

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

GRACIELA APARECIDA ROSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Trixis vauthieri DC SOBRE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA:
PSYCHODIDAE)**

Diamantina

2020

Graciela Aparecida Rosa

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Trixis vauthieri DC SOBRE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA:
PSYCHODIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrade Barata

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Patricia Machado de Oliveira

Diamantina

2020

R788a	<p>Rosa, Graciela Aparecida. Avaliação da atividade inseticida do óleo essencial de <i>Trixis vauthieri</i> DC sobre <i>Lutzomyia longipalpis</i> (Diptera: Psychodidae) / Graciela Aparecida Rosa, 2020. 70 p. : il.</p> <p>Orientador: Ricardo Andrade Barata</p> <p>Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020.</p> <p>1. Leishmaniose visceral. 2. Controle de vetores. 3. Flebotomíneos. 4. <i>Trixis vauthieri</i>. 5. Asteraceae. I. Barata, Ricardo Andrade. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p style="text-align: right;">CDD 595.7</p>
-------	--

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

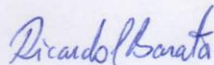
GRACIELA APARECIDA ROSA

Avaliação da atividade inseticida do óleo essencial de *Trixis vauthieri* DC sobre *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae)

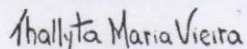
Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM BIOLOGIA ANIMAL,
nível de MESTRADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MESTRA EM BIOLOGIA ANIMAL

Orientador (a): Prof. Dr. Ricardo
Andrade Barata

Data da aprovação : 17/02/2020



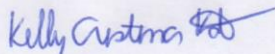
Prof.Dr. RICARDO ANDRADE BARATA - UFVJM



Prof.Dr.^a THALLYTA MARIA VIEIRA - UNIMONTES



Dr. DANIEL JOSÉ SILVA VIANA - UFVJM



Prof.Dr.^a KELLY CRISTINA KATO - UFVJM

DIAMANTINA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
DIAMANTINA – MINAS GERAIS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



ATESTADO DE DEFESA POR VIDEOCONFERÊNCIA

Atesto, para os devidos fins, que no dia 17 de fevereiro de 2020, às 14hs, nas dependências da UFVJM – em Diamantina, foi realizada a defesa de dissertação/tese da discente Graciela Aparecida Rosa com o trabalho intitulado “Avaliação da atividade inseticida do óleo essencial de *Trixis vauthieri* DC sobre *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae)”, no Programa de Pós-graduação em Biologia Animal.

Na qualidade de presidente da banca, atesto que a Prof.(a) Dr.(a) Thallyta Maria Vieira (docente da UNIMONTES, participou através de videoconferência.

Em virtude da participação remota do membro da banca acima indicado, eu, Ricardo Andrade Barata, enquanto servidor público, no gozo de fé pública, assino no lugar desse na Ata de Defesa e na Folha de Aprovação da referida defesa.

Por ser verdade, dou fé e assino o presente atestado.

Diamantina, 17 de fevereiro de 2020.

Presidente da Banca

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência. Obrigado por me permitir errar, aprender e crescer.

À minha mãe e ao meu pai deixo um agradecimento especial, por todas as lições de amor, companheirismo, amizade, caridade, dedicação, compreensão e perdão que vocês me dão a cada novo dia. Sinto-me orgulhoso e privilegiado por ter pais tão especiais. E à minha irmã e meu irmão, sempre prontos a me apoiar em tudo nesta vida apesar de certos desencontros.

Ao meu namorado, Ronaldo, por todo amor, carinho, compreensão e apoio em tantos momentos difíceis desta caminhada. Obrigado por permanecer ao meu lado, mesmo sem os carinhos rotineiros, sem a atenção devida e depois de tantos momentos de lazer perdidos. Obrigado pelo presente de cada dia, pelo seu sorriso e por saber me fazer feliz.

Ao meu príncipe, Jean Lucas, por todo amor incondicional que você sempre me deu, mesmo nos momentos de estresse. Foi por você, meu filho, que batalhei para concluir mais essa etapa na minha vida. A sua existência é o reflexo mais perfeito da existência de Deus. Mamãe te ama muito.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Andrade Barata pelos ensinamentos e por ter me concedido essa oportunidade única de realizar uma Pós-Graduação.

À Professora Dr^a Patrícia Machado de Oliveira, pelas orientações sobre produtos naturais, com ênfase nos óleos essenciais.

À Mariana César e Joice, pelas orientações sobre as extrações dos óleos essenciais e realização dos testes de prospecção fitoquímica.

Ao meu colega Yrllan Ribeiro Sincurá pela colaboração durante os testes biológicos.

À Prefeitura Municipal de Diamantina, em especial ao setor de Zoonoses, pela colaboração durante as coletas dos flebótomos.

Ao Departamento de Química, pela infraestrutura do Laboratório NEOPRONAT.

Ao Professor Carlos Vitor Mendonça, pela indicação da planta objeto de estudo neste trabalho.

À técnica Darliana Fonseca do Herbário DIAM, pelo auxílio no registro das exsicatas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal e seus integrantes, professores e colegas.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri pela infraestrutura de laboratórios, equipamentos, materiais de consumo e pela bolsa concedida.

A todos que direta ou indiretamente estiveram envolvidos neste trabalho, muito obrigada!

Dedico este trabalho aos meus pais, Gabriel e Marlene, aos meus irmãos Guilherme e Gabriela, ao meu filho Jean Lucas, ao meu companheiro Ronaldo e a todos que me ajudaram de alguma forma nessa caminhada.

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo”.

(Martin Luther King)

