

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA NORMAL SUPERIOR
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ELGA CRISTINA TORRES PEREIRA

ATIVIDADE LARVICIDA DE *Piper alatipetiolatum* E *Piper purusanum* CONTRA *Aedes albopictus* SKUSE, 1894 (DIPTERA: CULICIDAE)

MANAUS – AM

2018

ELGA CRISTINA TORRES PEREIRA

ATIVIDADE LARVICIDA DE *Piper alatipetiolatum* E *Piper purusanum* CONTRA *Aedes albopictus* SKUSE, 1894 (DIPTERA: CULICIDAE)

Monografia apresentada como pré-requisito para conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas – UEA.

Orientador: Prof.º D.r Raimundo Sousa Lima Júnior

Coorientadora: D.ra Rosemary Aparecida Roque

MANAUS – AM

2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

436a	<p>Pereira, Elga Cristina Torres Atividade larvicida de <i>Piper alatipetiolatum</i> e <i>Piper purusanum</i> contra <i>Aedes albopictus</i> Skuse, 1894 (Diptera: Culicidae) / Elga Cristina Torres Pereira. Manaus : [s.n.], 2018. 48 f.: color.; 30 cm.</p> <p>TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2018. Inclui bibliografia Orientador: Raimundo Sousa Lima Júnior Coorientador: Rosemary Aparecida Roque</p> <p>1. Atividade larvicida. 2. Controle vetorial. 3. Óleos essenciais. 4. Extratos vegetais. 5. Piperaceae. I. Raimundo Sousa Lima Júnior (Orient.). II. Rosemary Aparecida Roque (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Atividade larvicida de <i>Piper alatipetiolatum</i> e <i>Piper purusanum</i> contra <i>Aedes albopictus</i> Skuse, 1894 (Diptera: Culicidae)</p>
------	---



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR - ENS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO FINAL DO TCC IV (NOTA DA API)

ALUNO: Elga Cristina Taveira Pereira
TÍTULO DO TCC: Atividade larvívora de <i>Piper alatipectiolatum</i> e <i>Piper purpuraceum</i> (Piperaceae) contra <i>Aedes albopictus</i> Skene, 1894

AVALIAÇÃO DA BANCA AVALIADORA

BANCA EXAMINADORA	NOTAS ATRIBUÍDAS
a) Professor orientador: ROSEMARY ROQUE	9,6
b) 1º avaliador(a): HECTOR KOOLEN	9,8
c) 2º avaliador(a): Rejane de Castro Simões	10,0
MÉDIA DA NOTA (a+b+c)/3	

MÉDIA DA NOTA: 9,8

Manaus, 28 de Novembro de 2018

ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA AVALIADORA

Rosemary Roque
Orientador(a)

Hector Kooleen
1º Avaliador(a)

Rejane de C. Simões
2º Avaliador(a)

A minha mãe, que sempre esteve comigo em
todos os momentos, com amor,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar alegria para chegar até o fim.

Aos meus pais, Maria do Céu e Luciano pelo apoio financeiro; por terem me incentivado a seguir os meus sonhos e pelos sacrifícios que fizeram para que eu os alcançasse. Obrigada pelas oportunidades, sou eternamente grata! Aos meus irmãos, Ismael e Vitor, pelo incentivo e compreensão; aos meus amados sobrinhos, Yuri, Vinnycius, Chloe e Lavínia, por serem a minha esperança.

Aos amigos e todos aqueles que estiveram presentes em algum momento desse meu caminhar, obrigada por acreditarem em mim e sempre ter palavras de incentivo nos dias ruins, Douglas, JP (João Paulo), Felipe, Kelly e Danielly. Em especial, agradeço à Aline Santiago e Paulo Cezar pelo companheirismo. Aos colegas de curso, obrigada pelos momentos compartilhados.

Aos professores que sempre estiveram dispostos a contribuir para o meu aprendizado, em especial aos meus orientadores, Raimundo Júnior e Rosemary Roque pelos ensinamentos, paciência e principalmente confiança.

Agradeço ao D.r Wanderli Pedro Tadei (chefe do Laboratório de Malária e Dengue do INPA) e aos amigos de laboratório, sem os quais não seria possível realizar esse trabalho, obrigada por todo suporte e confiança. À Rejane Simões, pela amizade, palavras de conforto e fé; ao Juracy pela ajuda com os cálculos de concentrações; ao William, Cláudia e Thaís, pela ajuda na manutenção do insetário; ao Augusto Ferreira pelas sugestões e ajuda com as fotos das larvas.

Ao Laboratório de Abertura de Amostras e Ensaios Químicos – LAEQ/UFAM e ao André Correa, por me ajudar com os bioensaios de extratos e óleos essenciais.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada!

“O Senhor é bom, é fortaleza no dia da angústia e conhece os que nele confiam.”

Naum 1:7.

RESUMO

Aedes albopictus é o principal vetor de diversas arboviroses como a Dengue, Zika e Chikungunya, em países em que a barreira térmica é um fator limitante ao *Aedes aegypti*. A utilização de produtos de origem vegetal, como extratos e óleos essenciais para o controle desses mosquitos aumentou nas últimas décadas devido à necessidade de descobrir novos compostos com atividade inseticida, uma vez que populações desses vetores têm apresentado resistência aos inseticidas sintéticos utilizados. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial larvicida dos extratos metanólicos e óleos essenciais obtidos das folhas de *Piper alatipetiolatum* e *Piper purusanum* contra larvas de 3º instar de *A. albopictus*, em condições de laboratório. Os bioensaios seletivos foram realizados em triplicata com duas repetições, consistindo em um grupo controle (Cont-1 e Cont-2) e três concentrações do extrato ou óleo essencial das espécies botânicas (125, 250 e 500 ppm); os de dose foram realizados em quintuplicata, com cinco repetições e sete concentrações dos óleos essenciais, que foram de 25 a 175 ppm para *P. alatipetiolatum* e 50 a 200 ppm para *P. purusanum*. A mortalidade foi verificada nos intervalos de 24, 48 e 72 h. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguido do Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) pelo programa Bioestat 5.3 e a eficiência dos óleos essenciais foi comparada pelos valores das concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}), pelo modelo de Probit. Os resultados demonstraram que o extrato e o óleo essencial de ambas as espécies possuem atividade larvicida sobre *A. albopictus* já nas primeiras 24 h, no entanto, os percentuais de mortalidade causados pelos extratos foram baixos (máximo de 78,3 % para *P. alatipetiolatum* e máximo de 8,3 % para *P. purusanum* somente em 500 ppm e após 72 h). O óleo essencial de ambas as espécies vegetais apresentou atividade desde as menores concentrações (25 e 50 ppm em *P. alatipetiolatum*, e 50 e 75 ppm em *P. purusanum*), no entanto, verificou-se que as mortalidades nessas concentrações não diferiram significativamente dos controles ($p > 0,05$). Os resultados demonstram ainda, que as concentrações de 75 e 100 ppm de *P. alatipetiolatum* causaram percentuais de mortalidade significativamente diferentes entre si, entre o grupo controle, e entre as concentrações mais altas (125 a 175 ppm), em todos os intervalos de observação. No entanto, as concentrações de 125 a 175 ppm não diferiram significativamente entre si e, no último intervalo de observação (72 h) a mortalidade em 100 ppm passou a ser igual a 125 e 150 ppm. Para *P. purusanum* as concentrações de 100 a 200 ppm causaram mortalidades significativamente diferentes entre si, no intervalo de 24 h, mas a partir de 48 h foi observado que 125 e 150 ppm e 175 e 200 ppm não apresentaram diferença estatística significativa. Portanto, a partir de 48 h, para ambas as

espécies de piperáceas, o aumento do tempo de exposição não foi diretamente proporcional ao percentual de mortalidade, independente da concentração utilizada. Os menores valores de CL₅₀ e CL₉₀ obtidos para *P. alatifoliolatum* comprovam a melhor atividade dessa espécie sobre o mosquito vetor, com potencial para ser utilizada em futuras estratégias de controle de *A. albopictus*, principalmente se estudos forem realizados para conhecer os compostos que conferem essa atividade larvicida.

Palavras-chave: Atividade larvicida, controle vetorial, óleos essenciais, extratos vegetais, Piperaceae.

ABSTRACT

Aedes albopictus is the main vector of several arboviruses such as Dengue, Zika and Chikungunya, in some countries where the thermal barrier is a limiting factor for *Aedes aegypti*. The use of plant products such as extracts and essential oils to control these mosquitoes has increased in the last decades, due to the need to discover new compounds with insecticidal activity, since populations of these vectors have shown resistance to the synthetic insecticides used. In this way, the objective of this study was to evaluate the larvicidal potential of methanolic extracts and essential oils obtained from leaves of *P. alatifoliolatum* and *P. purusanum* against immatures of *A. albopictus* under laboratory conditions. The selective bioassays were performed in triplicate with two replicates, consisting of a control group (Cont-1 and Cont-2) and three concentrations of the extract or essential oil of botanical species (125, 250 e 500 ppm); the doses were done in quintupleta with five replicates and seven concentrations of the essential oils, which were from 25 to 175 ppm for *P. alatifoliolatum* and 50 to 200 ppm for *P. purusanum*. Mortality was verified at the intervals of 24, 48 and 72 h. The data were submitted to Analysis of Variance (ANOVA), followed by the Tukey Test ($\alpha = 0.05$) by the program Bioestat 5.3 and the efficiency of the essential oils was compared by the values of the lethal concentrations (LC₅₀ and CL₉₀), by the Probit model. The results showed that the extract and the essential oil of both species have larvicidal activity on *A. albopictus* already in the first 24 h, however, the percentages of mortality caused by the extracts were low (maximum of 78.3 % for *P. alatifoliolatum* and maximum of 8.3 % for *P. purusanum* only at 500 ppm and after 72 h). The essential oil of both plant species presented activity from the lowest concentrations (25 and 50 ppm in *P. alatifoliolatum*, and 50 and 75 ppm in *P. purusanum*), however, it was verified that the mortalities in these concentrations did not differ significantly from the controls ($p > 0.05$). The results also showed that concentrations of 75 and 100 ppm of *P. alatifoliolatum* caused significantly different percentages of mortality between the control

group and between the highest concentrations (125 to 175 ppm) at all observation intervals. However, concentrations of 125 to 175 ppm did not differ significantly from each other, and in the last observation interval (72 h) mortality at 100 ppm was equal to 125 and 150 ppm. For *P. purusanum* the concentrations of 100 to 200 ppm caused significantly different mortalities in the 24 h interval, but from 48 h it was observed that 125 and 150 ppm and 175 and 200 ppm showed no statistically significant difference. Therefore, from 48 h, for both species of piperaceae, the increase in exposure time was not directly proportional to the percentage of mortality, regardless of the concentration used. The lowest values of LC₅₀ and CL₉₀ obtained for *P. alatipetiolatum* confirm the best activity of this species on the vector mosquito, with potential to be used in future strategies of *A. albopictus* control, especially if studies are carried out to know the compounds that confer this larvicidal activity.

Key-words: Larvicidal activity, vectorial control, essential oils, plant extracts, Piperaceae.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo de vida dos mosquitos do gênero *Aedes* (Diptera: Culicidae). Fonte: Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994. 12
- Figura 2. Os mosquitos vetores *Aedes aegypti* (direita) e *Aedes albopictus* (esquerda). Fonte: University of Florida, 1999. 13
- Figura 3. *Piper alatipetiolatum*. Fotos: Oliveira, A.C., 2016..... 21
- Figura 4. *Piper purusanum*. Foto: Oliveira, A.C., 2016..... 21
- Figura 5. Locais de coleta das piperáceas. A) Local de coleta de *Piper alatipetiolatum* (Universidade Nilton Lins); B) Local de coleta de *Piper purusanum* (Ramal do Pau Rosa). Setas vermelhas indicam o local de coleta mais aproximado. Fonte: Adaptado de Oliveira, A.C., 2018. 22
- Figura 6. Coleta e manutenção de *Aedes albopictus* em laboratório. A) Palheta Eucatex; B) Imaturos de *Aedes albopictus* em bacia esmaltada; C) Ovitampas para coleta de ovos; D) Repasto sanguíneo em ramster. Fonte: Pereira-Torres, E.C., 2018..... 26
- Figura 7. Método da diluição seriada. 27
- Figura 8. Esquema utilizado para realizar os bioensaios seletivos..... 28
- Figura 9. Esquema utilizado para realizar os bioensaios de dose..... 29
- Figura 10. Percentuais de mortalidade das larvas de 3º instar de *Aedes albopictus* submetidas a sete concentrações do óleo essencial de *Piper alatipetiolatum*, nos intervalos de 24, 48 e 72 h. n=2.250. 34
- Figura 11. Percentuais de mortalidade das larvas de 3º instar de *Aedes albopictus* submetidas a sete concentrações do óleo essencial de *Piper purusanum*, nos intervalos de 24, 48 e 72 h. n=2.250. 34
- Figura 12. Alterações morfológicas nas larvas de *Aedes albopictus* causadas pelos óleos essenciais de *Piper alatipetiolatum* e *Piper purusanum*. A) Escurecimento da (1) cabeça, (2) tórax, (3) abdome e (4) sifão respiratório, dilatação entre cabeça e o tórax (5); B) Larvas com coloração de aspecto pálido. Foto: Ferreira, F.A, 2018..... 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mortalidade das larvas de 3º instar de <i>Aedes albopictus</i> submetidas a três concentrações do extrato metanólico de <i>Piper alatipetiolatum</i> , nos intervalos de 24, 48 e 72 h. n=300.	30
Tabela 2. Mortalidade das larvas de 3º instar de <i>Aedes albopictus</i> submetidas a três concentrações do extrato	31
Tabela 3. Mortalidade das larvas de 3º instar de <i>Aedes albopictus</i> submetidas a três concentrações do óleo essencial de <i>Piper alatipetiolatum</i> , nos intervalos de 24, 48 e 72 h. n=300.	32
Tabela 4. Mortalidade das larvas de 3º instar de <i>Aedes albopictus</i> submetidas a três concentrações do óleo essencial de <i>Piper purusanum</i> , nos intervalos de 24, 48 e 72 h. n=300.	33
Tabela 5. Atividade larvicida do óleo essencial de <i>Piper alatipetiolatum</i> contra <i>Aedes albopictus</i> nos intervalos	36
Tabela 6. Atividade larvicida do óleo essencial de <i>Piper purusanum</i> contra <i>Aedes albopictus</i> nos intervalos de 24, 48 e 72 h. n=2.250.	37
Tabela 7. Concentrações Letais dos óleos essenciais de <i>Piper alatipetiolatum</i> e <i>Piper purusanum</i> contra <i>Aedes albopictus</i> no intervalo de 24, 48 e 72 h.	37

