostos do óleo essencial de *C. leptophloeos*. A partir dos ensaios com fêmeas grávidas de *A. aegypti* foram obtidas sete respostas aos componentes do óleo. Por vezes alguns compostos eluíram juntos, não sendo possível identificar a que composto a antena foi sensível, para esses casos foi considerado ambos os compostos (pico 7: α-Selineno + Alaskene). Dentre os compostos identificados que estimularam as antenas, seis foram sesquiterpenos e apenas um monoterpeno. Os compostos que induziram respostas eletrofisiológicas estão listados abaixo na figura 2.

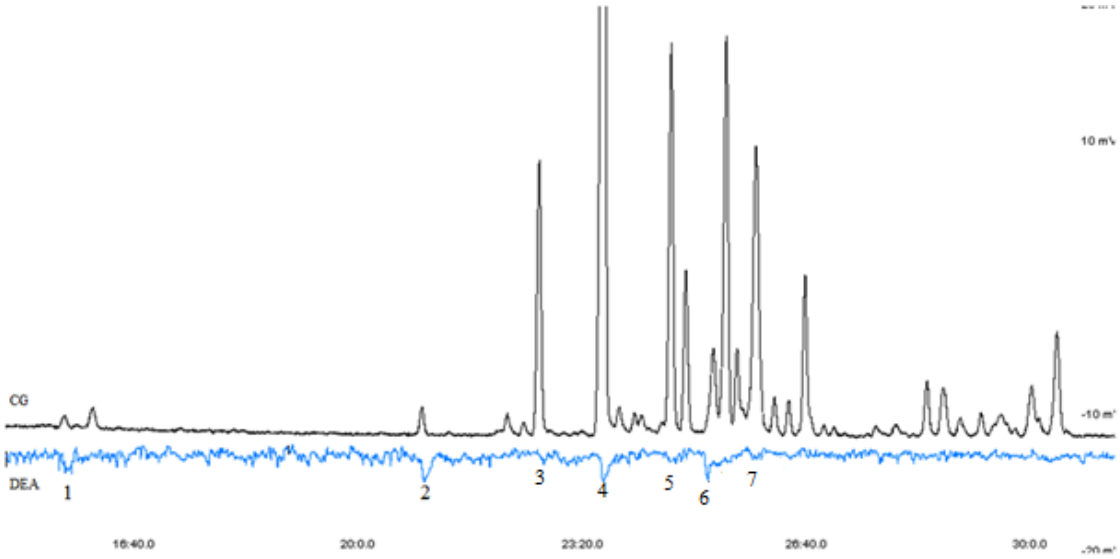

Fig. 2. Percepção dos compostos do óleo essencial de *Commiphora leptophloeos* pelas antenas de *Aedes aegypty* através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. 1, Terpinene-4-ol; 2, ð-Elemeno; 3, β-Elemeno; 4, trans-Cariofileno; 5, α-Humuleno; 6, γ-Muuroleno; 7, α-Selineno + Alaskene.

Campbell e colaboradores (2011) apontaram respostas eletrofisiológicas de 42 compostos de óleos essenciais de diversas plantas sobre *A. aegypti* no seu período de busca por alimento, incluindo o α-Felandreno, α-Pineno e β-Pineno, α-Terpineol e Germacreno D, compostos presente no óleo de *C. leptophloeos*. O trans-Cariofileno também foi descrito por estimular as antenas de *A. aegypti*, composto que faz parte do óleo de *C. leptophloeos* e que também estimulou a antena das fêmeas grávidas de *A. aegypti* (Campbell et al., 2011). Resultados semelhantes foram encontrados por Dekker e colaboradores (2011) que reportaram respostas eletroantenográficas do trans-Cariofileno e α-Cariofileno (ou α-Humuleno). Nesse contexto, é interessante observar a sensibilidade de *A. aegypti* a análogos do Cariofileno, sendo obtidas respostas para o trans-Cariofileno, e α-Cariofileno.