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença grave, podendo apresentar altos índices de letalidade. No Brasil, encontra-se em franca expansão geográfica em virtude da urbanização facilitada pela adaptação do seu principal vetor, o flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*. O controle vetorial tem sido realizado através da higiene ou manejo ambiental e aplicação de inseticidas de ação residual nos domicílios e abrigos de animais. Apesar do esforço realizado na execução destas e de outras medidas não se consegue a erradicação da doença. Adicionalmente, a resistência de *Lu. longipalpis* aos inseticidas convencionais vem sendo relatada. As plantas tornaram-se uma importante alternativa como fonte de produtos naturais biologicamente ativos, com vasta aplicação na agropecuária e na saúde pública. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade inseticida de óleo essencial de *Trixis vauthieri* sobre adultos selvagens de *Lutzomyia longipalpis*, identificar os compostos fitoquímicos do óleo essencial e verificar a influência do ritmo circadiano da planta sobre a mortalidade dos insetos. Para isso, folhas frescas de *T. vauthieri* foram coletadas em junho de 2019, em três horários distintos (7, 13 e 19 horas) em um mesmo dia, para obtenção de óleos essenciais através de arraste a vapor por Clevenger. Estes foram diluídos em solução de Tween 80 a 3% para a obtenção de concentrações a 5, 10 e 20 mg.mL⁻¹. Os flebotomíneos foram coletados com utilização de armadilha luminosa HP, em uma localidade rural do município de Diamantina/MG. Vinte espécimes (10 machos e 10 fêmeas em triplicata) foram transferidos para cada recipiente, onde foram aplicados os óleos essenciais nas diferentes concentrações. A mortalidade foi avaliada após 1, 2, 4, 12, 24, 48 e 72 horas de tratamento. A investigação fitoquímica presente no óleo essencial de *T. vauthieri* foi realizada de acordo com a metodologia de prospecção preliminar proposta por Matos (1997). O óleo essencial de *T. vauthieri* extraído da coleta das 7h na concentração de 20 mg.mL⁻¹ mostrou uma atividade inseticida sobre *Lu. longipalpis* mais eficiente, com 98,33% de mortalidade sobre os insetos adultos após 72h de tratamento. A análise dos constituintes químicos revelou a presença de triterpenos e/ou esteróides, taninos, flavonóides, alcalóides, saponinas e cumarinas. Os resultados obtidos sugerem que o óleo essencial de *T. vauthieri* é promissor na busca por compostos naturais ativos e puros com atividade inseticida sobre *Lu. longipalpis*.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral, Controle de vetores, Flebotomíneos, *Trixis vauthieri*, Asteraceae.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a serious disease and can have high rates of lethality. In Brazil, it is experiencing a wide geographical expansion due to urbanization facilitated by the adaptation of its main vector, the sand fly of the species *Lutzomyia longipalpis*. Vector control has been carried out through hygiene or environmental management and the application of residual action insecticides in animal homes and shelters. Despite the effort made in carrying out these and other measures, the disease has not been eradicated. Additionally, *Lu. longipalpis* resistance to conventional insecticides has been reported. Plants have become an important alternative as a source of biologically active natural products, with wide application in agriculture and public health. This study aimed to evaluate the insecticidal activity of essential oil of *Trixis vauthieri* on wild adults of *Lu. longipalpis*, to identify the phytochemical compounds of the essential oil and to verify the influence of the plant's circadian rhythm on insect mortality. For this, fresh leaves of *T. vauthieri* were collected in June 2019, at three different times (7, 13 and 19 hours) in the same day, to obtain essential oils through steam dragging by Clevenger. These were diluted in a 3% Tween 80 solution to obtain concentrations at 5, 10 and 20 mg.mL⁻¹. The sandflies were collected using an HP light trap in a rural location in the municipality of Diamantina/MG. Twenty specimens (10 males and 10 females in triplicate) were transferred to each container, where the essential oils were applied in different concentrations. Mortality was assessed after 1, 2, 4, 12, 24, 48 and 72 hours of treatment. The phytochemical investigation present in the essential oil of *T. vauthieri* was carried out according to the preliminary prospecting methodology proposed by Matos (1997). The essential oil of *T. vauthieri* extracted from the collection of 7 am in the concentration of 20 mg.mL⁻¹ showed an insecticidal activity on *Lu. longipalpis* more efficient, with 98.33% mortality on adult insects after 72 hours of treatment. The analysis of the chemical constituents revealed the presence of triterpenes and / or steroids, tannins, flavonoids, alkaloids, saponins and coumarins. The results obtained suggest that *T. vauthieri* essential oil is promising in the search for active and pure natural compounds with insecticidal activity on *Lu. longipalpis*.

Keywords: Visceral Leishmaniasis, Vector control, Phlebotomines, *Trixis vauthieri*, Asteraceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Endemicidade da leishmaniose visceral no mundo em 2016.....	16
Figura 2: Ciclo biológico de flebotomíneos.....	18
Figura 3: Insetos adultos de <i>Lutzomyia</i> sp.....	20
Figura 4 e 4A: Parte aérea da <i>Trixis vauthieri</i>	28
Figura 5: Representação do aparelho de Clevenger.....	31
Figura 6: Extração de OE por arraste a vapor, com uso de aparelho tipo Clevenger.....	35
Figura 7: Funil de separação contendo éter e óleo essencial.....	36
Figura 8: Teste para investigação de metabólitos secundários nos óleos essenciais de <i>Trixis vauthieri</i>	38
Figura 9: Armadilha HP usada para a captura de flebotomíneos exposta em galinheiro.....	39
Figura 10: Potes para a realização dos ensaios para avaliação inseticida dos óleos essenciais de <i>Trixis vauthieri</i> sobre <i>Lu. longipalpis</i>	40
Figura 11: Porcentagem de mortalidade de <i>Lu. longipalpis</i> em relação ao tempo de exposição ao óleo essencial de folhas frescas de <i>T. vauthieri</i> , em diferentes concentrações e horários de coleta.....	45
Figura 12: Porcentagem de mortalidade de <i>Lu. longipalpis</i> (machos) em relação ao tempo de exposição ao óleo essencial de folhas frescas de <i>T. vauthieri</i> , em diferentes concentrações e horários de coleta.....	47
Figura 13: Porcentagem de mortalidade de <i>Lu. longipalpis</i> (fêmeas) em relação ao tempo de exposição ao óleo essencial de folhas frescas de <i>T. vauthieri</i> , em diferentes concentrações e horários de coleta.....	49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Massa vegetal de *Trixis vauthieri* obtida por horário de coleta utilizada em cada extração de óleo essencial.....36
- Tabela 2: Composição fitoquímica dos óleos essenciais de *T. vauthieri* quanto às classes de metabólitos secundários.....42
- Tabela 3: Porcentagem de mortalidade de *Lu. longipalpis* em relação ao tempo de exposição ao óleo essencial de folhas frescas de *T. vauthieri*, em diferentes concentrações e horários de coleta.....44
- Tabela 4: Porcentagem de mortalidade de *Lu. longipalpis* (machos) em relação ao tempo de exposição ao óleo essencial de folhas frescas de *T. vauthieri*, em diferentes concentrações e horários de coleta.....46
- Tabela 5: Porcentagem de mortalidade de *Lu. longipalpis* (fêmeas) em relação ao tempo de exposição ao óleo essencial de folhas frescas de *T. vauthieri*, em diferentes concentrações e horários de coleta.....48

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CO₂: dióxido de carbono

FeCl₃: Cloreto de ferro

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

Le: Leishmania

Lu: Lutzomyia

LV: leishmaniose visceral

Mg.: Migonemyia

mm: milímetro

MS: Ministério da Saúde

Na₂SO₄: Sulfato de sódio

OE: Óleo essencial

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPAS: Organização Pan-americana de Saúde

PCLV: Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.

UFVJM: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

UV: radiação ultravioleta

α : Alfa

β : Beta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Leishmanioses: aspectos gerais.....	14
2.2 Biologia e ecologia dos flebotomíneos.....	17
2.3 Controle da leishmaniose visceral no Brasil.....	21
2.4 Plantas com propriedades inseticidas.....	24
2.5 <i>Trixis vauthieri</i> DC.....	26
2.6 Óleos essenciais.....	28
2.6.1 Métodos de obtenção de óleos essenciais.....	30
2.6.2 Influência circadiana composição química dos óleos essenciais.....	32
3. JUSTIFICATIVA.....	33
4. OBJETIVOS.....	34
4.1 Objetivo geral.....	34
4.2 Objetivos específicos.....	34
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
5.1 Material vegetal.....	35
5.1.1 Coleta e identificação do material vegetal.....	35
5.1.2 Extração do óleo essencial.....	35
5.1.3 Rendimento dos óleos essenciais.....	37
5.2 Prospecção fitoquímica dos óleos essenciais.....	38
5.3 Flebotomíneos.....	39
5.3.1 Local de coleta.....	39
5.3.2 Manutenção em laboratório.....	39
5.4 Avaliação da atividade inseticida.....	40
5.5 Análise de dados.....	41
6. RESULTADOS.....	42
6.1 Rendimento final dos óleos essenciais.....	42
6.2 Identificação das classes de metabólitos secundários dos óleos.....	42
6.3 Avaliação da mortalidade de <i>Lu. longipalpis</i>	43
7. DISCUSSÃO.....	50
8. CONCLUSÕES.....	55
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
-------------------------------------	----

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) está entre as principais doenças infecciosas e parasitárias de ampla distribuição geográfica, podendo ser endemicamente encontrada na Ásia, Europa, África e nas Américas. Nas Américas, o Brasil aparece como o país com o maior número de casos entre os países acometidos pela LV. É causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos por fêmeas de insetos infectados, pertencentes à família Psychodidae, principalmente do gênero *Lutzomyia*, denominados flebotomíneos, além do gênero *Phlebotomus*, ocorrente no novo mundo (WHO, 2015; HASHIGUCHI *et al.*, 2017).