SUMÁRIO

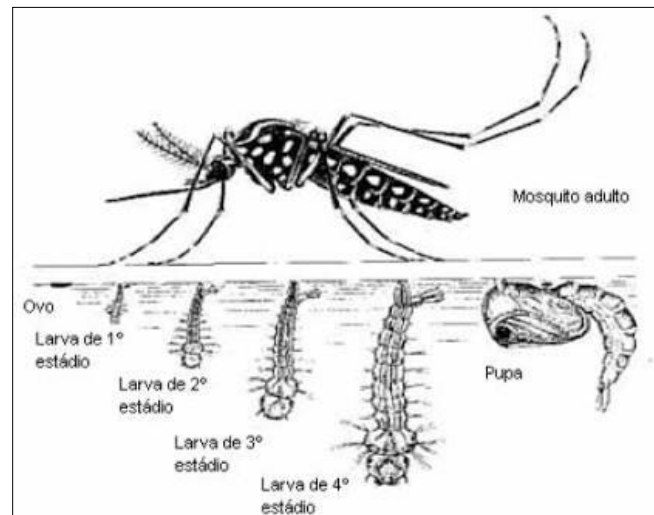
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Os mosquitos	12
1.1.1. Gênero <i>Aedes</i>	13
1.2. Arboviroses	14
1.2.1. Dengue	14
1.2.2. Chikungunya	15
1.2.3. Zika	16
1.3. Controle Vetorial	17
1.3.1. Produtos Vegetais para o Controle Vetorial	18
1.4. Família Piperaceae	19
1.4.1. Gênero <i>Piper</i>	19
2. OBJETIVO	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Coleta e Obtenção dos Extratos e Óleos Essenciais	22
3.1.1. Coleta das Espécies Vegetais	22
3.1.2. Identificação Taxonômica	22
3.1.3. Higienização e Desidratação do Material Vegetal	23
3.1.4. Trituração do Material vegetal	23
3.1.5. Extração dos Extratos Metanólicos e Óleos Essenciais	23
3.2. Coleta de <i>Aedes albopictus</i> e Manutenção em Laboratório	25
3.3. Bioensaios	26
3.3.1. Bioensaios Seletivos	26
3.3.2. Bioensaios de Dose	28
3.4. Análise dos Dados	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Coleta de <i>Aedes albopictus</i>	29
4.2. Bioensaios Seletivos	30
4.2.1. Extratos Metanólicos	30
4.2.2. Óleos Essenciais	32
4.3. Bioensaios de Dose	33
4.4. Alterações comportamentais e mudanças morfológicas nas larvas causadas pelos óleos essenciais	39
5. CONCLUSÃO	41
6. REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os mosquitos

Os mosquitos são insetos numerosos e cosmopolitas, pertencentes à família Culicidae e à ordem Diptera, também conhecidos popularmente como pernilongos, muriçocas e carapanãs. Insetos dessa ordem possuem o ciclo de vida holometábolo (do grego *holos*, total e *metabolé*, mudança), ou seja, uma metamorfose completa, compreendendo quatro estágios no ciclo de vida – ovo, larva, pupa e adulto (=imago), este segundo, com quatro estádios ou instars – L1, L2, L3 e L4, na família Culicidae (Figura 1) (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Figura 1. Ciclo de vida dos mosquitos do gênero *Aedes* (Diptera:Culicidae). Fonte: Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994.



Na família Culicidae a maioria das fêmeas são hematófagas, ou seja, necessitam do sangue de outros animais para o amadurecimento dos ovos e os machos alimentam-se exclusivamente de néctar e outros líquidos vegetais (FORATTINI, 2002). Nesta família estão inseridos três gêneros de grande interesse médico – *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* – transmitindo a dengue, malária e filariose, respectivamente, que causam grande mortalidade e morbidade em países tropicais e subtropicais (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Muitos dípteros possuem uma relação tão próxima com a espécie humana, que são vetores de uma quantidade significativa de doenças sinantrópicas e aos animais domésticos. Exemplos de doenças causadas por dípteros são a febre amarela (Culicidae), leishmaniose (Psychodidae), malária (Culicidae) e a doença-do-sono (Glossinidae) (RAFAEL et al., 2012).

1.1.1. Gênero *Aedes*

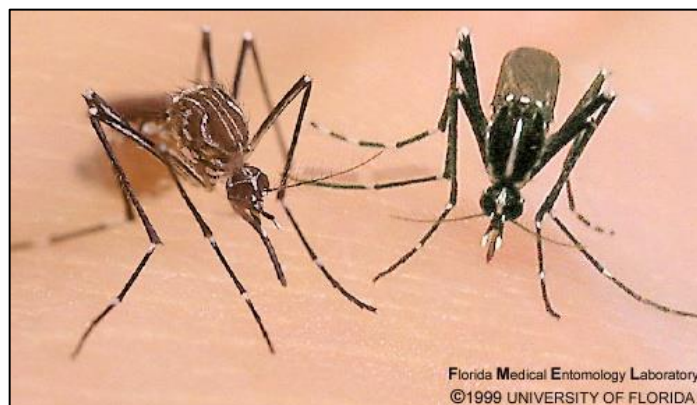
O gênero *Aedes* apresenta distribuição cosmopolita, ocorrendo desde a América do Sul ao Oriente Médio. Espécies deste gênero constituem problemas para a saúde pública no mundo, pois são vetores de diversas arboviroses (*arthropod borne virus*), como a febre amarela urbana, dengue, chikungunya, zika, entre outras, transmitidas principalmente pelo *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 (CHADEE et al., 2014; HAPAIRAI et al., 2014).

Aedes (Stegomyia) albopictus Skuse, 1894 é o principal transmissor do dengue, febre amarela urbana e silvestre e encefalite em países asiáticos, de onde é originário, mas apresenta ampla distribuição geográfica (FIOCRUZ, 2016). Essa espécie foi registrada no Brasil pela primeira vez por Forattini (1986), no Estado do Rio de Janeiro.

A. albopictus é considerado o principal transmissor da dengue em países em que a barreira térmica é um dos principais fatores limitantes ao *A. aegypti*, uma vez que estes possuem a mesma capacidade de proliferação e a transmissão transovariana dos vírus já foi comprovada (IOC, 2008; FIOCRUZ, 2016).

Os dois mosquitos são espécies invasoras e cosmopolitas. *A. aegypti*, de comportamento antropofílico, é encontrado com maior frequência em locais de aglomeração humana, realizando repasto sanguíneo e repouso no interior das habitações. *A. albopictus*, possui comportamento alimentar diverso, com maior frequência em áreas de menor aglomeração humana, alimentando-se e repousando preferencialmente no peridomicílio (HONÓRIO et al., 2015) (Figura 2).

Figura 2. Os mosquitos vetores *Aedes aegypti* (direita) e *Aedes albopictus* (esquerda). Fonte: University of Florida, 1999.



Apesar das diferenças de comportamento e preferências alimentares, diversos autores investigaram uma variação sazonal nas populações dessas duas espécies, que ocorre principalmente nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, evidenciando que *A.*

albopictus pode ser o principal vetor quando há aumento da sua população (GLASSER & GOMES, 2002; SERPA et al., 2006; PROPHIRO et al., 2011).

Sá (2004) estudou as áreas de ocorrência de *A. albopictus* e os seus criadouros preferenciais nas áreas urbanas e periurbanas de Manaus, estado do Amazonas e verificou a ocorrência dessa espécie sozinha nos criadouros e em coexistência com *A. aegypti* e/ou com outras espécies de culicídeos. Além disso, os resultados do estudo indicaram que *A. albopictus* ocorre com maior incidência em recipientes artificiais localizados na interface mata/perímetro urbano e periurbano e nos recipientes naturais situados em áreas de alterações antrópicas, demonstrando extensa distribuição na periferia de Manaus.

A preocupação com *A. albopictus* tem aumentado nas últimas décadas devido a sua dramática expansão global e por ser um potencial vetor de várias arboviroses, como já mencionado. Apesar de *A. albopictus* desempenhar um papel relativamente menor em comparação com o *A. aegypti*, sabe-se que o status de vetor é um processo dinâmico, ou seja, que no futuro poderia mudar de maneira epidemiologicamente importante (LAMBRECHTS et al., 2010).

Além disso, Santos (2017) demonstrou experimentalmente que *A. albopictus*, embora ainda suscetível aos inseticidas utilizados em campanhas de vigilância em saúde, o mesmo já apresenta uma certa tolerância a estes, devido habitar parte dos ambientes de *A. aegypti*, onde acaba sofrendo pressão seletiva pelos inseticidas.

1.2. Arboviroses

1.2.1. Dengue

A dengue é uma infecção viral transmitida principalmente pelo mosquito *A. aegypti*, no Brasil e na Ásia, pelo *A. albopictus*. Essa doença é causada pelo vírus da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Há quatro tipos sorologicamente distintos do Dengue vírus (DENV): DENV1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, que podem causar tanto a manifestação clássica da doença quanto à forma grave. Esses vírus são antigenicamente diferentes, não induzem proteção imunológica cruzada, porém, têm a mesma epidemiologia e causam doenças semelhantes em humanos. Há um quinto sorotipo (DENV-5), que foi detectado na Malásia, mas até o momento ocorre em primatas e não em humanos (CECILIO, 2013; WHO, 2018a).

Dentre os sintomas da dengue estão a febre, dor de cabeça, dores pelo corpo, náuseas ou até mesmo não apresentar qualquer sintoma. O aparecimento de manchas vermelhas na pele, sangramentos (nariz, gengivas), dor abdominal intensa e contínua e vômitos persistentes podem indicar um sinal de alarme para dengue hemorrágica (dengue grave), uma das principais causas

de sintomas graves e morte entre crianças em alguns países da Ásia e da América Latina (WHO, 2018b).

A dengue ocorre em regiões caracterizadas por climas tropicais e subtropicais em todo o mundo, principalmente em áreas urbanas e semiurbanas, a doença não possui tratamento específico, mas a detecção precoce e o acesso a cuidados médicos adequados reduzem as taxas de mortalidade. Deste modo, a prevenção e o controle da dengue dependem de medidas efetivas de controle de vetores (WHO, 2018b).

Apesar de existir um programa específico para o controle da dengue (estabelecido desde 2002 pela Organização Pan-Americana da Saúde) e outras medidas adotadas em diversos países, por meio de órgãos internacionais, como a Organização Mundial de Saúde (OMS), a incidência global de dengue cresceu dramaticamente nas últimas décadas. Cerca de metade da população mundial está agora em risco (WHO, 2018b). O ano de 2016, foi caracterizado por grandes surtos de dengue em todo o mundo (OPAS/OMS, 2018).

A região das Américas registrou mais de 2,38 milhões de casos em 2016, onde o Brasil sozinho contribuiu com menos de 1,5 milhão de casos, com 1.032 mortes por dengue. Em 2017 houve uma redução significativa no número de casos de dengue nas Américas – de 2.177.171 casos em 2016 para 584.263 casos em 2017 (WHO, 2018b).

Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde (SVS/MS, 2018), em 2016 foram registrados 1.483.623 casos prováveis de dengue em todo o Brasil. Em 2017 239.389 foram registrados, sendo confirmados até 29/07, 144 óbitos por dengue.

Neste ano de 2018, até o dia 28/07, 187.830 casos prováveis de dengue foram registrados no país; destes, 106.285 (56 %) foram confirmados, 191 casos graves de dengue e 87 óbitos. O maior número de casos prováveis de dengue (68.768; 36,6 %) foi registrado na região Centro-Oeste em relação ao total do país e 11.565 casos (6,2 %) na região Norte, sendo 1.938 no estado do Amazonas e 2.948 casos no ano anterior (SVS/MS, 2018).

1.2.2. Chikungunya

O CHIKV (vírus chikungunya) é um *Alphavirus (Togaviridae)* com origem na África, que circula em ciclos silvestres envolvendo vetores do gênero *Aedes* e primatas não humanos. O vírus foi isolado em 1952, na Tanzânia. A primeira emergência com esse vírus ocorreu no sudeste asiático e na Índia. No Brasil, foi detectada a transmissão autóctone em setembro de 2014, no Oiapoque, município do estado do Amapá (HONÓRIO et al., 2009; 2015).

A infecção por CHIKV produz uma síndrome febril de início súbito e debilitante que afeta a maioria dos pacientes e persiste durante meses ou até mesmo anos. Devido à intensidade

desses sintomas articulares deram o nome Chikungunya (do africano Makonde, “andar curvado”). Estes fatores interferem na qualidade de vida do indivíduo, causando impactos econômicos significativos, devido à redução da produtividade (HONÓRIO et al., 2015).

A chikungunya pode variar nos aspectos clínicos, com casos graves e eventualmente óbitos, principalmente em pacientes idosos e crianças ou com comorbidades. O CHIKV pode, ainda, causar doença neurológica em idosos e neonatos e até mesmo ser fatal para o paciente (YASEEN et al., 2012).

No Brasil, em 2016 foram registrados 277.882 casos prováveis de febre de chikungunya, 185.593 em 2017 e, até o dia 28/07/2018, 65.395 casos, destes, 42.476 (65,0 %) foram confirmados e, 16 óbitos. A região sudeste apresenta até o momento, o maior número de casos prováveis em relação ao total do país (38.661; 59,1 %) (SVS/MS, 2018).

Neste ano, até o dia 28/07, foram registrados 39 casos prováveis de febre de chikungunya no estado do Amazonas com nenhum óbito e, 225 em 2017, também com nenhum óbito registrado (SVS/MS, 2018).

1.2.3. Zika

ZIKV (vírus Zika) é um *Flavivirus (Flaviviridae)*, transmitido por várias espécies do gênero *Aedes*. Esse vírus foi inicialmente isolado de um macaco-rhesus, na Floresta Zika, na Uganda em 1947. Após o primeiro humano ser infectado por ZIKV, diversos casos esporádicos foram relatados no Sudeste Asiático e na África Subsaariana (DICK et al., 1952; MLAKAR et al., 2016).

Em 2007 o ZIKV foi responsável pelo surto na Ilha Yap da Micronésia e grandes epidemias na Polinésia Francesa, Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa em 2013 e 2014 (CAO-LORMEAU et al., 2014).

Em 2015 houve um aumento dramático nos relatos de infecção por ZIKV nas Américas, sendo que o Brasil foi o país mais afetado, com estimativas de 440.000 a 1,3 milhão de casos autóctones de ZIKV (ECDPC, 2015).