As antenas são os principais sítios de localização dos quimiorreceptores que ajudam os mosquitos a detectar os estímulos do ar, e orientam a localização de um sítio de oviposição adequado (Davis, 1976). As sensilas trichodea tipo II nas antenas de fêmeas de *A. aegypti* foram descritas por serem específicas na percepção de substâncias químicas associadas com a localização de um sítio de oviposição adequado por fêmeas grávidas (Davis, 1976). O método eletroantenográfico (DEA), realizado no presente trabalho, representa a medida da soma das

mudanças nos potenciais de ação dos neurônios receptores que quando estimulados por um odor, desencadeiam uma série de respostas provenientes de células olfativas que se localizam ao longo de uma antena (Sant'Ana e Stein, 2001). Geralmente os odores capazes de gerar uma resposta eletrofisiológica, são aqueles que apresentam algum papel comportamental na biologia de um inseto. Através das análises eletrofisiológicas é possível identificar quais compostos são reconhecidos por determinada espécie, porém não é possível inferir que tipo de influencia comportamental uma determinada substância pode gerar, logo, para isso são necessários testes comportamentais.

A partir dos resultados obtidos nas análises em CG/DEA foram escolhidos dois compostos para determinação da preferência de oviposição pelas fêmeas grávidas de *A. aegypti*, o trans- Cariofileno e o α-Humuleno, tal escolha foi baseada na disponibilidade imediata destes compostos para realização dos testes. Bioensaios de oviposição também foram realizados com o α-Felandreno, composto majoritário do óleo essencial de *C. leptophloeos.* O α-Felandreno foi testado na concentração de 26 ppm por ser a concentração que mais se aproxima da sua proporção na constituição do óleo, a mesma regra foi aplicada para o trans-Cariofileno e o α-Humuleno. O α-Felandreno não induziu uma resposta na oviposição para as fêmeas de *A. aegypti* ($p < 0.2$). Em contrapartida o trans-Cariofileno e o α-Humuleno foram deterrentes de oviposição, sendo cerca de 59 a 68% dos ovos depositados nos recipiente que continham a solução controle, respectivamente, Figura 3.

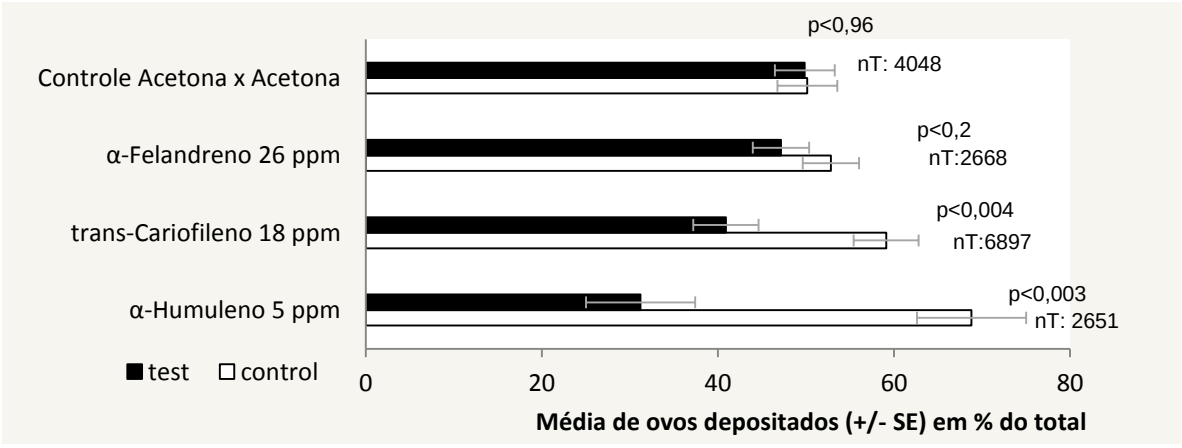

Fig. 3. Respostas de oviposição de fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* aos compostos majoritários do óleo essencial de *Commiphora leptophloeos* e compostos que apresentaram respostas eletrofisiológicas. Os valores representam a porcentagem do total de ovos depositados em resposta ao tratamento. nT- número total de ovos; * diferença significativa.

O α-Felandreno já foi reportado por possuir atividade repelente sobre a mosca branca, *Bemisia tabaci*, em plantações de tomate, diminuindo significativamente sua infestação por essa praga (Bleeker et al., 2009). Porém não houve resposta significativa no comportamento de oviposição das fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* para esse composto, o que era esperado já que este composto não promoveu resposta nos testes eletrofisiológicos.