A LV, a princípio, era considerada uma endemia parasitária exclusivamente rural, entretanto devido as crises ambientais e aos processos migratórios e de urbanização, juntamente com a domiciliação do vetor e a participação do cães infectados, não sintomáticos, houve o surgimento de novos focos, facilitando a ocorrência de epidemias e o aparecimento de novas áreas de transmissão em áreas urbanas (ALVAR *et al.*, 2012; SANTOS, 2014; WHO, 2015).

O flebotomíneo tem papel essencial na cadeia de transmissão da doença devido à sua alta plasticidade e antropofilia, que favorece sua adaptação em ambientes modificados pelo homem, permitindo a manutenção do ciclo de transmissão da LV (RANGEL & VILELA, 2008; ALVES, 2009; REBELO *et al.*, 2010; ALVAR *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2012; SANTOS, 2014; COSTA *et al.*, 2014; HASHIGUCHI *et al.*, 2017).

O controle da LV está diretamente relacionado ao combate de seu vetor em ambientes urbanos através da aplicação de inseticidas de ação residual, como a alfacipermetrina, um piretróide sintético. Entretanto, o uso indiscriminado desses inseticidas tem contribuído para a resistência de flebotomos a produtos convencionais, indicando a necessidade de um controle racional, que considere os diferentes componentes do controle integrado. Além disso, há poucos estudos acerca do mecanismo de ação desses compostos (FOGANHOLI & ZAPPA, 2011; BASTOS, 2014;).

Neste contexto a busca de inseticidas e repelentes de origem botânica tem sido impulsionada pela necessidade de descobrir novos produtos que sejam eficazes, seguros e menos dispendiosos do que aqueles utilizados atualmente (DE PAULA, 2004). Ademais, estes produtos têm boa aceitabilidade e biodisponibilidade (YAGHOOBI-ERSHADI *et al.*, 2006).

Metabólitos secundários de plantas são conhecidos por suas propriedades inseticidas. Em muitos casos, as plantas têm uma história de uso para remédios caseiros e ainda para matar ou repelir insetos (BROUSSALIS *et al.*, 1999). O incentivo às investigações sobre interações plantas/insetos nas últimas décadas desvenda o uso potencial dos metabólitos de plantas como agentes com esta finalidade (PAVELA, 2004).

Sabe-se que uma propriedade que decorre da interação dos constituintes químicos dos óleos essenciais com o meio ambiente é a sua utilização como inseticida natural (SILVA *et al.*, 2007). Compostos específicos isolados de extratos/óleos essenciais de plantas são testados para fumigação (RAJENDRAN; SRIRANJINI, 2008). Dentre as diversas famílias descritas na literatura como possuidoras de atividade inseticida e/ou repelente, encontram-se as plantas das famílias Meliaceae (VIEGAS-JÚNIOR, 2003), Rutaceae (EZEONU *et al.*, 2001), Graminae (ANSARI e RAZDAN, 1995), Labiatae (PATHAK *et al.*, 2000) e Verbenaceae (CARVALHO *et al.* 2003). Estes dados são um incentivo à pesquisa científica de plantas no controle do vetor da LV.

A família Asteraceae, constituída por cerca de 1.600 gêneros, que incluem 23.000 espécies distribuídas pelas regiões tropicais, subtropicais e temperadas, particularmente na América do Sul (CANCELLI *et al.*, 2007), possui várias espécies que apresentam constituintes bioativos. No entanto, a maior parte dessas espécies ainda não foi submetida à investigação química e de bioprospecção (HIND; BEENTJE, 1996). Plantas dessa família têm sido extensivamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica (antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, antiinflamatória) (VERDI *et al.*, 2005), sendo os compostos fenólicos e os terpenóides umas das classes de moléculas mais investigadas por apresentarem potencial farmacológico (MUNOZ-SUANO *et al.*, 2009; VITALINI *et al.*, 2011).

Dentre tantas espécies da família Asteraceae, temos a *Trixis vauthieri* que ocorre somente no Brasil (KATINAS, 1996; MONGE, 2014). *Trixis vauthieri* foi previamente submetida a um estudo fitoquímico por BOHLMANN *et al.* (1981), onde foram isolados 24 compostos de raízes e partes aéreas, principalmente flavonóides e terpenóides.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Leishmanioses: aspectos gerais

As leishmanioses são doenças infecciosas consideradas um grande problema de saúde pública, com considerável importância médica por terem ampla distribuição geográfica, além de apresentar alta incidência na população humana (WHO, 2015). São causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania* Ross, 1903, pertencentes à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. O parasito *Leishmania* apresenta-se sob duas formas básicas: a forma flagelada denominada promastigota encontrada em hospedeiros invertebrados e a forma amastigota sem flagelo livre (ou com flagelo interiorizado), encontrada no interior de células do sistema monocítico fagocitário do hospedeiro vertebrado (WARD, 1985; LAINSON & SHAW, 1987).

As espécies de parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidas pela picada de fêmeas hematófagas infectadas de dípteros da subfamília Phlebotominae (GALATI, 2003) conhecidos como flebotomíneos, pertencentes ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (KILLICK-KENDRICK, 1990) e alguns gêneros no Novo Mundo (*Lutzomyia*, *Psychodopygus*, *Pintomyia*, *Nyssomyia*, dentre outros) (BRAZIL *et al.*, 2015). Até os dias de hoje, já foram descritas cerca de 50 espécies do gênero *Leishmania* encontradas em diversos animais em todos os continentes, com exceção da Antártida, e mais de 20 espécies são responsáveis por causar patologias ao homem, agrupadas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (BATES, 2007; AKHOUNDI *et al.*, 2016; PAHO, 2017). A classificação destes dois grupos está relacionada com o local de desenvolvimento no trato digestório do hospedeiro invertebrado, divisão confirmada por análises filogenéticas através de sequenciamento de DNA (LAINSON & SHAW, 1987; BATES, 2007).

A transmissão endêmica das leishmanioses (visceral e tegumentar) foi contabilizada em um total de 98 países e regiões (ALVAR *et al.*, 2012). O Brasil está entre os países que reportam a maioria dos casos de leishmanioses no mundo e registra

as mais altas taxas de mortalidade entre os territórios do continente americano (ALVAR *et al.*, 2012; PAHO, 2017).

A ampla distribuição geográfica e alta incidência fazem com que as leishmanioses assumam um papel de destaque na saúde pública, pois aproximadamente 350 milhões de pessoas ao redor do mundo estão expostas ao risco de contrair estas enfermidades e cerca de 12 milhões de pessoas estejam parasitadas com alguma forma da doença. A estimativa é de que a incidência anual dessas doenças sejam de 2 milhões de casos. Destes, aproximadamente 500 mil casos são relacionados à forma visceral (ALVAR, 2012; WHO, 2015).

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença com amplo espectro clínico, considerada grave, especialmente nos casos humanos não tratados, podendo apresentar altos índices de letalidade (ALVAR, 2012). Também conhecida como calazar, é considerada primariamente uma doença de caráter zoonótico, podendo acometer o homem quando este interfere no ciclo de transmissão. A doença assume importância do ponto de vista de saúde pública por ser potencialmente fatal para o homem, além de possuir ampla distribuição mundial (GONTIJO & MELO, 2004; WHO, 2015).

A LV está presente em 88 países; as epidemias recorrentes na África Oriental (Etiópia, Quênia, Sudão do Sul e Sudão) causam alta morbidade e mortalidade nas comunidades afetadas. Mais de 90% dos novos casos notificados à WHO no ano de 2016 ocorreram no Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. O Brasil aparece como o país com maior número de casos entre os 22 países acometidos pela LV nas Américas (WHO, 2016) (Figura 1).