O quadro clínico clássico da infecção pelo vírus Zika assemelha-se ao da dengue e chikungunya, o que dificulta o diagnóstico diferencial da doença. Os sintomas são: febre, dor de cabeça, artralgia, mialgia e erupção cutânea maculopapular (ECDPC, 2015).

Quadros clínicos com manifestações neurológicas e síndrome de Guillain-Barré foram descritos na Polinésia Francesa e no Brasil durante epidemias do vírus, o que indica uma possível associação entre infecção por ZIKV na gravidez e malformações fetais (IOOS et al., 2014; ECDPC, 2015).

Em relação à doença aguda pelo vírus Zika, em 2016 foram registrados 216.207 casos prováveis e, 17.593 casos em 2017, com um óbito confirmado, no estado de Rondônia (SVS/MS, 2018).

Neste ano, até o dia 28/07, 6.371 casos pelo vírus Zika foram registrados, destes, 2.616 (41,1%) foram confirmados, com dois óbitos, um em Alagoas e outro na Paraíba. No estado do Amazonas já foram registrados 298 casos prováveis e 381 no ano anterior (SVS/MS, 2018).

A partir de 08/11/2015 até 28/05/2018, 3.194 casos de alterações no crescimento e desenvolvimento possivelmente relacionados à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, foram confirmados (SVS/MS, 2018).

1.3. Controle Vetorial

Atualmente, o controle vetorial é a principal forma de controlar as referidas arboviroses, uma vez que ainda não há vacina eficaz para prevenção, somente para a febre amarela e dengue, em fase de testes (TADEI et al., 2010; GOLDING et al., 2015; OLLIARO et al., 2018; SAÚDE, 2018). O controle de vetores é importante para prevenir a infecção humana mediante o bloqueio ou redução da transmissão, uma vez que a ocorrência de epidemias geralmente está diretamente relacionada com a presença e a densidade de seus vetores, como o *A. aegypti* e o *A. albopictus* (BRAGA & VALLE, 2007).

O controle vetorial é feito por meio do controle integrado, que trata do planejamento unificado de controle ou, da união de diferentes formas de atuação, em que são selecionados os métodos apropriados e as populações são mantidas em níveis baixos, que não causam danos à saúde humana. Os componentes do controle integrado de vetores são: vigilância, redução da fonte (controle físico ou manejo ambiental); controle biológico (uso de predadores e patógenos), controle químico com uso de inseticidas (orgânicos ou inorgânicos) e repelentes, armadilhas e manejo da resistência a inseticidas (BRAGA & VALLE, 2007; TADEI, 2010). Uma vantagem adicional à utilização do controle integrado de vetores é que este pode conferir o controle não somente a uma única doença, ou seja, é possível controlar múltiplas doenças usando uma mesma infraestrutura de programa, o que resulta em maior eficácia e economia (GOLDING et al., 2015).

O controle químico é uma das metodologias mais adotadas como parte do controle integrado de vetores, principalmente após o desenvolvimento de inseticidas que permanecem ativos por períodos longos, como o DDT (dicloro-difenil-tricloro-etano), desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial (GOVINDARAJAN et al., 2016). No entanto, após décadas de uso do DDT, alguns espécimes de insetos passaram a tolerar as doses que antes eram letais em

baixas concentrações (HARAPAN et al., 2016). Diante disso, dosagens mais elevadas foram aplicadas para controlar as populações susceptíveis ao inseticida, resultando na perda da eficácia contra as populações mais resistentes, o que causou no fim do uso do DDT. A partir desse momento, deu-se início à busca por inseticidas sintéticos de outras classes químicas (BARANITHARAN et al., 2017).

A resistência, nesse contexto, é um processo seletivo e evolutivo no qual a constante aplicação de inseticidas leva a seleção de algumas espécies que possuem genes capazes de sintetizar enzimas que ajudam na metabolização de tais produtos ou dificultam a penetração na cutícula do vetor, por meio de diversos mecanismos, ocorrendo assim, a evolução de populações resistentes (MELO-SANTOS et al., 2010; LEVI et al., 2014).

Os inseticidas sintéticos das classes dos organofosforados, organoclorados, piretróides e carbamatos, que atuam sobre o sistema nervoso central dos insetos, foram e continuam sendo utilizados, em diversos países, como uma das principais ferramentas no controle do gênero *Aedes*. Contudo, esses inseticidas são responsáveis pelo aparecimento de populações resistentes, ocasionando problemas para o controle de vetores e atingem organismos não-alvo como a fauna e flora da área, causando impactos negativos ao meio ambiente (MELO-SANTOS et al., 2010; GARCEZ et al., 2013).

1.3.1. Produtos Vegetais para o Controle Vetorial

A ocorrência cada vez maior de populações resistentes de mosquitos, tem estimulado a procura por métodos alternativos para o controle vetorial. Neste sentido, compostos de origem vegetal constituem uma estratégia promissora e ambientalmente segura para reduzir a população de larvas de mosquitos, uma vez que as plantas são organismos que coevoluem com insetos e microrganismos, sendo fontes naturais de substâncias inseticidas produzidas e/ou acumuladas pelo vegetal em resposta a ataques (metabólitos secundários) (MARANGONI et al., 2012; GARCEZ et al., 2013).

Os produtos obtidos de vegetais oferecem grande variedade de moléculas com diversidade nas suas estruturas e na atividade biológica, além de possuírem uma ampla gama de novos sítios de ação nos organismos-alvo. Todas essas características são importantes, dada a velocidade com que os insetos têm desenvolvido resistência aos produtos químicos utilizados como agentes de controle. Por isso, é importante que haja pesquisa constante para procura de novos grupos químicos com efeitos inseticidas (KNAAK & FIUZA, 2010).

O efeito dos compostos químicos vegetais sobre insetos tem sido estudado por meio de extratos e óleos essenciais extraídos de diversas partes das plantas, como folhas, flores e frutos.

As espécies vegetais são uma fonte promissora de potenciais agentes eficientes para o controle de vetores, pois apresentam baixa toxicidade ao homem e a outros organismos vivos; têm ações específicas sobre o inseto alvo, não provocando efeitos adversos; não poluem o meio ambiente pois são biodegradáveis, não possuindo efeito cumulativo no ambiente e; agem em concentrações baixas (ALVES, 1988; GARCEZ, 2013).

1.4. Família Piperaceae

Piperaceae – do grego *peperi*, que significa pimenta-do-reino – é uma das mais numerosas famílias de dicotiledôneas encontrada nas regiões tropicais e subtropicais, distribui-se pelas Américas, do México à Argentina e possui cinco gêneros *Peperomia*, *Zippelia*, *Manekia*, *Verhuellia* e *Piper*, ocorrendo frequentemente em locais sombreados (JUNIOR et al., 2011; MACHADO et al., 2015; CABRAL et al., 2016; SILVA et al., 2016; LEESOMBUN et al., 2017).

As piperáceas são plantas herbáceas, arbustivas ou arvoretas, com caule nodoso; folhas inteiras e simples alternadas, em formato de lança, elípticas ou arredondadas, pecioladas, com ou sem estípulas; as flores são reduzidas, morfologicamente homogêneas, com arranjo espiciforme (SANTOS et al., 2010; GOGOSZ et al., 2012).

Representantes dessa família são frequentemente encontradas em beiras de estradas ou em áreas impactadas pela ação antrópica (CABRAL et al., 2016; CHRIST et al., 2016). Além disso, essa família é bastante estudada com o intuito de encontrar substâncias com atividades biológicas, uma vez que nesta encontram-se espécies que são importantes produtoras de óleos essenciais e de substâncias bioativas, incluindo espécies com valor econômico que são utilizadas como condimentos, inseticidas, cosméticos e medicinais (ALBIERO et al., 2006; TAUKOORAH et al., 2016). Os compostos que conferem essas propriedades são importantes na defesa das plantas para repelir insetos e fungos (SANTOS et al., 2010).

1.4.1. Gênero *Piper*

O gênero *Piper*, o maior da família Piperaceae, é um composto por plantas herbáceas ou ligeiramente lenhosas de regiões quentes e úmidas do mundo, possuem folhas alternadas, opostas, verticiladas ou basais e frequentemente apresentam glândulas que possuem óleo aromático, além disso, apresenta como característica em quaisquer órgãos, aroma forte e sabor picante devido aos compostos químicos produzidos, os quais muitos já foram identificados são e são de interesse à farmacologia (WU et al., 1997; SANTOS et al., 2012; MACHADO et al., 2013; KARUPPASAMY et al., 2016).

Na China, as folhas de *Piper* são utilizadas no tratamento de arritmias cardíacas e asma; na Jamaica, é usada para dores estomacais; no México, usam-se as folhas no combate a várias infecções; enquanto no Brasil, é empregada como diurético, antiblenorrágico, excitante digestivo, males do fígado, tratamento de doenças crônicas, sedativo, antioxidante e antiofídico (NOVAES et al., 2010).

Várias espécies de *Piper* são notavelmente ricas em fenilpropanóides e terpenóides, substâncias com atividade inseticida comprovada. No estudo de Santana et al. (2015) com o óleo essencial de três espécies de *Piper*, os principais componentes encontrados em *P. arboreum* foram: germacreno D (31,83 %) e biciclogermacreno (21,40 %); em *P. marginatum*: (*E*)-metilo de isoeugenol (27,08 %), (*E*)-anetole (23,98 %) e (*Z*)- methyl isoeugenol (12,01 %) e em *P. aduncum*: (*E*)-Isocroweacin (29,52 %), apiol (28,62 %) e elemicin (7,82 %). Neste mesmo trabalho foi comprovada a atividade do óleo essencial dessas espécies contra *A. aegypti*.

Garcez et al. (2013) fizeram uma revisão sobre metabólitos secundários obtidos de várias espécies de plantas que apresentam atividade larvicida contra *A. aegypti* e verificaram que das onze substâncias presentes na família Piperaceae, dez ocorrem no gênero *Piper*, sendo oito dessas pertencentes à classe das amidas (piperina, retrofractamina, pipernonalina, piperida, guineensina, pipyahyina, pelitorina e pipnoohina) e duas lignanas (7'-epi-sesartemina e 3,4,5'-trimetóxi-3',4'-metilenodióxi-7-9:9' diepoxilignana). As amidas correspondem a um dos grupos com maior número de componentes larvicidas.

1.4.1.1. *Piper alatipetiolatum*

Piper alatipetiolatum Yuncker, 1973, conhecida popularmente como pau-da-angola ou canela-de-velho, é um arbusto, possui tricomas secretores na superfície adaxial de suas folhas, distribuídos aleatoriamente e, na região mediana, células de óleo que afloram sobre a superfície, havendo uma ruptura da cutícula, provavelmente relacionadas com a liberação das mesmas (CERQUEIRA et al., 2005).

Essa espécie de piperácea ainda é pouco estudada, somente recentemente foram feitos trabalhos com a identificação dos componentes do óleo essencial extraído de suas folhas e, testes larvicidas que comprovaram sua atividade contra *A. aegypti* (OLIVEIRA et al., 2014; 2017a) (Figura 3).

Figura 3. *Piper alatipetiolatum*. Fotos: Oliveira, A.C., 2016.



1.4.1.2. *Piper purusanum*

Outra espécie deste gênero é *Piper purusanum* Yuncker, 1966, uma arvoreta com aproximadamente 3 a 6 metros de altura, folhas alternadas com pecíolos e espigas eretas. Essa espécie teve sua atividade biológica comprovada contra cepas de *Escherichia coli* e *Shigella* sp., utilizando extrato de acetato de etila (ROCHA, 2009). Além disso, a atividade larvicida contra moscas das frutas foi verificada no trabalho de Gomes et al. (2009) (Figura 4).

Figura 4. *Piper purusanum*. Foto: Oliveira, A.C., 2016.



Piper purusanum foi estudada por Souza et al. (2009), quanto à caracterização farmacológica do extrato hexânico e os testes realizados em camundongos evidenciaram uma aceitável atividade analgésica e anti-inflamatória, com toxicidade não significativa. Esse trabalho fornece um indicativo de que essa piperácea possa ser utilizada para o controle vetorial, principalmente se outros estudos forem realizados.

2. OBJETIVO

Avaliar o potencial larvicida dos extratos metanólicos e óleos essenciais obtidos das folhas de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* contra larvas de 3º instar de *A. albopictus*, em condições de laboratório.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta e Obtenção dos Extratos e Óleos Essenciais

A coleta do material vegetal e preparo dos extratos e óleos utilizados neste trabalho foram realizados pelo doutorando e colaborador do projeto, André Correa de Oliveira.

3.1.1. Coleta das Espécies Vegetais

A coleta da espécie *P. alatipetiolatum* foi realizada no horto da Universidade Nilton Lins das 09:25 às 11:00 da manhã do dia 04/02/2016 (S “-3.05726”, W “-60.0086436”). *P. purusanum* foi coletada no dia 04/02/2016 entre os horários de 14:00 e 17:00 no ramal do Pau Rosa localizado no Km 21 da BR 174 (S “-2.7768258”, W “-60.1324838,235”). Ambas as espécies foram cortadas a uma altura de 30 cm do solo utilizando facão. Após as coletas, as espécies botânicas foram acondicionadas em sacos pretos com capacidade de 200 L, e posteriormente foram transportadas ao Laboratório Temático Químico de Produtos Naturais (LTQPN) do INPA, onde foram adequadamente tratadas para remoção de qualquer resíduo de sujeira proveniente das coletas em campo (CAYER et al., 2016) (Figura 5).

Figura 5. Locais de coleta das piperáceas. A) Local de coleta de *Piper alatipetiolatum* (Universidade Nilton Lins); B) Local de coleta de *Piper purusanum* (Ramal do Pau Rosa). Setas vermelhas indicam o local de coleta mais aproximado. Fonte: Adaptado de Oliveira, A.C., 2018.



3.1.2. Identificação Taxonômica

Amostras de cada espécie botânica que continham órgãos reprodutivos foram usadas para a confecção das exsiccatas, e em seguida, foram enviadas ao herbário do INPA para serem identificadas. Uma segunda amostra da espécie *P. alatipetiolatum* foi enviada para a

identificação no herbário Alarich Rudolf Holger Schultz – HAS no qual foi confirmada sua identificação, a amostra foi depositada com número n° 92,095. No INPA, a amostra de *P. alatipetiolatum* foi comparada com as exsiccatas de n° 42,264 e n° 34,659 e, a amostra de *P. purusanum* foi comparada com as exsiccatas n° 224,490, n° 274,482, n° 107,549, n° 188,202, n° 210,557 e n° 227,548.