O trans-cariofileno é um composto amplamente distribuído entre os óleos essenciais de espécies vegetais. Diversas atividades são atribuídas a esse composto como, anti-inflamatória, antigenotóxica, anestésica, ansiolítica, no uso em fragrâncias e cosméticos, entre outras (Fernandes et al., 2007; Sotto et al., 2010; Ghelardini et al., 2001; Galdino et al., 2012; Sköld et al., 2006). A atividade deterrente do óleo de *C. leptophloeos* pode ser atribuída a sua presença em proporção significante no óleo ou a atividade sinergética deste composto com outros constituintes presentes no óleo, como o α-Humuleno, o qual também apresentou resposta deterrente significativa na concentração de 5 ppm. Ambos foram capazes de repelir em cerca de 60% e 70% o número de ovos no recipiente teste respectivamente. Nesse contexto, por ser um composto amplamente distribuído e por induzir um comportamento de deterrencia frente a oviposição de *A. aegypti*, o trans- Cariofileno pode ser considerado uma alternativa acessível ao combate do mosquito, assim como o α-Humuleno.

Segundo Consoli e Oliveira (1994), as fêmeas podem utilizar quimiorreceptores dos tarsos para avaliar as características dos sítios de oviposição. Dessa forma podemos atribuir a capacidade de deterrencia do óleo de *C. leptophloeos* não só ao reconhecimento por receptores presentes nas antenas das fêmeas de *A. aegypti*, mas também a características percebidas pelo mosquito através do pouso no local de oviposição.

A partir dos testes para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *C. leptophloeos* nas concentrações preliminares de 100, 50 e 10 ppm, observou-se mortalidade significativa das larvas próxima da concentração de 100 ppm. Posteriormente através de testes em diferentes concentrações constatou-se a CL_{50} do óleo essencial de *C. leptophloeos* na concentração de 99,4 ppm. Entre espécies da família existem relatos sobre a atividade larvicida de extratos de *Canarium zeylanicum* (Burseraceae) sobre *A. aegypti*, *A. albopictus* e *Culex quinquefasciatus* (Ranaweera, 1996). Ainda *C. molmol* foi relatada por apresentar atividade larvicida dos seus óleos essenciais contra *Culex pipiens* (Habeeb et al., 2009). O α-Felandreno, composto majoritário do óleo de *C. leptophloeos*, é reportado na literatura por

possuir atividade inseticida para algumas espécies (Park et al., 2003), dentre elas podemos citar a atividade larvicida contra *A. aegypti* e *A. albopictus* com valores de CL_{50} de 16,6 µg/mL e 39,9 µg/mL respectivamente (Cheng et al., 2009), podendo ser atribuída a sua presença a atividade larvicida do óleo essencial de *C. leptophloeos*. Os nossos resultados mostraram que a fêmea do mosquito não é capaz de detectar a presença deste composto no sítio de oviposição, porém este é um composto larvicida, assim o α-Felandreno poderia ser usado no controle da disseminação das larvas *Aedes aegypti*. Além disso, o trans-cariofileno e o α-humuleno podem ser usados em potenciais sítios de oviposição diminuindo a deposição de ovos em tais sítios.

4. Conclusão

O óleo essencial de folhas de *Commiphora leptophloeos* é rico em compostos derivados de terpenóides e possui compostos claramente reconhecidos por fêmeas grávidas de *A. aegypti* através de CG-DEA. O óleo essencial possui atividade deterrente de oviposição entre as concentrações de 100 a 25 ppm, e o α-Humuleno e o trans-Cariofileno foram confirmados como princípios ativos deste óleo, podendo ser usados em sítios de oviposição para inibir a oviposição da fêmea do *A. aegypti*. O óleo essencial também apresentou potencial larvicida, o que pode ajudar a controlar a disseminação do mosquito em áreas urbanas.

5. Referencias bibliográficas

Abdel-Aziz, S. E., Ismail, I. A. 2000. The effectiveness of certain plants oils as protectants of broad bean against the infestation by *Bruchidius incarnates* Schm. (Coleoptera) during storage. Ann. Agr. Sci. 45- 717-725.

Adams, R.P., 2009. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, fourth ed. Allured Publishing Co., Carol Stream, IL.