A WHO estima que 1,3 milhões de novos casos de leishmanioses ocorram todo ano. Dos casos registrados na América Latina, 90% ocorrem no Brasil (WHO, 2016). De acordo com Ministério da Saúde do Brasil, de 2000 a 2016, 58 300 casos de LV foram notificados no Brasil (SINAN, 2017). Por ser uma doença com acometimento sistêmico e, senão tratada, pode levar a óbito até 90% dos casos.

A principal espécie causadora da LV nas Américas é *Leishmania infantum*, que tem como principal vetor a espécie de flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* no Brasil (DEANE, 1956; LAINSON & RANGEL, 2005). Outras espécies de flebotomíneos também são apontadas como transmissoras em certas regiões do Brasil na ausência de *Lu. longipalpis*, como a espécie *Migonyia migonei* e *Lu. cruzi*, importante espécie

associada à transmissão de LV no estado do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (SANTOS *et al.*, 1998, CARVALHO *et al.*, 2010).

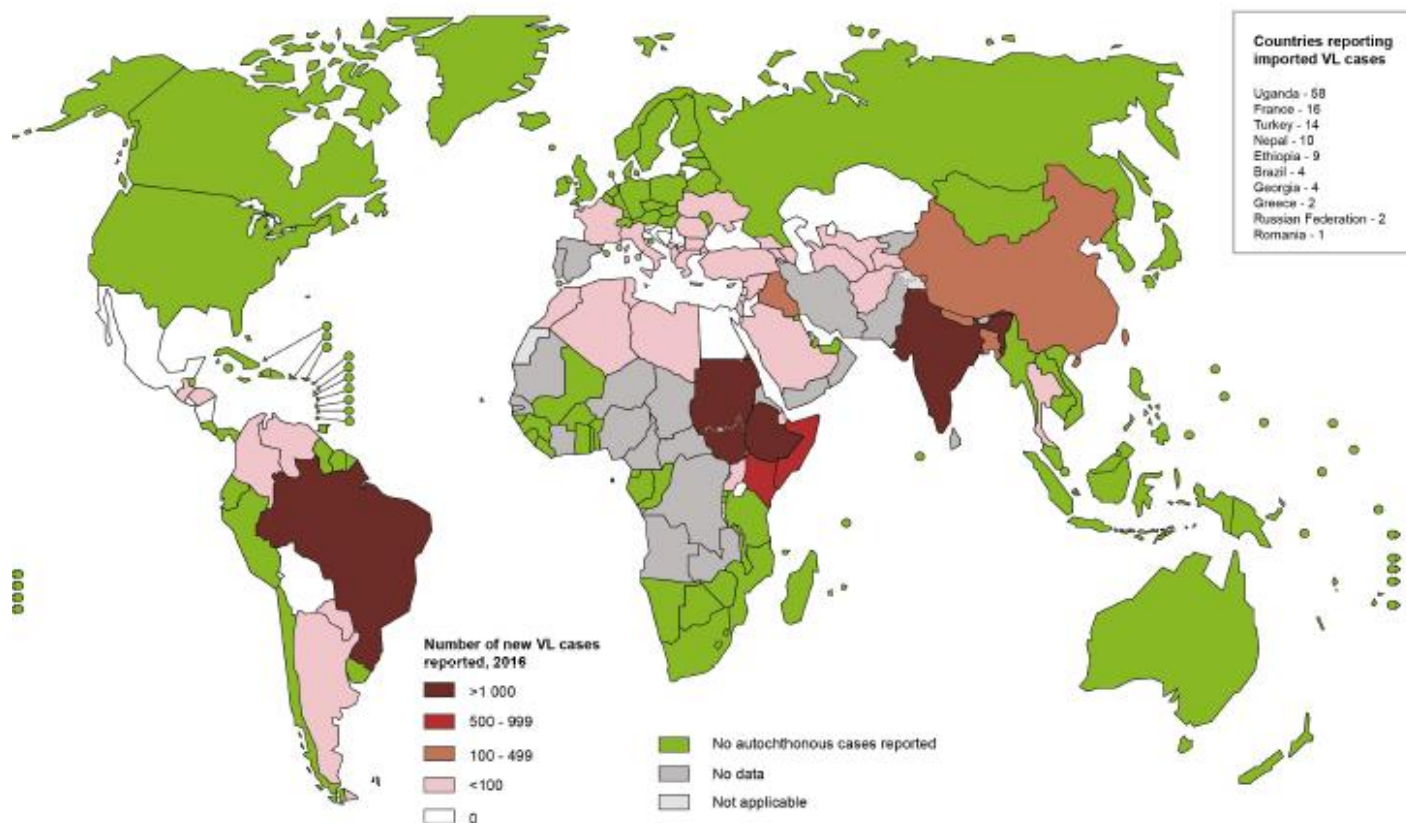


Figura 1: Endemicidade da leishmaniose visceral no mundo em 2016. Fonte: World Health Organization, 2019. Adaptado.

Inicialmente, a LV era uma doença típica de ambiente rural, atingindo pessoas que estivessem próximas ao hábitat natural do vetor e de reservatórios silvestres (as raposas *Cerdocyon thous* e *Dusicyon vetulus* e os marsupiais didelfídeos - *Didelphis albiventris*) do parasito. Porém, habitações humanas foram se aproximando dos locais de ocorrência do ciclo zoonótico da LV, e o processo de urbanização das cidades com a consequente alteração do ambiente rural favoreceu a adaptação dos flebotomíneos às modificações provocadas pelo homem. Desta forma, as espécies vetoras, que eram originalmente silvestres, começaram a ser encontradas próximas às periferias das grandes cidades (DESJEUX, 1996; ROSÁRIO *et al.*, 2016).

A LV é doença reemergente, e encontra-se em expansão geográfica estando urbanizada em várias regiões do Brasil (DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO,

2006). Até o ano de 2007, a transmissão da leishmaniose visceral era relatada em mais de 1.600 municípios pertencentes a 19 dos 27 estados brasileiros e só não estava presente na região sul (RANGEL & VILELA, 2008). Já em 2015 foram notificados 3.289 novos casos, com uma incidência de 1,6 casos/100mil habitantes, distribuídos em 23 Unidades Federativas, incluindo a região sul (BRASIL, 2016).

Inicialmente caracterizada como doença eminentemente rural, nos últimos anos, a doença vem se expandindo para áreas urbanas de municípios de médio e grande porte (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008; BRASIL, 2014; HASHIGUCHI *et al.*, 2017). Essa expansão está diretamente relacionada ao intenso processo migratório, às pressões econômicas ou sociais, à pauperização, ao processo de urbanização crescente, ao esvaziamento rural, às secas periódicas e à expansão das áreas endêmicas de LV (ALVES, 2009).