3.1.3. Higienização e Desidratação do Material Vegetal

No LTQPN foi realizada a higienização das amostras vegetais utilizando água corrente, em seguida, as folhas foram removidas dos galhos e deixadas para desidratação sobre uma bancada, durante sete dias, em uma sala com temperatura ambiente (LARISSA et al., 2005; REEGAN et al., 2014).

3.1.4. Trituração do Material vegetal

Após a desidratação total das folhas, foi utilizado um moinho elétrico para a moagem das mesmas, por conseguinte, o material moído foi pesado e os materiais vegetais moídos foram armazenados em sacos pretos de 5 L, identificados de acordo com a espécie vegetal, e armazenados em freezer ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) para posterior extração dos respectivos óleos essenciais e extratos brutos (PEREIRA et al., 2014; CAYER et al., 2016).

3.1.5. Extração dos Extratos Metanólicos e Óleos Essenciais

No Laboratório de Abertura de Amostras e Ensaio Químicos (LAEQ/UFAM) foram seguidas as metodologias descritas por Reegan et al. (2014) e Ali et al. (2015) com algumas modificações.

Os extratos vegetais foram obtidos através do processo de maceração utilizando 150 g do material vegetal moído de ambas as espécies botânicas. Os materiais vegetais foram colocados separadamente dentro de frascos Mariotte com capacidade de 4 L, em seguida, foram adicionados a cada frasco 3 L do solvente metanol. Por conseguinte, os frascos foram lacrados, identificados e deixados em repouso durante sete dias em local protegido da umidade e luz do sol (MADHIYAZHAGAN et al., 2014).

Terminado o referido processo, os extratos foram filtrados utilizando papel de filtro Whatman n°1 para a separação das partes líquida e parte sólida. As porções sólidas foram armazenadas para prováveis estudos futuros. A remoção do solvente foi realizada utilizando os procedimentos adotados pelo LTQPN/INPA, com uso do equipamento automatizado, Rocket Sinergy Evaporation System. O método utilizado, assim como o tempo total para a remoção dos seis litros (3 L para cada espécie botânica) estão descritos a seguir:

Método: Metanol Flash Low BP & Mix

Controle de temperatura: 65°C

Tempo total de remoção do solvente: 01:30:00

Tempo do estágio final: 00:10:00

Velocidade do rotor: 266 rpm

Vibração: 0%

Terminado esse processo, os extratos brutos devidamente secos foram coletados e armazenados separadamente em frascos âmbar e, mantidos sob refrigeração a -5 °C até serem utilizados nos bioensaios. Os rendimentos dos extratos foram obtidos usando a fórmula abaixo, de acordo com Ali et al. (2012) e Munusamy et al. (2016).

$$\%R = \frac{P1}{P2} \times 100$$

Onde: %R = Percentual de rendimento

P1 = Peso do extrato seco

P2 = Peso do material vegetal

O sistema utilizado para a extração dos óleos essenciais foi o clevenger, com balão de capacidade de 4 L e manta aquecedora com ajuste de temperatura até 100 °C. Separadamente foram usados 50 g do material vegetal moído de cada espécie e, 1 L de água destilada para as extrações dos óleos essenciais.

Os volumes obtidos das extrações dos óleos essenciais foram lidos a cada 15 min durante o tempo de 1 h, que foram contabilizados a partir do momento da fervura da água. Quatro extrações de cada espécie botânica foram realizadas, totalizando 200 g e 4 L de água destilada.

Terminado as extrações, os volumes dos óleos essenciais foram aferidos diretamente no clevenger através de uma escala volumétrica existente no aparelho. A coleta dos óleos essenciais foi realizada com tubos falcon e resíduos de água foram removidos acrescentando 1 mg de Sulfato de Sódio Anidro (Na₂SO₄), precedidos do método de centrifugação para a remoção da água, o qual foi repetido até que os óleos essenciais não apresentassem qualquer resquício de água. Por fim, os óleos essenciais foram pesados em balança analítica, armazenados em frascos âmbar e mantidos em refrigeração constante a uma temperatura de

-5°C até serem utilizados nos estudos. Os rendimentos de cada extração dos óleos essenciais foram obtidos utilizando a fórmula a seguir (GIRARD et al., 2007).

$$R\% = \frac{\text{volume} \times \text{densidade}}{\text{massa}} \times 100$$

Onde: R% = rendimento em porcentagem do óleo essencial

volume = volume de óleo essencial ml.

densidade = massa de 1 ml de óleo em g.

massa = massa seca de folhas em g.

3.2. Coleta de *Aedes albopictus* e Manutenção em Laboratório

As coletas dos ovos de *A. albopictus* foram realizadas no Campus I do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), durante o mês de agosto de 2017, por meio de instalações de 32 ovitrampas contendo 200 ml de água de torneira e palhetas Eucatex previamente divididas em quadrantes, como substrato para oviposição. As ovitrampas foram alocadas em quatro áreas com ambiente sombreado e úmido.

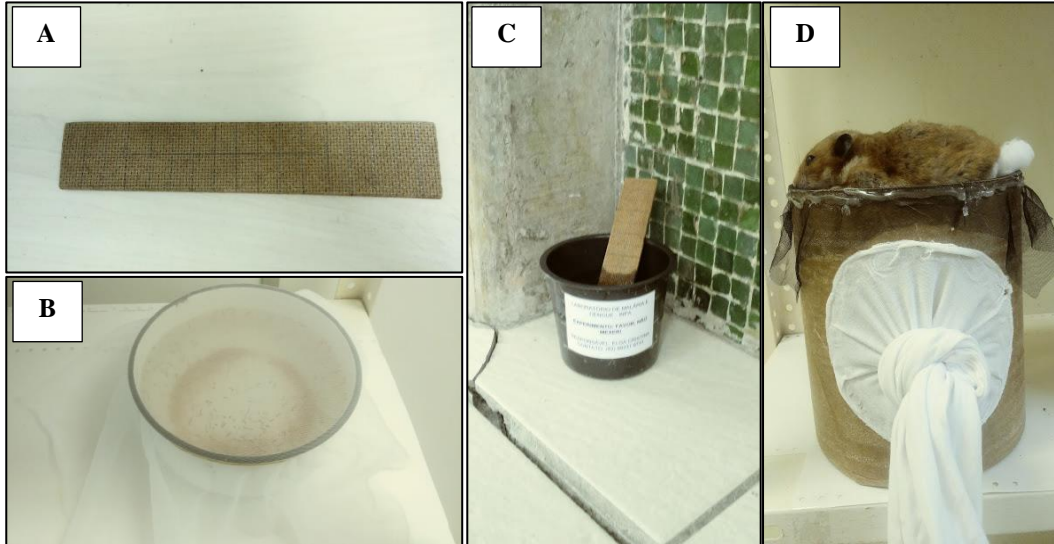
Decorridos os cinco dias as armadilhas foram retiradas e transportadas ao LMD-INPA (Laboratório de Malária e Dengue do INPA), onde as palhetas foram acondicionadas e postas a secar em temperatura ambiente, dentro de uma bandeja de poliestireno, durante um tempo mínimo de 24 h. Após a completa secagem das palhetas foi realizada a quantificação dos ovos utilizando lupa estereoscópica. Por conseguinte, as mesmas foram colocadas para eclosão em cubas brancas de poliestireno contendo 4 L de água de torneira, a fim de estabelecer a colônia de *A. albopictus*.

A manutenção da colônia foi realizada conforme as técnicas internas do laboratório, em que, as larvas em cada cuba, foram alimentadas diariamente com 200 mg de ração de gato e rato, na proporção 1:1, macerada e dissolvida em 50 ml de água de torneira. As pupas foram transferidas para copos plásticos contendo 300ml de água e acondicionadas em gaiolas teladas com malhas finas até a emergência do imago. Após isso, os adultos foram identificados pelas chaves taxonômicas de Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994).

Os espécimes de *A. albopictus* foram alimentados com solução açucarada a 10 %, impregnada em algodão. As fêmeas realizaram repasto sanguíneo em camundongos anestesiados, duas vezes por semana, para maturação dos ovos (CEUA 033/2018). Recipientes

para oviposição foram mantidos dentro das gaiolas (copos plásticos de 250 ml contendo 125 ml de água de torneira e papel filtro para substrato) (Figura 6).

Figura 6. Coleta e manutenção de *Aedes albopictus* em laboratório. A) Palheta Eucatex; B) Imaturos de *Aedes albopictus* em bacia esmaltada; C) Ovitrapas para coleta de ovos; D) Repasto sanguíneo em ramster. Fonte: Pereira-Torres, E.C., 2018.



Os ovos obtidos com a geração parental foram guardados e utilizados para novos ciclos de eclosão e manutenção da colônia, sendo as larvas de terceiro instar, utilizadas nos bioensaios. Os procedimentos de manutenção da colônia foram realizados em sala climatizada com temperatura (26 ± 2 °C) e umidade controlada (75 ± 5 %).

3.3. Bioensaios

Os ensaios biológicos seguiram o protocolo da World Health Organization (WHO, 2005), com adaptações do LMD-INPA e foram realizados em sala com temperatura (26 ± 2 °C) e umidade controlada (80 %).

As leituras foram realizadas após 24, 48 e 72 h de exposição, sendo consideradas mortas as larvas que não responderam a estímulos artificiais. Os extratos e óleos essenciais que causaram mortalidade igual ou superior a 50 % nos bioensaios seletivos seguiram para os bioensaios de dose.

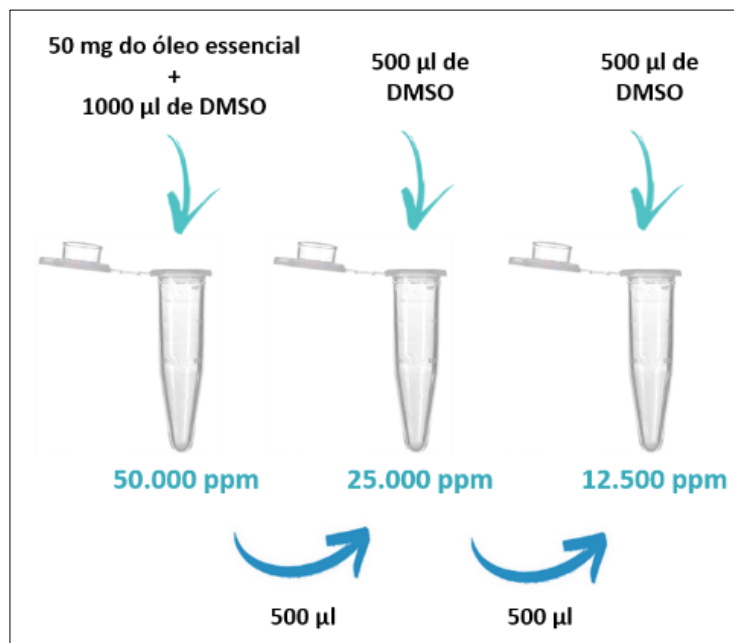
3.3.1. Bioensaios Seletivos

Para avaliação inicial da atividade biológica foram realizados bioensaios seletivos, a fim de detectar o potencial larvicida dos extratos e óleos essenciais. Para cada bioensaio seletivo foi utilizado um grupo controle e o grupo dos tratamentos. Para o grupo controle foram

utilizados dois controles negativos, um somente com água (Cont-1) e outro com água e 100 μ l de DMSO (Cont-2). Para os tratamentos foram utilizadas as concentrações de 500, 250 e 125 ppm.

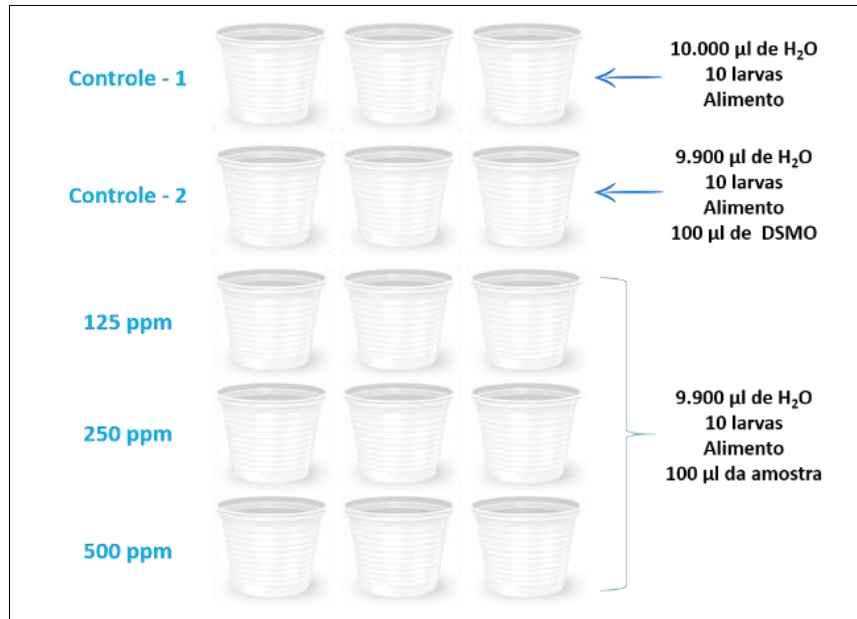
As concentrações utilizadas foram preparadas pelo método da diluição seriada, em microtubos com capacidade de 1,5 ml. Inicialmente, 50 mg do extrato ou óleo essencial foi pesado em balança analítica, posteriormente, adicionado 1000 μ l de DMSO (dimetilsulfóxido) com pureza analítica de 99 % (P.A.) (50.000 ppm), em seguida a amostra foi homogeneizada em agitador vórtex durante 15 min. Por conseguinte, foram retirados 500 μ l dessa solução e adicionados a outro microtubo contendo 500 μ l de DMSO (25.000 ppm), que foi homogeneizada e posteriormente retirados 500 μ l para obtenção da concentração de 12.500 ppm (Figura 7).

Figura 7. Método da diluição seriada. Fonte: Pereira-Torres, E.C, 2018.



Os bioensaios seletivos foram realizados em triplicata com duas repetições para cada extrato ou óleo essencial. Cada copo (50 ml) recebeu 9.900 μ l de água de poço, 10 larvas de 3^o instar, alimento larval e, para o grupo tratamento, 100 μ l das respectivas soluções 50.000, 25.000 e 12.500 ppm, obtendo as concentrações de 500, 250 e 125 ppm (Figura 8).

Figura 8. Esquema utilizado para realizar os bioensaios seletivos. Fonte: Pereira-Torres, E.C., 2018.