Agra, M. F. et al., 2007. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. J. Ethnopharmacol. 111, 383-395.

Albuquerque, U. P. et al., 2007. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. J. Ethnopharmacol. 114, 325-354.

Ali, N. A. A. et al., 2008. Essential oil composition from oleogum resin of Soqotraen *Commiphora kua*. Rec. Nat. Prod. 2, 70-75.

Ali, N. A. A. et al., 2009. Chemical composition of essential oil from the oleogum resin of *Commiphora habessinica* (Berg.) Engl. From Yemen. J. Essent. Oil Bear. Pl. 12, 244-249.

Amiel, E. et al., 2012. β- Caryophyllene, a compound isolated from the biblical balm of Gilead (*Commiphora gileadensis*), is a selective apoptosis inducer for tumor cell lines. J. Evid. Based Complementary Altern. Med. 2012, 1-8.

Asres, K. et al., 1998. Terpenoid composition of the wound-induced bark exudates of *Commiphora tenuis* from Ethiopia. Planta Med. 64, 473-475.

Autran, E.S., et al., 2009. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum*, Jacq. Bioresource Technol. 100, 2284–2288.

Avlessi, F. et al., 2005. Aromatic plants of tropical West Africa. Part XV. Chemical and biological evaluation of leaf essential oil of *Commiphora Africana* from Benin. J. Essent. Oil Res. 17, 569-571.

Ayédoun, M. A. et al., 1998. Aromatic plants of tropical West Africa. VI. α-Oxobisabolene as main constituent of the leaf essential oil of *Commiphora Africana* (A. Rich.) Engl. From Benin. J. Essent. Oil. Res. 10, 105-107.

Bissinger, B. W., Roe, R. M., 2010. Tick repellents: Past, present, and future. Pestic. Biochem, Phys. 96, 63-79.

Bleeker, P. M. et al., 2009. The role of specific tomato volatiles in tomato-whitefly interaction. Plant Physiol. 151, 925-935.

Campbell, C. et al., 2011. Forty-two compounds in eleven essential oils elicit antennal responses from *Aedes aegypti*. Entomol. Exp. Appl. 138, 21-32.

Carroll, J. F. et al., 1989. An extract of *Commiphora arythraea*: a repellent and toxicant against ticks. Entomol. Exp. Appl. 53, 111-116.

Cartaxo, S. L. et al., 2010. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. J. Ethnopharmacol. 131, 326-342.

Cheng, S. S. et al., 2009. Chemical composition and larvicidal activities of leaf essential oil from two eucalyptus species. Bioresource Technol. 100, 452-456.

Consoli, R. A. G. B., Oliveira, R. L., 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Edt. Fiocruz, Rio de Janeiro.

Davis, E. E., 1976. A receptor sensitive to oviposition site attractants on the antennae of the mosquito, *Aedes aegypti*. J. Insect Physiol. 22, 1371-1376.

Dekker, T. et al., 2011. Identification of mosquito repellent odours from *Ocimum forskolei*. Parasite. Vector. 4, 183.

Fernandes, E. S. et al., 2007. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-) – trans- Caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenaceae*. Eur. J. Pharmacol. 569, 228-236.

Ferreira- Júnior, W. S. et al., 2011. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflemmatory activity in the Brazilian Northeast. J. Ethnopharmacol. 138, 238-252.

Galdino, P. M. et al., 2012. The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. Leaves and its major component, β-Caryophyllene, in male mice. Prog. Neuro-Psychoph. 38, 276-284.

Ghelardini, C. et al., 2001. Local anesthetic activity of β- Caryophyllene. Farmaco. 56, 387-389.

Habeeb, S. M. et al., 2009. Efficiency of *Allium cepa* and *Commiphora molmol* as a larvicidal agent against fourth stage larvae of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Am. Eurasian. J. Agric. Environ. Sci. 5, 196-203.

Hanuš, L. O. et al., 2005. Myrrh – *Commiphora* chemistry. Biomed. Papers. 149, 3-28.

Junor, G. A. O. et al., 2008. Chemical composition and insecticidal activity of the essential oils from *Bursera hollickii* (Britton) found in Jamaica. J. Essent. Oil Res. 20, 560-565.