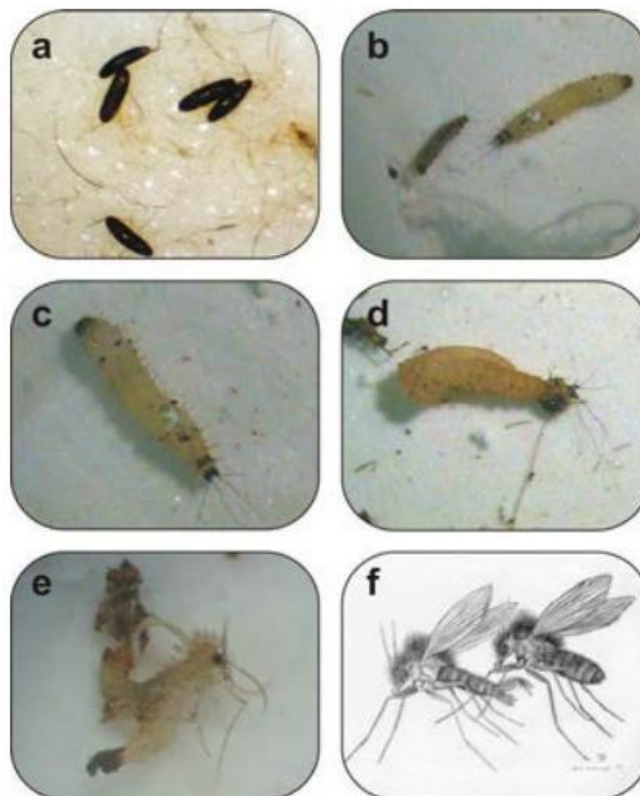
No ciclo urbano de transmissão, os cães (*Canis familiaris*) assumem um papel importante como reservatórios da LV, por apresentarem intenso parasitismo cutâneo, permitindo uma fácil infecção do vetor. Portanto, o reconhecimento das manifestações clínicas nesses animais é uma das importantes ações para adoção de medidas de controle da doença (WERNECK, 2016). É importante destacar que cães infectados podem ou não desenvolver o quadro clínico da doença, cujos sinais viscerais mais comuns são linfadenopatia, emaciação, sinais possíveis de insuficiência renal (poliúria, polidipsia, vômito), neuralgia, poliartrite, poliomiosite, e outros sinais clínicos. Dentre os sinais cutâneos estão a hiperqueratose, pelagem seca e quebradiça, perda de pelos, e unhas anormalmente longas ou quebradiças (SCHIMMING & PINTO-E-SILVA, 2012). Cães não sintomáticos continuam sendo reservatórios naturais.

Estudos epidemiológicos revelam que a LV é mais frequente em crianças menores de 10 anos e o sexo masculino geralmente é o mais afetado (COSTA *et al.*, 1990; REY *et al.*, 2005; REIS *et al.*, 2017). Indivíduos que estejam em um quadro de desnutrição ou imunossupressão são mais susceptíveis à infecção e também à severidade dos sintomas. Além disso, a LV é considerada uma doença oportunista em pacientes com HIV, e a coinfeção da LV com o HIV é uma associação cada vez mais comum devido à sobreposição dos locais de ocorrência das duas infecções, e revela-se como um fator que eleva a letalidade dos pacientes (DESJEUX, 1996; REY *et al.*, 2005; MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008; COUTINHO *et al.*, 2017).

2.2. Biologia e ecologia dos flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (GALATI, 2003). São animais que não ultrapassam 3,0 mm de comprimento e são caracterizados por apresentarem o corpo completamente coberto de cerdas, o que lhes confere uma coloração palha. Popularmente conhecidos no Brasil como freboti, cangalhinha, birigui, mosquito-palha, entre outros nomes (GALATI *et al.*, 2017).

São insetos holometábolos (Figura 2), com desenvolvimento compreendido em ovo, quatro estádios larvários, pupa e adulto. Os ovos têm formato elipsoide, medem em média de 300 a 500 μm de comprimento e apresentam coloração amarelada, escurecendo algumas horas após a postura. As larvas são pequenas, brancas e vermiformes. Suas formas imaturas se desenvolvem no solo, local rico em matéria orgânica em decomposição. As larvas apresentam grande mobilidade deslocando-se à procura de alimento, o que pode ser um fator que dificulte o encontro destas no solo. Quando emergem de pupa para adultos, podem utilizar uma infinidade de ecótopos como abrigo. Há pouca informação sobre os criadouros naturais das larvas de flebotomíneos (GALATI, 2003).



Legenda: a: Ovos, b e c: Larvas de 2º e 4º estágio, d: Pupa, e: Flebotomíneo emergindo da pupa, f: Flebotomíneos macho e fêmea

Figura 2: Ciclo biológico de flebotomíneos. Fonte: SANTOS, 2014.

As formas adultas aladas alimentam-se de sucos vegetais e soluções açucaradas (PESSOA & BARRETO, 1948; SHERLOCK & SHERLOCK, 1972; ALEXANDER & USMA, 1994), e utilizam o carboidrato presente nessas substâncias açucaradas como fonte de energia. Somente as fêmeas se alimentam de sangue de animais vertebrados, para maturação dos ovários, e esta alimentação ocorre através da picada, em diversas espécies de ser vivo, inclusive em humanos (QUINNELL *et al.*, 1992; SHERLOCK, 2003). O hábito alimentar hematófago das fêmeas permite a transferência de patógenos entre os animais alimentados por elas durante os repastos sanguíneos. Algumas fêmeas realizam o repasto apenas uma vez antes da postura dos ovos, mas outras podem se alimentar várias vezes de sangue antes de uma oviposição, aumentando, desta forma, o contato entre o vetor e um hospedeiro suscetível (BRAZIL & BRAZIL, 2003).

A postura dos ovos ocorre geralmente de 3 a 8 dias após a hematofagia. As larvas eclodem em um período de 7 a 10 dias e, alimentam-se da matéria orgânica disponível no substrato (BRAZIL & BRAZIL, 2003). Em seguida, passam por três mudas, desenvolvendo quatro estádios larvais até se tonarem pupas, período que pode durar até 3 semanas. Larvas de 4º estágio podem entrar em dia-pausa para resistir a

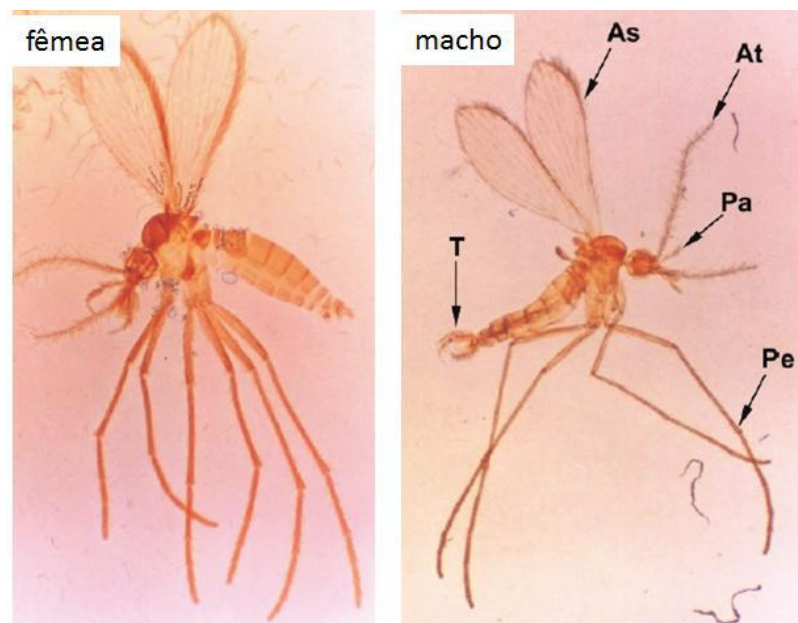
condições adversas até que o ambiente esteja favorável ao seu desenvolvimento (KILLICK-KENDRICK, 1999; BRASIL, 2015;).

Acredita-se que alguns fatores como a temperatura, pluviosidade e umidade estão relacionados com a ocorrência de flebotomíneos, assim a densidade populacional é passível de grande interferência pela variação das estações do ano (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Os locais de abrigo e criadouro dos flebotomíneos sofrem uma pequena variação na temperatura e umidade, característica esta que favorece a presença dos mesmos e pode alterar a dinâmica das populações destes insetos (DIAS *et al.*, 2007) Os flebotomíneos podem apresentar variação sazonal em alguns locais, onde fatores como alta umidade, chuvas em níveis moderados, temperatura e evaporação mais baixas podem favorecer o aumento da densidade de flebotomíneos no período chuvoso (DIAS-LIMA *et al.*, 2003; MACEDO *et al.*, 2008).