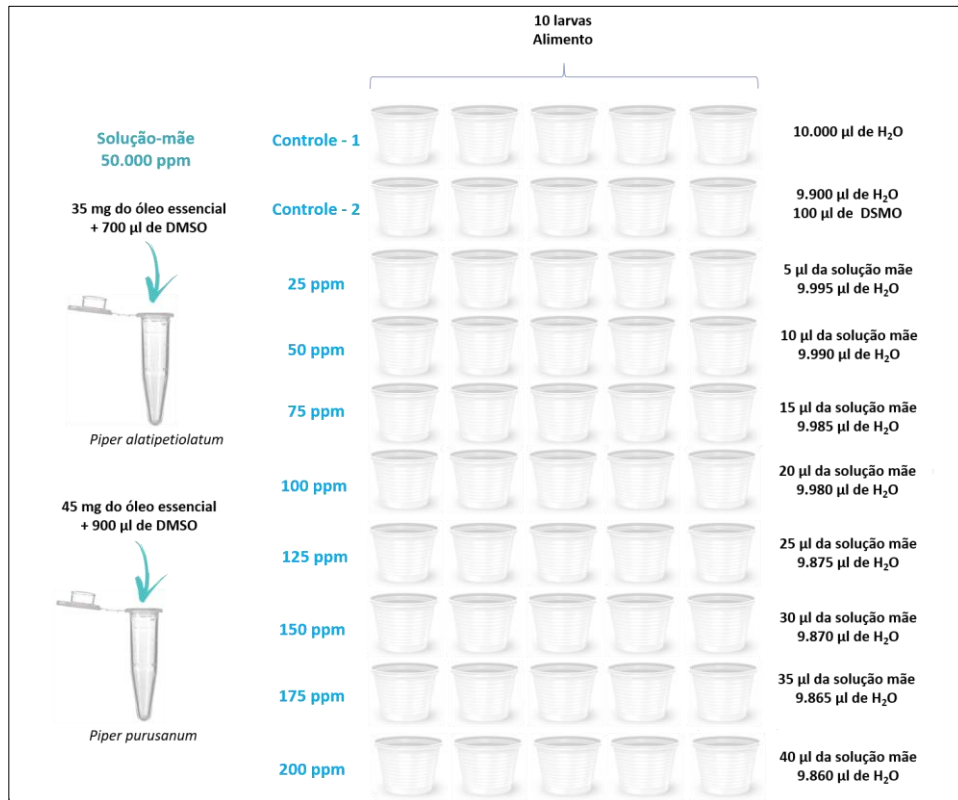


3.3.2. Bioensaios de Dose

Os bioensaios de dose foram realizados sob as mesmas condições dos bioensaios seletivos, contudo, realizando cinco repetições em quintuplicada.

Para cada óleo essencial foi preparada uma concentração – mãe (50.000 ppm), em que, para *P. alatipetiolatum* foram pesados 35 mg e dissolvidos em 700 µl de DMSO, de onde foram retirados os volumes de 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 µl e adicionados aos copos, obtendo respectivamente, as concentrações de 25, 50, 75, 100, 125, 150 e 175 ppm. Para *P. purusanum* foram pesados 45 mg e dissolvidos em 900 µl de DMSO, de onde foram retirados os volumes de 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 µl, obtendo respectivamente, as concentrações de 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 ppm (Figura 9).

Figura 9. Esquema utilizado para realizar os bioensaios de dose. Fonte: Pereira-Torres, E.C., 2018.



3.4. Análise dos Dados

Os resultados dos bioensaios seletivos foram submetidos à análise descritiva e expressos como percentual de mortalidade nas concentrações. Os resultados dos bioensaios de dose foram expressos como média \pm DP da média e submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguido do Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) pelo programa Bioestat versão 5.3. As concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀) e seus respectivos limites de confiança (inferior e superior; IC 95 %), foram calculadas por meio do modelo de Probit, pelo programa estatístico PoloPlus versão 1.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Coleta de *Aedes albopictus*

Na coleta de *A. albopictus* foram obtidos 2.864 ovos, dos quais foram contabilizadas 1.431 pupas e 1.128 adultos emergidos. Esta diferença apresentada em relação ao número de ovos coletados e o número de adultos emergidos se deve ao fato de alguns ovos já terem eclodido no momento de recolhimento das armadilhas, não sendo estas contabilizadas e também, pela mortalidade das larvas e pupas antes que atingissem o estágio adulto. Contudo, a quantidade de mosquitos obtida foi suficiente para a manutenção da colônia e realização dos testes larvicidas, uma vez que não ocorreram outras espécies de culicídeos nas armadilhas.

4.2. Bioensaios Seletivos

4.2.1. Extratos Metanólicos

Os resultados obtidos com os bioensaios seletivos utilizando os extratos metanólicos das duas espécies vegetais estão demonstrados nas Tabelas 1 e 2. Os percentuais de mortalidade indicam que os extratos metanólicos de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* possuem baixa atividade contra as larvas de *A. albopictus*.

Tabela 1. Mortalidade das larvas de 3º instar de *Aedes albopictus* submetidas a três concentrações do extrato metanólico de *Piper alatipetiolatum*, nos intervalos de 24, 48 e 72 h. n= 300.

Tratamentos	24h		48h		72h	
	N	%	N	%	N	%
Cont-1	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Cont-2	0	0,0	0	0,0	0	0,0
125 ppm	5	8,3	5	8,3	7	11,7
250 ppm	21	35,0	21	35,0	21	35,0
500 ppm	41	68,3	42	70,0	47	78,3

N= quantidade de larvas mortas nos tratamentos, somatório das duas repetições; ppm= partes por milhão.

Os extratos metanólicos não foram utilizados nos bioensaios de dose, uma vez que somente na concentração máxima (500 ppm), como recomenda a Organização Mundial de Saúde foi obtido percentual de mortalidade ≥ 50 %, como observado em *P. alatipetiolatum* (68,3 % em 24 h de exposição aos tratamentos). Para *P. purusanum* os percentuais foram ainda menos expressivos, atingindo apenas 8,3 % de mortalidade no tempo máximo de exposição aos tratamentos (72 h) (Tabela 2).

Tabela 2. Mortalidade das larvas de 3º instar de *Aedes albopictus* submetidas a três concentrações do extrato metanólico de *Piper purusatum*, nos intervalos de 24, 48 e 72 h. n= 300.

Tratamentos	24h		48h		72h	
	N	%	N	%	N	%
Cont-1	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Cont-2	0	0,0	0	0,0	0	0,0
125 ppm	0	0,0	0	0,0	0	0,0
250 ppm	1	1,7	1	1,7	1	1,7
500 ppm	3	5,0	4	6,7	5	8,3

N= quantidade de larvas mortas nos tratamentos, somatório das duas repetições; ppm= partes por milhão.

Essa atividade mais baixa dos extratos metanólicos sobre as larvas, principalmente se comparada com os resultados obtidos com os óleos essenciais (Tabelas 3 e 4) se deve ao fato de que normalmente nos extratos brutos, os constituintes ativos estão presentes em pequenas concentrações e que o tipo de metabólito secundário extraído depende do solvente utilizado (BELL, 1980; PANDEY & TRIPATHI, 2014; RODRIGUES et al., 2016). Além disso, a concentração do óleo essencial e a espécie alvo são alguns dos fatores importantes na atividade larvicida (SANTOS et al., 2010).

Oliveira et al. (2017a) verificaram a atividade larvicida do extrato metanólico de *Piper alatipetiolatum* contra *A. aegypti* nas concentrações de 500, 400, 300, 200 e 100 ppm e obtiveram os percentuais de mortalidade de 100, 84,8, 62, 42,2 e 15,2 %, respectivamente. No presente estudo, os percentuais de mortalidade causados pelo extrato metanólico dessa mesma espécie botânica sobre as larvas de *A. albopictus* são menores que os obtidos por Oliveira et al. (2017a), uma vez que somente em 72 h foi verificado mortalidade de 78,3 % na concentração mais alta (500 ppm) e 35,0 % em 250 ppm (concentração maior que a utilizada pelos referidos autores, 200 ppm).

Gomes et al. (2009) estudaram o efeito do extrato aquoso de *P. purusatum* contra as larvas da mosca-da-fruta (*Anastrepha* sp.) utilizando quatro concentrações 50, 100, 150 e 200 mg/ml e obtiveram os percentuais de mortalidade de aproximadamente 30, 35, 23, e 56 %, após três dias de experimento. No presente estudo, os percentuais de mortalidade causados pelo extrato metanólico dessa mesma espécie botânica sobre as larvas de *A. albopictus* são inferiores aos obtidos pelos referidos autores, no entanto, vale ressaltar que se trata de uma espécie diferente à avaliada no presente estudo, bem como o tipo de extrato utilizado.

Outro estudo realizado com *P. purusanum* é o de Oliveira et al. (2017b), que verificaram a atividade larvicida do extrato metanólico contra *A. aegypti* nas concentrações de 500, 400, 300, 200 e 100 ppm e obtiveram os percentuais de mortalidade iguais a 100, 92, 82,6, 60 e 24 %, respectivamente. Os resultados obtidos no presente estudo diferem do estudo de Oliveira et al. (2017b), uma vez que foi verificado o máximo de 8,3% de mortalidade das larvas na concentração de 500 ppm.

4.2.2. Óleos Essenciais

Os resultados obtidos com os bioensaios seletivos utilizando os óleos essenciais das duas espécies vegetais estão demonstrados nas Tabelas 3 e 4. Os percentuais de mortalidade indicam que os óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* possuem uma expressiva atividade sobre as larvas, uma vez que causaram mortalidade ≥ 50 % nas menores concentrações utilizadas e nas primeiras 24 h de exposição aos tratamentos. O óleo essencial de ambas as espécies foi utilizado nos bioensaios de dose-resposta, sobre os quais foi feito a análise inferencial e cálculo das Concentrações Letais (CL).

Utilizando o óleo essencial de *P. alatipetiolatum* verificou-se que nas primeiras 24 h do experimento o percentual de mortalidade foi de 96,7 %, na menor concentração utilizada (125 ppm) e 48 h foi o tempo suficiente para causar 100 % de mortalidade das larvas (Tabela 3).

Tabela 3. Mortalidade das larvas de 3º instar de *Aedes albopictus* submetidas a três concentrações do óleo essencial de *Piper alatipetiolatum*, nos intervalos de 24, 48 e 72 h. n= 300.

Tratamentos	24h		48h	
	N	%	N	%
Cont-1	0	0,0	0	0,0
Cont-2	0	0,0	0	0,0
125 ppm	58	96,7	60	100
250 ppm	60	100	60	100
500 ppm	60	100	60	100

N= quantidade de larvas mortas nos tratamentos, somatório das duas repetições; ppm= partes por milhão.

O óleo essencial de *P. purusanum* causou 46,7 % de mortalidade das larvas em 125 ppm, atingindo mais de 50 % após 72 h de exposição, enquanto que a concentração de 500 ppm foi capaz de causar 100 % de mortalidade já nas primeiras 24 h de experimento (Tabela 4).

Tabela 4. Mortalidade das larvas de 3º instar de *Aedes albopictus* submetidas a três concentrações do óleo essencial de *Piper purusanum*, nos intervalos de 24, 48 e 72 h. n= 300.

Tratamentos	24h		48h		72h	
	N	%	N	%	N	%
Cont-1	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Cont-2	0	0,0	0	0,0	0	0,0
125 ppm	28	46,7	28	46,7	34	56,7
250 ppm	54	90,0	54	90,0	56	93,3
500 ppm	60	100	60	100	60	100

N= quantidade de larvas mortas nos tratamentos, somatório das duas repetições; ppm= partes por milhão.

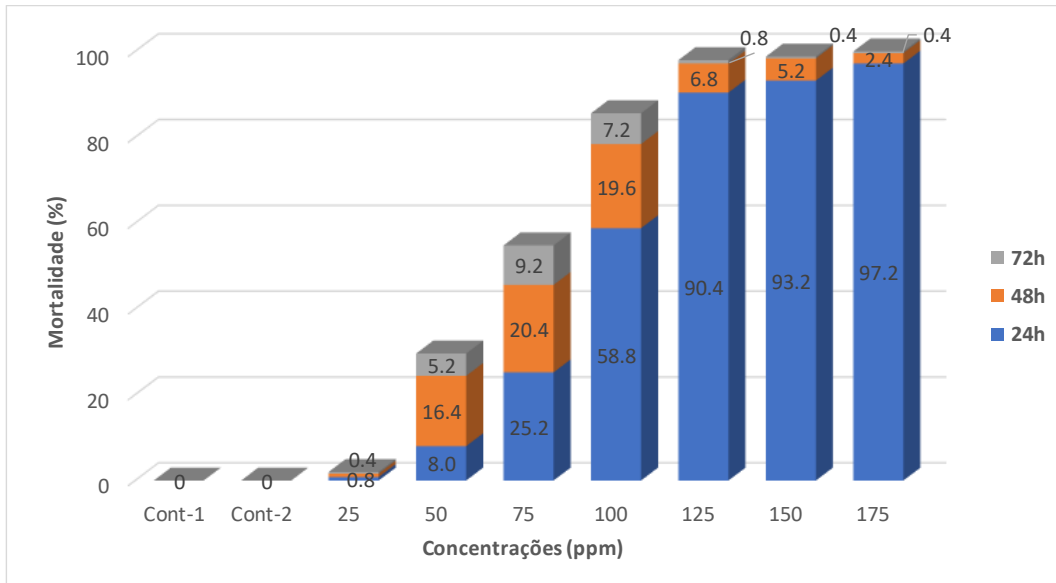
4.3. Bioensaios de Dose

Os bioensaios de dose realizados com o óleo essencial das duas espécies vegetais demonstraram a maior atividade desses, nas primeiras 24 h de exposição aos tratamentos, com baixos acréscimos nos percentuais de mortalidade após esse intervalo (Figuras 10 e 11).

O óleo de *P. alatipetiolatum* apresentou percentuais de mortalidade semelhantes nas concentrações de 125 a 175 ppm, no intervalo de 24 h, atingindo o máximo de 97,2 % na concentração mais alta. As menores concentrações avaliadas (25 e 50 ppm apresentaram baixo percentual de mortalidade, mesmo após 72 h de exposição, sendo observado 1,2 e 29,6 % de mortalidade, respectivamente (Figura 10).