Khandagle, A. J. et al., 2011. Bioactivity of essential oils of *Zingiber officinalis* and *Achyranthes aspera* against mosquitoes. Parasitol. Res. 109, 339-343.

Langenhein, J. H., 2003. Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany. Timber Press, Cambridge.

Maciel, M. V. et al., 2010. Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. Ver. Bras. Pl. Med. 12, 105-112.

Meshram, P. B.. 2000. Antifeedant and insecticidal activity of some medicinal plant extracts against *Dalbergia sissoo* defoliator *Plecoptera reflexa* Gue. (Lepdoptera: Noctuide). Indian Forester. 126, 961-965.

Monthana, R. A. et al., 2010. Chemical analysis and biological activity of the essential oils of two endemic Soqotri *Commiphora* species. Molecules. 15, 689-698.

Navarro, D.M.A.F., et al., 2003. The potential attractant or repellent effects of different water types on oviposition in Aedes aegypti L. (Diptera: Culicidae). J. Appl. Entomol. 127, 46–50.

Noge, K., Becerra, J., 2009. Germacrene D, a common sesquiterpene in the genus *Bursera* (Burseraceae). Molecules. 14, 5289-5297.

Park, I. K. et al., 2003. Insecticidal activities of constituents indentified in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtuse* against *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Sitophilus oryzae* (L.). J. Stored Prod. Res. 39, 375-384.

Pontes, W. J. T. et al., 2007. Chemical composition and acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium haptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). Acta. Amaz. 37, 103-110.

Pontes, W. J. T. et al., 2010. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oils from fruits and leaves of *Protium bahianum* Daly. J. Essent. Oil Res. 22, 279-282.

Prajapati, V. et al., 2005. Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oil against *Anopheles stephensis*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Bioresource Technol. 96, 1749-1757.

Ranaweera, S. S., 1996. Mosquito-larvicidal activity of some Srilankan plants. J. Natn. Sci. Coun. Sri Lanka. 24, 63-70.

Santos, G. K. N. et al., 2012. Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): Chemical composition. Oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. Ind. Crop. Prod. 40, 254-260.

Sant'Ana, J., Stein, K, 2001. Extração e identificação de substâncias bioativas de insetos, In: Ferreira et al., Produtos naturais no controle de insetos, Edt. UFSCar, São Carlos, pp. 47-74.

Shen, T. et al., 2012. The genus *Commiphora*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. J. Ethnopharmacol. 142, 319-330.

Simas, N. K. et al. 2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. Quim. Nova. 27, 46-49.

Simões, C. M. O., Spitzer, V., 1999. Óleos voláteis, In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia da planta ao medicamento, Edt. UFRGS, Porto Alegre, pp. 467-495.

Sköld, M. et al., 2006. The fragrance chemical β- Caryophyllene – air oxidation and skin sensitization. Food Chem. Toxicol. 44, 538-545.

Sotto, A. et al., 2010. Inhibition by β- Caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. Mutat. Res. 699, 23- 28.

Trentin, D. S. et al., 2011. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. J. Ethnopharmacol. 137, 327-335.

Van den Dool, H., Kratz, P.D., 1963. A generalization of the retention index system including linear programmed gas–liquid partition chromatography. J. Chromatogr. 11, 463–471.

Warikoo, R. et al., 2011. Oviposition-altering and ovicidal potential of five essential oils against female adults of the dengue vector; *Aedes aegypti*. Parasitol. Res. 109, 1125-1131.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue and severe dengue. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/> Acesso em 04 dez. 2012.