Assim, estudos sobre a variação sazonal dos flebotomíneos são importantes para compreender os hábitos dos vetores, além da importância epidemiológica que eles assumem, podendo inclusive direcionar ações para a redução da população e consequentemente auxiliar no controle das leishmanioses (MACEDO *et al.*, 2008).

A fase de pupa atribui aos flebotomíneos certa resistência às variações do tempo e da umidade para que o inseto sofra as transformações necessárias para se tornar adulto. Foi observado que em condições de laboratório que os flebotomíneos adultos sobrevivem por aproximadamente 30 dias. Na natureza, a atividade dos adultos acontece predominantemente no período crepuscular e noturno, sendo que, durante o dia, procuram abrigar-se em locais frescos, úmidos e escuros. Normalmente são encontrados em cascas de árvores, cavernas, fissuras nas paredes das casas, rochas e sob folhas no solo (SHERLOCK, 1996; KILLICK-KENDRICK, 1999; BRAZIL; BRAZIL, 2003).

Na hematofagia, as fêmeas são atraídas pela temperatura e odor dos corpos e o repasto geralmente ocorre no período crepuscular, noturno e no início da manhã (SHERLOCK, 1996). A digestão do sangue ocorre em um período de 2 a 5 dias e o número de ovos produzidos é proporcional à quantidade de sangue ingerido. Não existe um consenso quanto à identificação dos criadouros naturais de flebotomíneos. Sendo assim, os sítios de oviposição e desenvolvimento das formas imaturas ainda não são claramente definidos (BRAZIL & BRAZIL, 2003).



Legenda: *Lutzomyia* sp.: Insetos adultos. Características: Pequenos (2-4 mm) Corpo piloso Asas estreitas (As) Antenas longas (At) Palpos curtos (Pa) Pernas longas e finas (Pe) Genitália masculina (T).

Figura 3: Insetos adultos de *Lutzomyia* sp. Fonte: SANTOS, 2014.

Os flebotomíneos adultos apresentam dimorfismo sexual (Figura 3), sendo as principais diferenças morfológicas observadas nos últimos segmentos abdominais modificados para constituir a genitália; modificações na probóscide, mais desenvolvida nas fêmeas para permitir sugar o sangue; e os dentes no cibário adaptados para iniciar a digestão sanguínea de forma mecânica (BRAZIL & BRAZIL, 2003).

Costumam se abrigar em locais úmidos e sombreados até o momento em que necessitam realizar o repasto sanguíneo e cópula, momento em que podem invadir áreas antropizadas.

Em todo o mundo, são conhecidas mais de 927 espécies de flebotomíneos, com maior abundância encontrada na região Neotropical, apresentando cerca de 500 espécies. O Brasil é um país com grande diversidade de espécies de flebotomíneos, com aproximadamente 274 espécies registradas no território nacional (SHIMABUKURO *et al.*, 2011; ANDRADE & GURGEL-GONÇALVES, 2015). A identificação de cada espécie leva em conta características morfológicas.

No Brasil, até o momento, duas espécies são apontadas como responsáveis por transmitir ao homem o parasito responsável pela forma mais severa das leishmanioses, sendo *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lu. cruzi* (Mangabeira, 1938) no estado do Mato Grosso (MISSAWA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

A espécie *Lutzomyia longipalpis*, é uma espécie com alto grau de sinantropia (SOUZA *et al.*, 2004; LAINSON & RANGEL, 2005; CARVALHO *et al.*, 2010), encontrada em elevada densidade no peridomicílio das residências. No Brasil, sua abrangência é ampla e compreende todas as regiões: Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e região Sul (BRASIL, 2016). Uma das características da espécie é o fato dela apresentar grande plasticidade adaptativa, mostrando-se capaz de sobreviver e manter seu ciclo biológico em diferentes habitats e condições climáticas (COSTA *et al.*, 2013, OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A presença dos flebotomíneos no ambiente urbano é um fator preocupante do ponto de vista epidemiológico. Assim, conhecer os hábitos dos flebotomíneos, bem como entender o papel destes na transmissão das leishmanioses é de grande importância para a saúde pública.

2.3. Controle da leishmaniose visceral no Brasil

A LV é uma doença de transmissão vetorial com ampla distribuição mundial. Estima-se em 200 a 400 mil casos novos a cada ano no mundo, cerca de 10% deles evoluindo para óbito, afetando particularmente populações vivendo em situação de pobreza e vulnerabilidade social (WERNECK, 2016).

Em 2016, a OMS e a OPAS publicaram um informe contendo um plano de ação que pretende eliminar doenças negligenciadas nas Américas, incluindo as leishmanioses, até o ano de 2022. O plano de ação busca adotar medidas que sejam capazes de diminuir as taxas de letalidade e de transmissão da doença.

Desde o início do século XX, quando foi identificada no país e o ciclo de transmissão elucidado, o controle da doença se configurou em um desafio para pesquisadores e profissionais de saúde (WERNECK, 2016).

Assim, o primeiro programa de controle da LV no Brasil, a PCLV foi implementada na década de 60 e era composto basicamente por três medidas: distribuição gratuita do tratamento, controle dos vetores e controle dos reservatórios domésticos (COSTA, 2001). Entretanto, apesar da execução dessas medidas, a LV continuou em expansão pelo país (RANGEL & VILELA, 2008), levando o MS a reavaliar as estratégias de controle.

As atuais medidas utilizadas para reduzir as taxas de mortalidade e o grau de morbidade da doença estão de acordo com o PCLV, organizado pelo MS. As diretrizes que regem esse programa estão contidas no Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (BRASIL, 2014). O PCLV concentra suas atividades no diagnóstico e tratamento dos casos humanos, diagnóstico e eutanásia dos casos caninos, e controle vetorial. No entanto, existe uma necessidade iminente de se rever as ações propostas, e de se encontrar métodos alternativos que sejam eficazes na redução dos indicadores epidemiológicos da doença (MORAIS *et al.*, 2015; ROMERO, 2016; WERNECK, 2016).

O tratamento de casos humanos, apesar de essencial, não impacta diretamente no controle da doença, pois seres humanos no Brasil, não são considerados fontes de infecção para o vetor (WERNECK, 2014). Para a população humana são atribuídas medidas de proteção individual, como o uso de repelentes, mosquiteiros de malha fina e telas nas janelas em ambientes onde o vetor é comumente encontrado (BRASIL, 2014).

Os cães são os reservatórios mais próximos do homem, sendo as medidas de prevenção de grande importância, para a saúde do cão e do homem (MARESCA *et al.*, 2009). É adotado o uso de proteção individual para cães domésticos através de coleiras impregnadas com inseticida deltametrina a 4% (FOGLIA MANZILLO *et al.*, 2006), uso de telas em canis individuais ou coletivos, para impedir a entrada de flebotomíneos e uso de vacina anti-leishmaniose visceral canina que é liberada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, porém sem comprovação de sua total efetividade (BRASIL, 2014). Em relação aos animais errantes, é adotada a captura dos mesmos, principalmente em áreas urbanas e realizado o exame sorológico para LV. Caso o resultado seja negativo, os cães são destinados a adoção, mas caso seja positivo são encaminhados para eutanásia (BRASIL, 2014).