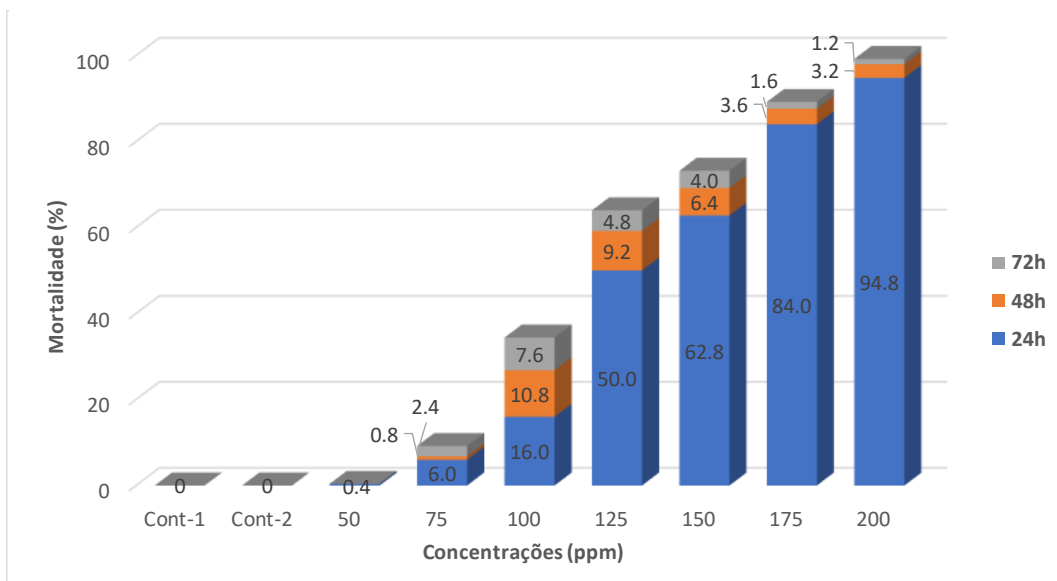
Ao final dos experimentos verificou-se que óleo essencial dessa espécie vegetal foi capaz de matar 1.172 das 1.750 larvas avaliadas nas concentrações de 25 a 175 ppm, ou seja, 67,0 %.

Figura 10. Percentuais de mortalidade das larvas de 3º instar de *Aedes albopictus* submetidas a sete concentrações do óleo essencial de *Piper alatipetiolatum*, nos intervalos de 24, 48 e 72 h. n= 2.250.



O óleo de *P. purusanum* apresentou atividade larvicida a partir da concentração de 50 ppm. No entanto, a mortalidade das larvas foi representativa somente a partir da concentração de 100 ppm, que causou ao final do experimento, 34,4 % de mortalidade (Figura 11). Os percentuais de mortalidade foram bastante distintos entre as concentrações utilizadas, nas primeiras 24 h do experimento, sendo verificado aumento gradual no percentual de mortalidade a medida que a concentração foi aumentada. Fato diferente do que foi verificado para *P. alatipetiolatum* nas concentrações mais altas (125, 150 e 175 ppm) (Figuras 10 e 11).

Figura 11. Percentuais de mortalidade das larvas de 3º instar de *Aedes albopictus* submetidas a sete concentrações do óleo essencial de *Piper purusanum*, nos intervalos de 24, 48 e 72 h. n= 2.250.



Após 48 h, o maior acréscimo de mortalidade foi verificado em 100 ppm, causando mortalidade de 10,8 % das larvas nesse intervalo. Decorridas as 72 h de exposição, as concentrações de 125 e 150 ppm, e 175 e 200 ppm apresentaram percentuais de mortalidade semelhantes (Figura 11).

Ao final dos experimentos verificou-se que óleo essencial dessa espécie vegetal foi capaz de matar 924 das 1.750 larvas avaliadas nas concentrações de 50 a 200 ppm, ou seja, 52,8 %.

De acordo com Roel (2001), os efeitos e o tempo de ação das soluções são dependentes da dosagem utilizada, de maneira que a morte ocorre nas dosagens maiores e os efeitos menos intensos e mais duradouros nas dosagens menores.

Oliveira (2018, dados não publicados) ao estudar a atividade de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* contra as larvas de *A. aegypti*, também observou que ambos os óleos essenciais apresentaram atividade larvicida em todas as concentrações avaliadas e, que os maiores percentuais de mortalidade ocorrem em 24 h após o início dos bioensaios larvicidas. No referido estudo o autor constatou para *P. alatipetiolatum* em 24 h, 45 % e 62,3 % de mortalidade, respectivamente, nas concentrações de 50 e 100 ppm, enquanto que obtivemos 8 e 58,8 %, respectivamente, para *A. albopictus* (Figura 10). Para *P. purusanum* o referido autor verificou em 50, 100 e 150 ppm, respectivamente, 29, 56, e 79,3 %, enquanto que obtivemos os percentuais de 0,4, 16,0 e 62,8 % (Figura 11).

O óleo essencial de *P. alatipetiolatum* apresentou atividade larvicida desde as menores concentrações utilizadas e nas primeiras 24 h do experimento, no entanto, foi constatado pelo teste de Tukey, que as concentrações de 25 e 50 ppm não diferem estatisticamente do grupo controle ($p > 0,05$), apenas 50 ppm passou a ter atividade significativa sobre as larvas após 48 h de atividade do óleo essencial. Os resultados obtidos demonstram ainda, que as concentrações de 75 e 100 ppm causaram percentuais de mortalidade significativamente diferentes entre si, entre o grupo controle, e entre as concentrações mais altas (125 a 175 ppm), em todos os intervalos de observação (Tabela 5).

Tabela 5. Atividade larvicida do óleo essencial de *Piper alatiptiolatum* contra *Aedes albopictus* nos intervalos de 24, 48 e 72 h. n= 2.250.

Concentrações (ppm)	Tempo de Exposição		
	24h	48h	72h
25	0,4 ± 0,9 ^a	0,8 ± 1,8 ^a	1,0 ± 1,7 ^a
50	4,0 ± 1,9 ^a	12,2 ± 7,5 ^b	14,8 ± 6,7 ^b
75	12,6 ± 2,6 ^b	22,8 ± 5,4 ^c	27,4 ± 6,3 ^c
100	29,4 ± 6,9 ^c	39,2 ± 5,2 ^d	42,8 ± 3,6 ^d
125	45,2 ± 2,4 ^d	48,6 ± 1,1 ^e	49,0 ± 0,7 ^{de}
150	46,6 ± 1,3 ^d	49,2 ± 0,8 ^e	49,4 ± 0,5 ^{de}
175	48,6 ± 0,5 ^d	49,8 ± 0,4 ^e	50,0 ± 0 ^e
Controle-1	0,0 ± 0 ^a	0,0 ± 0 ^a	0,0 ± 0 ^a
Controle-2	0,0 ± 0 ^a	0,0 ± 0 ^a	0,0 ± 0 ^a

Os valores representam a média ± DP (desvio padrão) das cinco repetições. Letras diferentes na coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey, com $p < 0,0001$.

Em todos tempos de exposição é possível observar que as concentrações de 125 a 175 ppm não causaram mortalidades significativamente diferentes entre si sobre as larvas e, que no último intervalo de observação (72 h) a mortalidade em 100 ppm passou a ser igual a 125 e 150 ppm. Portanto a partir de 48 h não foi observado aumento significativo na mortalidade das larvas, apesar do tempo de exposição ser o dobro, ou seja, o aumento do tempo de exposição não foi diretamente proporcional ao percentual de mortalidade, independente da concentração utilizada (Tabela 5).

Nos bioensaios com o óleo essencial de *P. purusanum* também foi verificado que as menores concentrações, 50 e 75 ppm, durante todos os tempos de exposição, causaram mortalidade que não difere estatisticamente do grupo controle ($p > 0,05$). As demais concentrações utilizadas, 100 a 200 ppm, causaram mortalidade significativamente diferentes entre si, no intervalo de 24 h. Após 48 h foi observado que as mortalidades entre 125 e 150 ppm e entre 175 e 200 ppm não apresentaram diferença estatística significativa. Neste estudo foi verificado que o aumento do tempo de exposição, 24, 48 e 72 h, não causou aumento significativo no percentual de mortalidade das larvas de *A. albopictus* (Tabela 6).

Tabela 6. Atividade larvicida do óleo essencial de *Piper purusanum* contra *Aedes albopictus* nos intervalos de 24, 48 e 72 h. n= 2.250.

Concentrações (ppm)	Tempo de Exposição		
	24h	48h	72h
50	0,2 ± 0,4 ^a	0,2 ± 0,4 ^a	0,2 ± 0,4 ^a
75	3,0 ± 1,6 ^a	3,4 ± 1,7 ^a	4,6 ± 2,3 ^a
100	8,0 ± 1,6 ^b	13,4 ± 3,1 ^b	17,2 ± 5,8 ^b
125	25,0 ± 2,2 ^c	29,6 ± 2,7 ^c	32,0 ± 1,6 ^c
150	31,4 ± 4,0 ^d	34,6 ± 4,4 ^c	36,6 ± 4,7 ^c
175	42,0 ± 3,8 ^e	43,8 ± 4,2 ^d	44,6 ± 4,3 ^d
200	47,4 ± 2,2 ^f	49,0 ± 0,7 ^d	49,6 ± 0,5 ^d
Controle-1	0,0 ± 0 ^a	0,0 ± 0 ^a	0,0 ± 0 ^a
Controle-2	0,0 ± 0 ^a	0,0 ± 0 ^a	0,0 ± 0 ^a

Os valores representam a média ± DP (desvio padrão) das cinco repetições. Letras diferentes na coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey, com $p < 0,0001$.

As Concentrações Letais (CL₅₀ e CL₉₀) e seus respectivos limites de confiança (inferior e superior) são mostradas na Tabela 7, que compara os valores em ppm, calculados para as duas espécies vegetais, nos três tempos de exposição.

Tabela 7. Concentrações Letais dos óleos essenciais de *Piper alatipetiolatum* e *Piper purusanum* contra *Aedes albopictus* no intervalo de 24, 48 e 72 h.

Tempo de exposição	<i>Piper alatipetiolatum</i>		<i>Piper purusanum</i>	
	CL ₅₀ (ppm)	CL ₉₀ (ppm)	CL ₅₀ (ppm)	CL ₉₀ (ppm)
24h	88,0 (72,5 – 102,6)	140,2 (118,0 – 194,3)	129,0 (121,8 – 136,2)	192,4 (178,0 – 194,3)
48h	69,8 (60,6 – 78,3)	116,5 (102,1 – 141,5)	120,3 (113,8 – 126,8)	179,4 (167,0 – 197,2)
72h	64,4 (57,3 – 71,0)	107,7 (96,3 – 125,3)	115,7 (110,2 – 121,3)	178,8 (166,3 – 196,5)

CL₅₀= Concentração Letal para 50 % de mortalidade larval e CL₉₀= Concentração Letal para 90 % de mortalidade larval, com os limites de confiança inferior e superior, com intervalo de confiança de 95 %.

Os intervalos de confiança de 95 % de probabilidade (IC) podem ser usados para comparar duas concentrações letais, quando há sobreposição ou não entre os índices de confiança, podendo assim dizer se as concentrações são iguais ou diferentes (SILVA et al., 2007; ACIOLE, 2009). Comparando as CL₅₀ de ambas as espécies de piperáceas, pode-se

observar que não houve sobreposição entre os índices de confiança, ou seja, os óleos essenciais são estatisticamente diferentes. No entanto, para a CL₉₀ foi verificada sobreposição para o período de 24 h de exposição. Para os demais tempos de exposição não foi observado sobreposição entre os valores da CL₅₀ e da CL₉₀ das duas espécies avaliadas.

Os valores mostrados na tabela 7 comprovam que o óleo essencial de *P. alatipetiolatum* possui melhor atividade contra as larvas do mosquito vetor, uma vez que foram obtidos os menores valores de CL₅₀ e CL₉₀ nos intervalos de 24, 48 e 72 h.

As CL₅₀ e CL₉₀ de *P. alatipetiolatum* são, respectivamente, 88,0 e 140,2 ppm, enquanto que para *P. purusanum* foram obtidas as concentrações de 129,0 e 192,4 ppm, o que significa dizer que a concentração do óleo essencial de *P. alatipetiolatum* necessária para matar pelo menos 50 % das larvas em 24 h é 88,0 ppm e 140,0 ppm para matar 90 % delas (Tabela 7). A concentração do óleo essencial de *P. purusanum* requerida para atingir esses percentuais de mortalidade são mais altas, o que significa dizer que, caso o óleo essencial dessa espécie seja utilizado no controle do mosquito vetor em questão, haverá a necessidade de utilizar maior quantidade deste óleo essencial para se obter o mesmo percentual de mortalidade obtido com o óleo de *P. alatipetiolatum*.

Santana et al. (2015) comprovaram a atividade larvicida de três espécies de piperáceas, *P. aduncum*, *P. arboreum* e *P. marginatum* sobre *A. aegypti*, constatando após 48 h os valores de CL₅₀ iguais a 46, 55 e 34 ppm, respectivamente e, CL₉₀ iguais a 156, 204 e 85 ppm, respectivamente. Austran et al. (2009) também estudaram a atividade larvicida do óleo essencial extraído das folhas de *P. marginatum* e encontram um valor de CL₅₀ = 23,8 ppm. Em nosso estudo os valores de CL₅₀ e CL₉₀ foram maiores.

Oliveira (2018, dados não publicados) comprovou a atividade larvicida de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* contra *A. aegypti*, constatando após 48 h os valores de CL₅₀ iguais a 39,15 e 60,8 ppm, respectivamente e CL₉₀ iguais a 150,12 e 171,25 ppm, respectivamente. Os resultados de CL₉₀ obtidos para *P. alatipetiolatum* corroboram com os do referido autor para essa mesma espécie vegetal, uma vez que no presente estudo obteve-se 116,5 ppm (102,1 – 141,5), comparado com 150,1 ppm (100,3 – 377,0) obtido por Oliveira (2018, dados não publicados), ou seja, a CL₉₀ calculada no presente estudo, está inserida no limite de confiança. Em relação a *P. purusanum*, o resultado obtido para CL₉₀ (179,4 ppm) também corrobora com Oliveira (2018, dados não publicados), pois, esse valor está entre os limites de confiança que foram calculados para essa espécie (171,25 ppm (130,0 – 560,6)).

Os valores de CL₅₀ calculados nesse estudo foram menores que os obtidos por Santana (2012), que verificou a atividade de *P. alatabaccum* sobre *A. aegypti* em condições de campo

simulado. No referido estudo, para o extrato etanólico o valor da CL₅₀ foi igual 751 ppm e de 160 ppm para o óleo essencial, ambos extraídos das folhas da planta.

4.4. Alterações Comportamentais e Mudanças Morfológicas nas Larvas Causadas pelos Óleos Essenciais

As larvas do gênero *Aedes* são conhecidas por desenvolverem-se normalmente em ambientes aquáticos contendo água limpa ou contendo baixo grau de poluição e/ou matéria orgânica. Observações a olho nu a respeito do comportamento dessas larvas expostas a diversas substâncias podem fornecer um esclarecimento inicial a respeito do modo de ação dessas substâncias no organismo larval (WHO, 2005).