6. APENDICES

6.1 Apêndice A: Procedimentos para montagem dos experimentos eletrofisiológicos

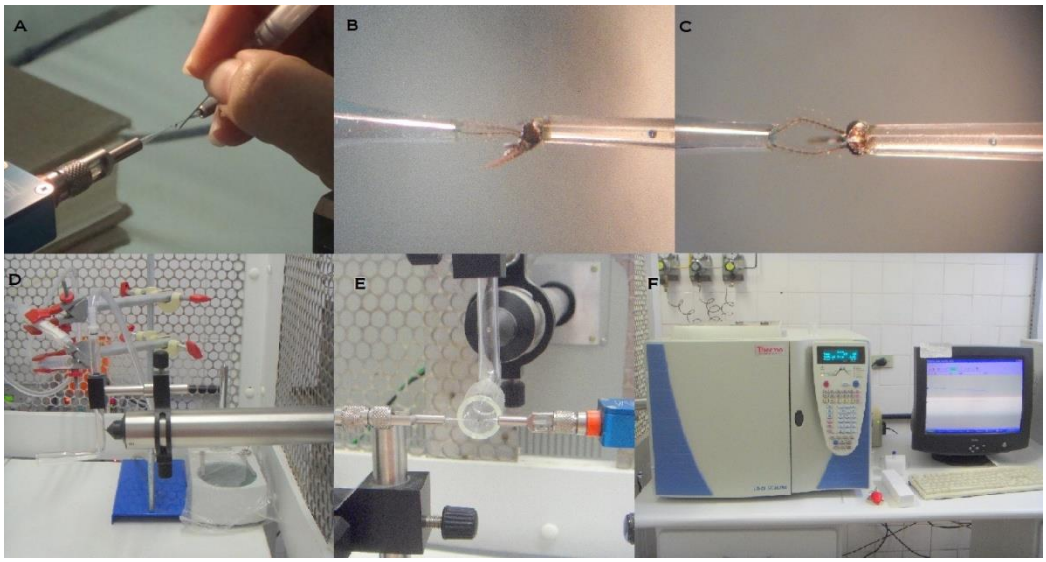

Fig. 4: Procedimentos para as análises eletrofisiológicas. A, B e C) montagem das antenas de *Aedes aegypti* entre os capilares conectados a eletrodos de fio de prata; D e E) vista lateral e frontal da saída do cromatógrafo gasoso direcionado para a antena do mosquito; F) sistema cromatógrafo gasoso – detector eletroantenográfico.

6.2 Apendice B: Procedimentos para montagem dos experimentos de oviposição

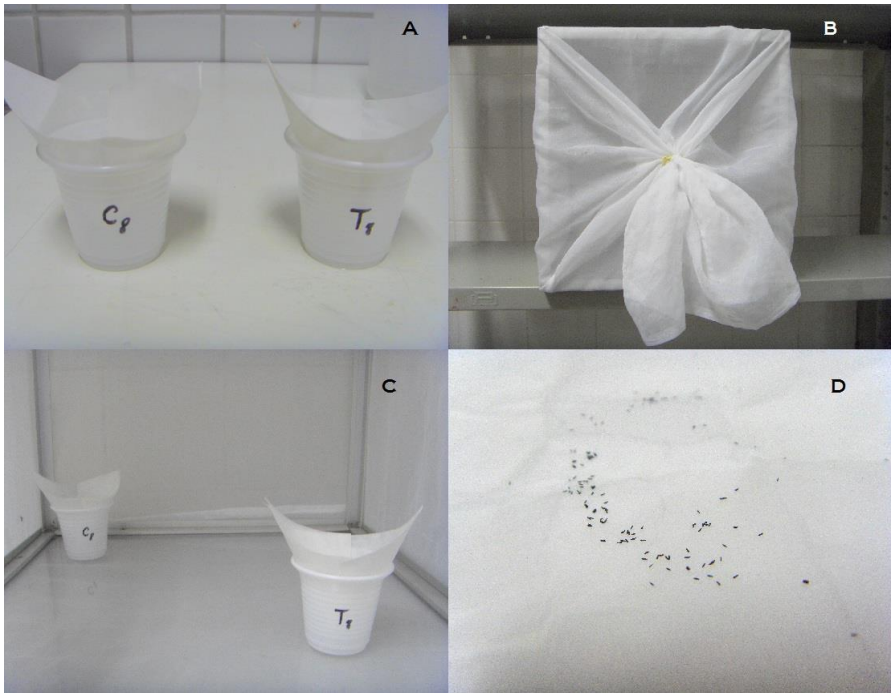

Fig. 5: Montagem do experimento de oviposição. A) recipientes de plástico contento a solução teste (descrita pela letra T) e a solução controle (descrita pela letra C); B) gaiola de bioensaio; C) recipientes dispostos em extremidades opostas da gaiola de bioensaio; D) ovos do mosquito *Aedes aegypti* ao final do experimento.