O controle vetorial é considerado o ponto chave do controle da doença, porém apresenta diversos entraves para sua realização de maneira correta. De acordo com DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO (2006), as atividades preconizadas são de difícil realização principalmente devido à falta de conhecimento da biologia vetorial. VON ZUBEN & DONALÍSIO (2016) destacaram que as maiores dificuldades para realização do controle vetorial são a falta de infraestrutura e de recursos humanos, a complexidade e custo da ação, e as recusas da população quando se trata da aplicação do inseticida nos domicílios.

As medidas de prevenção direcionadas ao vetor visam eliminar possíveis focos de reprodução, através do emprego do saneamento ambiental, limpeza de terrenos e abrigos de animais domésticos além do destino adequado do lixo (BRASIL, 2014). Em centros urbanos é possível encontrar maior densidade populacional de flebotomíneos em locais com maior acúmulo de matéria orgânica, como praças arborizadas onde há o acúmulo de folhas em decomposição e locais onde não existem serviços de saneamento básico (URSINE *et al.*, 2016). O controle do vetor tem se mostrado a estratégia mais eficiente, pois impede ou em alguns casos reduz o contato do vetor com a população humana, atenuando o risco de transmissão da doença (COSTA *et al.*, 1990; OLIVEIRA & ARAÚJO, 2003). Atualmente no Brasil, o Ministério da Saúde preconiza a utilização dos piretróides deltametrina e a α -cipermetrina no controle de *Lu. longipalpis*. Esses inseticidas persistentes são utilizados através da borrifação das casas e anexos (BRASIL, 2014).

O uso de piretróides contra flebotomíneos foi motivado pela sua utilização bem-sucedida em mosquiteiros impregnados para o controle de *Anopheles darlingi*, transmissor da malária, esta estratégia é vantajosa, pois pode ser utilizada a nível doméstico/individual (COURTENAY *et al.*, 2007). Outra estratégia do emprego de piretróides no controle de flebotomíneos é a aplicação direta de compostos sintéticos em habitações e edifícios. No entanto, sua eficácia, atividade residual e quantidade necessária variam em diferentes áreas endêmicas (AMORA *et al.*, 2009). Em experimentos realizados com ovos, larvas e adultos de *Lu. longipalpis* submetidos à cipermetrina, utilizada como controle, observou-se uma eficácia de 100% sobre ovos, larvas até a pupação e sobre adultos nas primeiras 24 horas do tratamento (MACIEL *et al.*, 2010). Em Minas Gerais, a borrifação de α -cipermetrina no ambiente domiciliar e peridomiciliar promoveu a diminuição da densidade de flebotomíneos, demonstrando o efeito residual de dois a quatro meses após a aplicação do inseticida (BARATA *et al.*, 2011). Entretanto, o uso da cipermetrina possui desvantagem tais como, não atingir todos os domicílios, o processo de aplicação é invasivo, pode provocar alergias, entre outros.

O controle da LV está diretamente relacionado ao combate de seu vetor em ambientes urbanos através da aplicação de inseticidas de ação residual, como a α -cipermetrina. Entretanto, o uso indiscriminado desses inseticidas tem contribuído para a resistência de flebotomos a produtos convencionais, indicando a necessidade de um

controle racional, que considere os diferentes componentes do controle integrado. Além disso, há poucos estudos acerca do mecanismo de ação desses compostos (FOGANHOLI & ZAPPA, 2011; BASTOS, 2014).

A grande variedade de substâncias químicas presentes na flora brasileira permite a busca de novos compostos inseticidas. Nesse sentido, produtos fitoquímicos podem ser utilizados como alternativa às substâncias sintéticas ou adicionados a outros inseticidas utilizados nos programas de controle de flebotomíneos, considerando que há poucos estudos para avaliação do efeito de plantas sobre este grupo de insetos (VIEIRA *et al.*, 2007; BARREIRO & BOLZANI, 2009).

2.4. Plantas com propriedades inseticidas

Produtos naturais com atividade biológica são fontes principais de novas substâncias químicas úteis no desenvolvimento de moléculas com potencial utilização na farmacologia, agronomia e outros campos de conhecimento humano (MACÍAS *et al.*, 2008).

O Brasil é um país de grande riqueza botânica, com 56 mil espécies de plantas das 256 mil existentes no mundo, possuindo um grande potencial como fonte de compostos biologicamente ativos provenientes de plantas (NAKATANI *et al.*, 2004). As interações inseto-planta são um exemplo de coevolução e, devido a isto, ao longo do processo evolutivo, as plantas desenvolveram mecanismos físicos e químicos para interagir com o meio. O metabolismo secundário de espécies vegetais refere-se à produção de compostos químicos que não estão envolvidos nos processos vitais da planta, como crescimento e reprodução. Sendo assim, estes produtos estão envolvidos em funções ecológicas, em que a planta produz substâncias para interagir com outras espécies, garantindo sua sobrevivência e perpetuação (SIMÕES *et al.*, 2007). Essas interações podem estar envolvidas na atração de polinizadores e/ou dispersores e também na defesa contra animais herbívoros. As substâncias tóxicas para outros organismos são conhecidas como fitotoxinas (MACIEL *et al.*, 2010; CORRÊA & SALGADO, 2011).

Atualmente, os inseticidas naturais têm sido cada vez mais requisitados, apresentando inúmeras vantagens quando comparados ao emprego de inseticidas sintéticos, pois são obtidos de recursos renováveis e rapidamente degradados, não

deixando resíduos em alimentos e no ambiente. No entanto, o desenvolvimento destes compostos requer tempo e também um estudo sistematizado que preencha requisitos, tais como seletividade contra inimigos naturais, baixa toxicidade em mamíferos, biodegradabilidade e ausência de fitotoxicidade, além dos requisitos econômicos para que sua produção em alta escala seja viável (VIEIRA *et al.*, 2001).

A necessidade de métodos mais seguros no controle de insetos tem estimulado a busca de novos princípios ativos de vegetais (VIEGAS-JÚNIOR, 2003). Neste contexto, muitos trabalhos têm sido realizados avaliando a atividade biológica de componentes destes vegetais contra um grande número de patógenos e artrópodes e diversas plantas têm sido descritas com potencial inseticida (SHAALAN *et al.*, 2005).

As plantas com atividade inseticida podem causar diversos efeitos sobre os insetos, como repelência, inibição de oviposição e da alimentação, alterações no sistema hormonal, causando distúrbios no desenvolvimento, deformações, infertilidade e mortalidade nas diversas fases dos insetos. A extensão dos efeitos e o tempo de ação são dependentes da dosagem utilizada, de maneira que a morte ocorre nas dosagens mais elevadas e os efeitos menos intensos e mais duradouros nas dosagens menores (ROEL, 2001).

Entretanto, a toxicidade de uma planta contra insetos, não a qualifica necessariamente como um inseticida. Vários aspectos devem ser levados em consideração tais como: forma de extração e conservação dos extratos, eficácia em baixas concentrações, ausência de toxicidade para mamíferos e animais superiores, fácil obtenção, manipulação e aplicação e viabilidade econômica (VIEGAS-JÚNIOR, 2003). Entre as limitações ao uso de extratos vegetais no campo, podem ser apontadas a falta de dados, principalmente no Brasil, relacionados à fitotoxicidade, à persistência e aos efeitos sobre organismos benéficos. Além disso, o isolamento de princípios ativos e a concentração em diferentes partes vegetais, também devem ser mais pesquisados. Ainda devem ser avaliadas a disponibilidade de matéria-prima, a seleção de solventes, bem como técnicas de conservação e aplicação dos produtos (COSTA *et al.*, 2004)

Produtos de origem vegetal ou derivados foram muito utilizados no controle de pragas agrícolas até a década de 40, como o piretro, a rotenona e a nicotina, pela sua eficiência e segurança com relação aos impactos ambientais. Porém, a criação dos inseticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides levou à

substituição dos inseticidas botânicos pelos sintéticos, devido à sua maior eficiência no combate às pragas (MENEZES, 2005).