Segundo Sadek (2003), Hiremath et al. (1997), Breuer & Schmidt (1995), Wheeler & Isman (2001), Zhao et al. (1998) e Muthukrishnan & Pushpalatha (2001), o modo de ação dos fitoquímicos por meio dos produtos vegetais apresentam-se de diversas maneiras, incluindo a toxicidade, o retardamento no desenvolvimento, a inibição da alimentação, a deterrência à oviposição e a redução na fecundidade e fertilidade. Além disso, segundo Knaak & Fiuza (2010), a atividade inseticida de óleos essenciais pode causar mortalidade, deformações em diferentes estágios de desenvolvimento, repelência e deterrência.

Durante a aplicação dos óleos essenciais de ambas as espécies foram observados nos primeiros minutos, que as larvas passaram a apresentar movimentos natatórios acelerados, outras demonstravam movimentos lentos, algumas repousavam no fundo dos copos plásticos, mantinham o corpo horizontalmente ou raspavam o sifão respiratório. Esses comportamentos são descritos como anormais uma vez que as larvas do gênero *Aedes* permanecem na posição perpendicular na superfície da água para efetuarem a troca gasosa e realizam movimentos ondulados na locomoção (ALI et al., 2015). Além disso, Knaak & Fiuza (2010) afirmaram que o aparecimento de sinais tóxicos é rápido e, segundo estudos feitos por Enan (2001), ao descrever a ação tóxica dos óleos essenciais em baratas (*Periplaneta americana*), o início dessa atividade inclui hiperatividade, seguida por hiperextensão das pernas e do abdome, imobilização e morte.

Em todas as concentrações, mas principalmente nas de 125 a 200 ppm pôde-se observar um escurecimento da cabeça, tórax e abdome, bem como uma dilação entre a cabeça e o tórax. Além disso, algumas larvas mortas apresentaram corpo curvado e coloração pálida. Todos esses fenômenos não foram observados nos controles (Figura 12).

Figura 12. Alterações morfológicas nas larvas de *Aedes albopictus* causadas pelos óleos essenciais de *Piper alatipetiolatum* e *Piper purusanum*. A) Escurecimento da (1) cabeça, (2) tórax, (3) abdome e (4) sifão respiratório, dilatação entre cabeça e o tórax (5); B) Larvas com coloração de aspecto pálido. Foto: Ferreira, F.A, 2018.



Oliveira (2018, dados não publicados) ao estudar o efeito dos óleos essenciais dessas duas espécies de piperáceas sobre as larvas de 3º instar de *A. aegypti* constatou as mesmas alterações e comportamentos descritos acima. Além disso, Ramanibai et al. (2016) constataram as referidas alterações nas larvas de 1º ao 4º instar de *A. aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus*, quando tratadas com o extrato aquoso obtido das sementes de *Annona squamosa*. O escurecimento das regiões do corpo das larvas também é descrito por Oliveira et al. (2013) ao expor as larvas de *A. aegypti* ao óleo essencial extraído das folhas de *P. aduncum*.

Silva et al. (2008), Oliveira et al. (2011) e Bianco et al. (2013) indicam que os tremores corporais e movimentos letárgicos exercidos pelas larvas são consequência direta da ação dos óleos essenciais no sistema nervoso central. Os autores relataram que os óleos podem agir similarmente aos inseticidas sintéticos organofosforados e carbamatos, que agem no sistema nervoso central, inibindo a ação da enzima acetilcolinesterase.

No estudo de Mendes et al. (2017), os autores relataram que os óleos essenciais constituídos de sesquiterpenos podem atuar no sistema endócrino afetando a secreção da ecdisona. A ausência da ecdisona impede que ocorra a ecdise, ao passo que ocorre a sobreposição da cutícula, afetando o desenvolvimento larval. Devido a este fato é possível observar o escurecimento do corpo das larvas. Oliveira (2018, dados não publicados) estudou a constituição química dos óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* e identificou que muitos dos constituintes pertencem à classe dos sesquiterpenos.

A partir dessas informações podemos inferir que os óleos essenciais extraídos das folhas das espécies *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum*, agiram no sistema nervoso central das larvas,

bem como atuaram no sistema hormonal. No entanto, novos estudos, visando conhecer o mecanismo de ação dos óleos essenciais dessas espécies devem ser realizados.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos por meio dos bioensaios demonstraram que os extratos metanólicos e óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* possuem atividade larvicida sobre *A. albopictus*, ainda que baixas, como verificado em relação aos extratos. Os percentuais de mortalidade nos bioensaios seletivos indicam que o extrato metanólico de *P. alatipetiolatum* é capaz de afetar uma maior quantidade de larvas do que *P. purusanum*. Os menores valores de CL₅₀ e CL₉₀ comprovam que o óleo essencial de *P. alatipetiolatum* é mais eficiente sobre o mosquito vetor do que o óleo de *P. purusanum*. Verificou-se que a partir de 48h não houve aumento significativo na mortalidade das larvas expostas ao óleo essencial de ambas as espécies. As duas espécies vegetais avaliadas possuem potencial para serem utilizadas como uma nova ferramenta de controle de *A. albopictus*, principalmente se novos estudos forem realizados para conhecer os compostos que conferem essa atividade larvicida.

6. REFERÊNCIAS

- ACIOLE, S.D.G. Evaluation of the insecticidal activity of the essential oils of the Amazonian plants Annonaceae, Boraginaceae and Atlantic Forest Myrtaceae as an alternative in the control of larvae of *Aedes aegypti*. **Dissertation**. University of Lisboa. 86p, 2009.
- ALBIERO, A.L.M.; PAOLI, A.A.S.; SOUZA, L.A.; MOURÃO, K.S.M. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper hispidum* Sw (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 16: 379-391, 2006.
- ALI, M.S.; RAVIKUMAR, S.; BEULA, J.M. Bioactivity of seagrass against the dengue fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 70: 570-573, 2012.
- ALI, I.B.H.; CHAOUACHI, M.; BAHRI, R.; CHAIEB, I.; BOUSSAID, M.; HARZALLAH-SKIRI, F. Chemical composition and antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. **Industrial Crops and Products**, 77: 631-639, 2015.
- ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: Fealq, p. 1163, 1998.
- AUSTRAN, E.S.; NEVES, I.A.; SILVA, C.S.B.; SANTOS, G.K.N.; CÂMARA, C.A.G.; NAVARRO, D.M.A.F. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v.100, n.7, p.2284-2288, 2009.
- BARANITHARAN, M.; DHANASEKARAN, S.; KOVENDAN, K.; MURUGAN, K.; GOKULAKRISHAN, J.; BENELLI, G. *Coleus aromaticus* leaf extracts fractions: A source of novel ovicides, larvicides and repellents against *Anopheles*, *Aedes* and *Culex* mosquito vectors? **Process Safety Environmental Protection**, 106: 23-33, 2017.
- BELL, E.A.; CHARLWOOD, B.V. **Encyclopedia of Plant Physiology**. Springer Verlag: Berlin 1980.
- BIANCO, E.M.; PIRES, L.; SANTOS, G.K.M.; DUTRA, K.A.; REIS, T.N.V.; VASCONCELOS, E.R.T.P.P.; COCENTINO, A.L.M.; NAVARRO, D. M. A.F. Larvicidal activity of seaweeds from northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. **Industrial Group and Products**. 43: 270-275, 2013.
- BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: Inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde**, 16(4):279-29, 2007.
- BREUER, M.; SCHMIDT, G.H. Influence of a short period treatment with *Melia azedarach* extract on food intake and growth of the larva of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lep., Noctuidae). **Journal of Plant Diseases Protection**, 102:633-654, 1995.
- CABRAL, T.C.; DELLAGNESE, D.G.; BORDIGNON, S.A.L.; FORNECK, E.D.; CADEMARTORI, C.V. The use of *Piper amalago* L. volatile oil to attract fruit eating bats. **Forestry Science**. 26: 949-955, 2016.
- CAYER, M.M.C.; MUHAMMED, A.; WALSHE-ROUSSEL, B.; AHMED, F.; SANCHES-VINDAS, P.E.; ROJAS, M.O.; MERALI, Z.; CAL, V.; DURST, T.; TRUDEAU, V.L.; ARNASON, J.T. Anxiolytic activity and active principles of *Piper amalago* (Piperaceae), a medicinal plant used by the Q'eqchi Maya to treat susto, a culture-bound illness. **Journal of Ethnopharmacology**. 185: 147-154, 2016.
- CAO-LORMEAU, V.M.; ROCHE, C.; TEISSIER, A. et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerg Infect Dis**, 20: 1085-6, 2014.
- CECILIO, A.B. Desenvolvimento de testes rápidos para detecção do *dengue vírus* e avaliação do risco transfusional. **Gerais: Revista de Saúde Pública do SUS/MG**, v.1, n. 1, 2013.
- CERQUEIRA, J.C.M.; POTIGUARA, R.C.V.; KIKUCHI, T.Y.P.; SANTOS, P.P. Anatomia foliar de *Piper alatipetiolatum* Yuncker, (Piperaceae), uma espécie aromática da Amazônia. **Resumos do 56º Congresso Nacional de Botânica**, 2005.
- CHADEE, D.D.; GILLES, J.R.L. The diel copulation periodicity of the mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) at indoor and outdoor sites of Trinidad, West Indies. **Acta Tropica**, 132: S91-S95, 2014.
- CHRIST, J.A.; SARNAGLIA-JUNIOR, V.B.; BARRETO, L.M.; GUIMARÃES, E.F.; GARBIN, M.L.; CARRIJO, T.T. The genus *Piper* (Piperaceae) in the Mata das Flores State Park, Espírito Santo, Brasil. **Rodriguésia**. 67: 1031-10466, 2016.

CONSOLI, R.A.G.B.; OLIVEIRA, R.L. **Principais mosquitos de importância sanitária do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 228, 1994.

DICK, G.W.; KITCHEN, S.F.; HADDOW, A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 46(5):509-20, 1952.

ECDPC - European Centre for Disease Prevention and Control. Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome. 2015. Disponível em: <<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/zika-virus-americas-association-with-microcephaly-rapid-risk-assessment.pdf>> Acesso em: 06/10/2018.

ENAN, E. Insecticidal activity of essential oils: Octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 130:325-337, 2001.

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz. Mosquitos *Aedes aegypti* e *albopictus* são diferentes na competência para transmitir zika. 2016. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/pt-br/content/aedes-aegypti-e-aedes-albopictus-das-americanasmostram-diferencas-na-susceptibilidade-ao>> Acesso em: 06/10/2018.

FORATTINI, O. P. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 20 (3): 244-5, 1986.

FORATTINI, O.P. **Culicidologia Médica**. vol. 2. São Paulo: EDUSP, 2002.

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

GIRARD, E.A.; KOEHLER, H. S.; NETTO, S. P. Volume, biomassa e rendimento de óleos. **Rev. Acad.**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 147-165, 2007.

GLASSER, C.M.; GOMES, A.M. Clima e sobreposição da distribuição de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* na infestação do Estado de São Paulo. **Rev. Saúde Pública**, 36(2):166-72, 2002.

GOGOSZ, A.M.; BOEGER, M.R.T.; NEGRELLE, R.R.B.; BERGO, C. Comparative leaf anatomy of nine species of the genus *Piper* (Piperaceae). **Rodriguésia**. 63: 405-417, 2012.

GOLDING, N.; WILSON, A.L.; MOYES, C.L.; CANO, J.; PIGOTT, D.M.; VELAYUDHAN, R.; BROOKER, S.J.; SMITH, D. L.; HAY, S.I.; LINDSAY, S.W. Integrating vector control across diseases. **BMC Medicine**, 13:249, 2015.

GOMES, F.C.; RODRIGUES, J.M.G.; VIEIRA, M.F.; PINHEIRO, C.C.S. Efeito tóxico do extrato vegetal de *Piper marginatum* e *P. purusianum*, em larvas de moscas das frutas. **XVIII Jornada de Iniciação Científica PIBIC CNPq/FAPEAM/INPA**, 2009.

GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M.; HOTI, S.L.; BENELLI, G. Larvicidal potencial of carvacrol and terpinen-4-ol from the essential oil of *Origanum vulgare* (Lamiaceae) against *Anopheles stephensi*, *Anopheles subpictus*, *Culex quinquefasciatus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). **Research in Veterinary Science**. 104: 77-82, 2016.

HAPAIRAI, L.K.; MARIE, J.; SINKINS, S.P.; BOSSIN, H.C. Effect of temperature and larval density on *Aedes polynesiensis* (Diptera: Culicidae) laboratory rearing productivity and male characteristics. **Acta Tropica**, 132S: S108-S115, 2014.

HARAPAN, H.; ANWAR, S.; SETIAWAN, A.M.; SASMONO, R.T. Dengue vaccine acceptance and associated factors in Indonesia: A community-based cross-sectional survey in Aceh. **Vaccine**. 34: 3670-3675, 2016.

HIREMATH, I.G.; AHN, Y.J.; KIM, S.I. Insecticidal activity of Indian plant extracts against *Nilaparvata lugens* (Homoptera; Delphacidae). **Applied of Entomology Zoology**, 32:152-166, 1997.

HONÓRIO, N.A.; CASTRO, M.G.; BARROS, F.S.M.; MAGALHÃES, M.A.F.M.; SABROZA, P.C. The spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a transition zone, Rio de Janeiro, Brazil. **Cad Saúde Pública**, 25:1203-14, 2009.

HONÓRIO, N.A.; CÂMARA, D.C.P.; CALVET, G.A.; BRASIL, P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 31(5):906-908, 2015.

- IOC - Instituto Oswaldo Cruz. Vetor da dengue na Ásia, *A. albopictus* é alvo de estudos. 2008. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inford=576&sid=32>> Acesso em: 06/10/2018.
- IOOS, S.; MALLET, H.P.; LEPARC, G. I.; GAUTHIER, V.; CARDOSO, T.; HERIDA, M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Med Mal Infect**, 44(7):302-7, 2014.
- JUNIOR, V.B.S.; SANTOS, G.S.; SILVA, L.A.; VALADARES, R.T.; CANTARINO, S. 2011. Piperaceae: conservação e conhecimento no Espírito Santo, Brasil. **X Congresso de Ecologia do Brasil**, 2p., 2011.
- KARUPPASAMY, V.; THOMAS, P.A.; GERALDINE, P. An experimental evaluation of the anti-atherogenic potential of the plant, *Piper betle*, and its active constituent, eugenol, in rats fed an atherogenic diet. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 80, p. 276-288, 2016.
- KNAACK, N.; FIUZA, L.M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, 5(2):120-132, 2010.
- LAMBRECHTS, L.; SCOTT, T.W.; GUBLER, D.J. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus Transmission. **PLoS Negl Trop Dis** 4(5): e646, 2010.
- LARISSA, C.B. C.; CORRÊA, R.M.; CARDOSO, J.C.W.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; FERRI, P.H. Drying and fragmentation of the dry matter in the yield and composition of the essential oil of lemongra. **Brazilian Horticulture**. 23: 956-959, 2005.
- LEESOMBUN, A.; BOONMSAWAI, S.; NISHIKAWA, Y. Effects of Thai Piperaceae plants extracts on *Neospora caninum* infection. **Parasitology International**. 66: 219-226, 2017.
- LEVI, T.; BEN-DOV, E.; SHAHI, P.; BOROVSKY, D.; ZARITSKY, A. Growth and development of *Aedes aegypti* larvae at limiting food concentrations. **Acta Tropica**, 133: 42-44, 2014.
- MACHADO, N.S.O.; PEREIRA, F.G.; SANTOS, P.R.D.; COSTA, C.G.; GUIMARÃES, E.F. Comparative anatomy of the leaves of *Piper lepturum* (Kunth) C. DC. var. *lepturum* and *Piper lepturum* var. *angustifolium* (C.DC) Yunck. *Hoehnea*. 42: 1-8, 2015.
- MACHADO, M.P.; BERGO, C.L.; DESCHAMPS, C.; BIZZO, H.R.; BIASI, L.A. Efeito da secagem natural e artificial da biomassa foliar de *Piper hispidinervum* na composição química do óleo essencial. **Semina: Ciências Agrárias**, 34: 265-270, 2013.
- MADHIYAZHAGAN, P.; MURUGAN, K.; KUMAR, A.N.; NATARAJ, T. Extraction of mosquitocidal from *Ocimum canum* leaves for the control of dengue and malarial vectors. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. 4: S549-S55, 2014.
- MARANGONI, C.; MOURA, N.F.; GARCIA, F.R.M. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. **Revista de Ciências Ambientais**, v.6, n.2, p. 95-112, 2012.
- MELO-SANTOS, M.A.V.; VARJAL-MELO, J.J.M.; ARAÚJO, A.P.; GOMES, T.C.S.; PAIVA, M.H.S.; REGIS, L.N.; FURTADO, A.F.; MAGALHAES, T.; MACORIS, M.L.G.; ANDRIGHETTI, M.T.M.; AYRES, C.F.J. Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. **Acta Tropica**, 113: 180-189, 2010.
- MENDES, L.A.; MARTINS, G.F.; VALBON, W.R.; SOUZA, T.S.; MENINI, L.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M.F.S. Larvicidal effect of essential oils from brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. **Industrial Crops & Products**. 108: 684-689, 2017.
- MLAKAR, J.; KORVA, M.; TUL, N.; POPOVIĆ, M.; POLJŠAK-PRIJATELJ, M.; MRAZ, J.; KOLENC, M.; RUS, K.R.; VIPOTNIK, T.V.; VODUŠEK, V.F.; VIZJAK, A.; PIŽEM, P.; PETROVEC, M.; ŽUPANC, T.A. Zika virus associated with microcephally. **The new england journal of medicine**, 374:951-8, 2016.
- MUNUSAMY, R.G.; APPADURAI, D.R.; KUPPUSAMY, S.; MICHAEL, G.P.; SAVARIMUTHU, I. Ovicidal and larvicidal activities of some plants extracts against *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, 6: 468-471, 2016.
- MUTHUKRISHNAN, J.; PUSHPALATHA, E. Effects of plant extracts on fecundity and fertility of mosquitoes. **Journal of Appied. Entomology**, 125:31-35, 2001.

- NOVAES, A.S.; MOTA, J.S.; BARROS, M.E. 2010. Estudo bibliográfico sobre possível atividade antitiliásica de *Piper amargo* (Piperaceae). **III Simpósio Intercambio Brasil-Japão em Sustentabilidade: Um Desafio da Humanidade**. Campo Grande-MS, 4p., 2010.
- OLIVEIRA, M.S.C.; MORAIS, S.M. MAGALHÃES, D.V.; BATISTA, W.P.; VIEIRA, I.G.P.; CRAVEIRO, A.A.; MANEZES, J.E.S.A.; CARVALHO, A.F.U.; LIMA, G. P.G. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. **Acta Tropica**. 117: 165-170, 2011.
- OLIVEIRA, G.L.; CARDOSO, S.K.; JÚNIOR, C.R.L.; VIEIRA, T.M.; GUIMARÃES, E.F.; FIGUEIREDO, L.S.; MARTINS, E.R.; MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C. Chemical study and larvicidal activity against *Piper aduncum* essential oil *Aedes aegypti* L. (Piperaceae). **Academia Brasileira de Ciências**. 8: 110-118, 2013.
- OLIVEIRA, A.C.; CARNEIRO, S.B.; PINHEIRO, C.C.S. Identificação química e atividade inseticida do pau d'angola (*Piper alatipetiolatum*) sobre *Aedes aegypti*. **I Encontro de Química do Norte – SBQ Norte**, 2014.
- OLIVEIRA, A.C.; BRITO, R.S.; ROQUE, R.A.; TADEI, W.P.; NUNOMURA, R.C.S. Atividade biológica do extrato metanólico de *Piper alatipetiolatum* (Piperaceae) contra larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). In: **Anais do Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2017a.
- OLIVEIRA, A.C.; BRITO, R.S.; ROQUE, R.A.; TADEI, W.P.; NUNOMURA, R.C.S. Avaliação do extrato metanólico de *Piper purusanum* (Piperaceae) contra larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). In: **Anais do Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2017b.
- OLIVEIRA, A.C. **Desenvolvimento de um bioinseticida contra o *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) a partir das espécies botânicas *Piper alatipetiolatum* e *Piper purusanum* (Piperales: Piperaceae)**. Tese de pós-graduação-doutorado (Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica) – Universidade Federal do Amazonas, 2018. Não publicado.
- OLLIARO, P.; FOUQUE, F.; KROEGER, A.; BOWMAN, L.; VELAYUDHAN, R.; SANTELL, A.C.; GARCIA, D.; RAMM, R.S.; SULAIMAN, L.H.; TEJEDA, G.S.; MORALES, F.C.; GOZZER, E.; GARRIDO, C.B.; QUANG, L.C.; GUTIERREZ, G.; YADON, Z.E.; RUNGE-RANZINGER, S. Improved tools and strategies for the prevention and control of arboviral diseases: A research-to-policy fórum. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 12(2): e0005967, 2018.
- OPAS/OMS - Organização Pan-Americana da Saúde/ Organização Mundial da Saúde. Dengue. 2018. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=416:dengue&Itemid=463> Acesso em: 06/10/2018.
- PANDEY, A.; TRIPATHI, S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, 2 (5): 115-119, 2014.
- PEREIRA, A.I.S.; PEREIRA, A.G.S.; SOBRINHO, O.P.L.; CANTANHEDE, E.K.P.; SIQUEIRA, L.F.S. Antimicrobial activity in the control of larvae of the *Aedes aegypti* mosquito: Homogenization of the essential oils of linalool and eugenol. **Chemical Education**. 25: 446-449, 2014.
- PROPHIRO, J.S.; SILVA, O.S.; LUNA, J.E.D.; PICCOLI, C.F.; KANIS, L.A.; NAVARRO-DA-SILVA, M.A. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temephos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of urbanization. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 44(3):300-305, 2011.
- RAFAEL, J.A.; MELO, G.A.R.; CARVALHO, C.J.B.; CASARI, S.A.; CONSTANTINO, R. **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. 1.ed. Ribeirão Preto: Editora Holos, p. 810, 2012.
- RAMANIBAI, R.; PARTHIBAN, E.; BOOTHAPANDI, M. Effect of seed kernel aqueous extract from *Annona squamosa* against three mosquito vectors and its impact on non-target aquatic organisms. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. 6: 741-745, 2016.
- REEGAN, A.D.; KANNAN, R.V.; PAULRAJ, M.G.; IGNACIMUTHU, S. Synergistic effects of essential oils-based cream formulations against *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**. 17: 327-331, 2014.
- ROCHA, M.R.P. Atividade antibacteriana de extratos vegetais de *Piper purusanum* sobre cepas de *Escherichia coli* e *Shigella*. **Anais do XI encontro de Iniciação Científica Unip/Pibic – CNPq**. E-ISSN: 1983 – 8387, 2009.

- RODRIGUES, F.A.; PIMENTA, V.S.C; BRAGA, K.M.S.; ARAÚJO, E.G. Obtenção de Extratos de Plantas do Cerrado. Enciclopédia Biosfera, v.13 n.23; p. 870, 2016.
- ROEL, A. R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, 1:43-50, 2001.
- SÁ, E, L. R. **Estudo das áreas de ocorrência e dos criadouros preferenciais de *Aedes albopictus* Skuse, 1894 (Diptera: Culicidae) em Manaus, Amazonas, Brasil**. Dissertação de pós-graduação-mestrado (Programa de Pós-graduação em Entomologia) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2004.
- SADEK, M.M. Antifeedant and toxic activity of *Adhatoda vasica* leaf extract against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). **Journal of Applied Entomology**, 127:396-404, 2003.
- SANTANA, H.T. **Estudo fitoquímico de *Piper alatabaccum* Trel & Yunck, 1950 e avaliação da atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) em condições de campo simulado**. Dissertação de pós-graduação-mestrado (Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental) – Universidade Federal de Rondônia, 2012.
- SANTANA, H.T.; TRINDADE, F.T.T.; STABELI, R.G.; SILVA, A.A.E., MILITÃO, J.S.L.T.; FACUNDO, V.A. Essential oils of leaves of Piper species display larvicidal activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Rev. Bras. Pl. Med., Campinas**, v.17, n.1, p.105-111, 2015.
- SANTOS, M.S.; POSER, G.V.; BORDIGNON, S.; RIBEIRO, V.L.S.; FERRAZ, A.B.F. Análise química e avaliação da atividade acaricida das folhas de *Piper amargo*, *P. mikanianum* e *P. xylosteoides* em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Revista de Iniciação Científica da ULBRA, 4: 65-71, 2010.
- SANTOS, T.G.; REBELO, R.A.; DALMARCO, E.M.; GUEDES, A.; GASPER, A.L.; CRUZ, A.B.; SCHMIT, A.P.; CRUZ, R.C.B.; STEINDEL, M.; NUNES, R.K. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. PRESL.) C.DC. **Química nova**, 35: 477-481, 2012.
- SANTOS, T.N. **Distribuição espacial e perfil de resistência do *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) na ilha de paquetá, Rio de Janeiro – Brasil**. Dissertação de pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2017.
- SAÚDE. Anvisa muda indicação da vacina contra dengue. Quem deve tomar agora? 2018. Disponível em: <<https://saude.abril.com.br/medicina/anvisa-muda-indicacao-da-vacina-contra-dengue-quem-deve-tomar- agora/>> Acesso em: 06/10/2018.
- SERPA, L.L.N.; COSTA, K.V.R.M.; VOLTOLINI, J.C.; KAKITANI, I. Variação sazonal de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no município de Potim, São Paulo. **Rev. Saúde Pública**, 2006.
- SILVA, W.C.; RIBEIRO, J.D'ARC.; SOUZA, H.E.M.; CORRÊA, R.S. Atividade inseticida de *Piper aduncum* (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. **Acta Amazonica**. 37: 293-298, 2007.
- SILVA, W.J.; DÓRIA, G.A.A.; MAIA, R.T.; NUNES, R.S.; CARVALHO, G.A.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; MARÇAL, R.M.; CAVALCANTI, S.C.H. Effects of essential oil on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**. 99: 3251-3255, 2008.
- SILVA, M.F.R.; BEZERRA-SILVA, P.C.; LIRA, C.S.; ALBUQUERQUE, B.N.L.; NETO, A.C.A.; PONTUAL, E.V.; MACIEL, J.R.; PAIVA, P.M.G.; NAVARRO, D.M.A.F. Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae). **Experimental Parasitology**. 165: 64-70, 2016.
- SOUZA, J.O.; JÚNIOR, O.L.P.; PINHEIRO, C.C.S. Caracterização farmacológica da *Piper purusianum* (Piperaceae) coletada no estado do Amazonas. **XVIII Jornada de Iniciação Científica PIBIC CNPq/FAPEAM/INPA**, 2009.
- SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 30 de 2018. Boletim Epidemiológico, v. 49, n. 34, 2018.
- TADEI, W.P.; SANTOS, J.M.M.; RODRIGUES, I.B.; RAFAEL, M.S. **Pesquisa Científica e Tecnológica em saúde: Laboratório de vetores Malária e Dengue**. Ministério da Ciência e Tecnologia. p. 283., 2010.

TAUKOORAH, U.; LALL, N.; MAHOMOODALLY, F. *Piper betle* L. (betel quid) show bacteriostatic, additive, and synergistic antimicrobial action when combined with conventional antibiotics. **South African Journal of Botany**. v. 105, p. 133-140, 2016.

ZHAO, B.; GRANT, G.G.; LANGEVIN, D.; MACDONALD, L. Deterring and inhibiting effects of quinolizidine alkaloids on spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) oviposition. **Environmental of Entomology**, 27:984-992, 1998.

WHEELER, D.A.; ISMAN, M.B. Antifeedant and toxic activity of *Trichilia americana* extract against the larva of *Spodoptera litura*. **Entomology Experimental Applied**, 98:9-16, 2001.

WHO - World Health Organization. Communicable Disease Control, Prevention and Eradication. Pesticide Evaluation Scheme 13. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**. 41p, 2005.

WHO - World Health Organization. What is dengue? 2018a. Disponível em: <<http://www.who.int/denguecontrol/disease/en/>> Acesso em: 06/10/2018.

WHO - World Health Organization. Dengue and severe dengue. 2018b. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>> Acesso em: 06/10/2018.

WU, Q. L., WANG, P. S., TU, G. Z., FENG, Y. X., YAHG, J. S. Alkaloids from *Piper puberullum*. **Phytochemistry**. 44 (4): 727-730, 1997.

YASEEN, H.M.; SIMON, F.; DEPARIS, X.; MARIMOUTOU, C. Estimation of lasting impact of a Chikungunya outbreak in Reunion Island. **Epidemiology: Open Access**, S2:003, 2012.