Apesar de eficaz, a utilização destes produtos sintéticos trouxe consequências negativas à saúde humana e ao meio ambiente, e isto fez com que a bioprospecção voltasse a ser alvo de inúmeras pesquisas na área. Os estudos visam encontrar produtos naturais que possam substituí-los, com a intenção de investigar e desenvolver novas formulações que minimizem os problemas causados pelos inseticidas sintetizados industrialmente.

Em comparação com os produtos sintéticos, as substâncias de origem natural oferecem menores riscos ao homem e ao meio ambiente, pois são de rápida degradação, não deixam resíduos em alimentos, manifestam baixa ou nenhuma toxicidade a mamíferos e são obtidos de recursos renováveis. Além disso, o desenvolvimento de resistência aos princípios ativos das plantas ocorre mais lentamente, por se tratar de um composto formado pela associação de várias moléculas (MACIEL *et al.*, 2010; CORRÊA & SALGADO, 2011). Sendo assim, uma vez conhecidos os impactos causados pelos produtos sintéticos, os compostos naturais podem ser vistos como uma alternativa à sua utilização.

2.5. *Trixis vauthieri* DC

A família Asteraceae, constituída por cerca de 1.600 gêneros, que incluem 23.000 espécies distribuídas pelas regiões tropicais, subtropicais e temperadas, particularmente na América do Sul (CANCELLI *et al.*, 2007), possui várias espécies que apresentam constituintes bioativos. No entanto, a maior parte dessas espécies ainda não foi submetida à investigação química e de bioprospecção (HIND; BEENTJE, 1996).

A família Asteraceae é ainda uma família rica em espécies com importância econômica, sendo muitas delas utilizadas como plantas ornamentais ou medicinais (BREMER, 1994). Plantas dessa família têm sido extensivamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica (antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, antiinflamatória) (VERDI *et al.*, 2005), sendo os compostos fenólicos e os terpenóides umas das classes de moléculas mais investigadas por apresentarem potencial farmacológico (MUNOZ-SUANO *et al.*, 2009; VITALINI *et al.*, 2011).

Dentre tantas espécies da família Asteraceae, temos a *Trixis vauthieri* que ocorre somente no Brasil (KATINAS, 1996; MONGE, 2014). No Nordeste, ocorre nos

estados da Bahia e Piauí, e no Sudeste, em Minas Gerais e São Paulo, ocorrendo também nos domínios da Caatinga e Mata Atlântica (MONGE, 2014).

Segundo FRANCO (2014), a espécie *Trixis vauthieri* (Figura 4 e 4A) foi encontrada florida no mês de junho, em áreas de cerrado rupestre e campo rupestre, em afloramentos rochosos, e em fendas de rocha, e também em borda de mata, em beira de estrada.

Trixis vauthieri foi previamente submetida a um estudo fitoquímico por BOHLMANN *et al.* (1981), onde foram isolados 24 compostos de raízes e partes aéreas, principalmente flavonóides e terpenóides.

Em uma triagem biológica de plantas do Cerrado, ZANI (1995) descobriu que o extrato bruto de *Trixis vauthieri*, foi capaz de matar o protozoário *Trypanosoma cruzi* presente no sangue de camundongos experimentalmente infectados. A espécie *T. vauthieri* tem a capacidade de produzir trixol, um composto com ação tripanocida.



Figura 4 e 4A: Partes aéreas (folhas e flores) de *Trixis vauthieri*. Fonte: Acervo pessoal

2.6. Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OEs) de plantas também têm sido pesquisados, por possuírem componentes odoríferos e metabólitos secundários que podem ser separados dos tecidos das plantas através de destilação (ISMAN, 2000). Vários óleos essenciais foram descritos por produzir efeito agudo tóxico contra insetos (HUMMELBRUNNER; ISMAN, 2001). Compostos específicos isolados de extratos/óleos essenciais de plantas já foram testados para fumigação (RAJENDRAM; SRIRANJINI, 2008).

Óleos essenciais são combinações voláteis, naturais, complexas, caracterizadas por um odor forte, formados por metabólitos secundários de plantas aromáticas. São misturas naturais que podem conter aproximadamente 20 a 60 componentes em concentrações diferentes. Caracterizam-se por apresentar 2 ou 3 constituintes majoritários que compõem 20 a 70% do óleo e o constituinte majoritário, em geral, é o responsável pela atividade do óleo (BAKKALI *et al.*, 2008). O termo óleo essencial foi definido no século XVI por Paracelso, médico e alquimista suíço (SIMÕES, 2003).

Os OEs são originados do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa. São compostos de hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpenos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos contendo enxofre, apresentando diferentes concentrações. Entre esses compostos destacam-se os fenilpropanóides, preponderando os terpenóides (DABAGUE, 2008).

Estes materiais também são conhecidos por óleos etéreos e são líquidos oleosos, aromáticos obtidos a partir de material vegetal (flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutas e raízes) (BURT, 2004). Podem ser extraídos de plantas através da técnica de arraste a vapor, na grande maioria das vezes, e também pela prensagem do pericarpo de frutos cítricos, que no Brasil dominam o mercado de exportação (BIZZO *et al.*, 2009). Os óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor e seus derivados podem ser utilizados como repelentes e são considerados como uma alternativa aos convencionais pesticidas químicos sintéticos, devido ao reduzido risco a saúde e da sua biodegradabilidade (VARONA *et al.*, 2010).

Estima-se que 3000 OEs são conhecidos, dos quais cerca de 300 são importantes comercialmente, destinados principalmente para o mercado de flavorizantes e fragrâncias (BURT, 2004). Atualmente, os óleos essenciais, além de serem utilizados

como conservantes naturais e fragrâncias em produtos cosméticos, novas aplicações como conservantes de alimentos, pesticidas naturais em agricultura orgânica e inseticidas estão surgindo. Tais aplicações são possíveis devido às propriedades químicas e biológicas que esses óleos apresentam (RODRÍGUEZ-ROJO *et al.*, 2012).

Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição pode variar conforme a localização (a exemplo, o óleo das cascas de canela é rico em aldeído cinâmico, enquanto, as folhas e raízes dessa planta são ricas, respectivamente, em eugenol e cânfora). Os óleos constituem os elementos essenciais contidos em muitos órgãos vegetais e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (BIZZO *et al.*, 2009).

O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo influenciam na composição química dos óleos essenciais. A temperatura, umidade relativa do ar, duração total da exposição ao sol e o regime de ventos exercem influência direta, principalmente nas espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem de óleos na superfície. A variabilidade na produção e teor de óleos essenciais é conhecida por ser afetada por fatores ambientais tais como luz, disponibilidade de nutrientes, estação do ano, período do dia, ciclo e parte da planta (POTZERNHEIM *et al.*, 2006).

São poucos os estudos científicos sobre as ações biológicas dos OEs. Até então, tem sido estabelecido, cientificamente, que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Os OEs são voláteis, ou seja, durante o preparo de formulações é necessário encontrar a sua concentração ideal com intuito de minimizar a evaporação e proteger o óleo da luz, oxidação e altas temperaturas. Para obter esse resultado, as emulsões óleo-água (O/A) são uma das formulações preferidas para os OEs (RODRÍGUEZ-ROJO *et al.*, 2012).

2.6.1 Métodos de obtenção de óleos essenciais

Os OEs podem ser obtidos através de diferentes processos, dependendo da localização no vegetal, quantidade e das características requeridas para o produto final. Os processos usuais são: prensagem ou expressão, destilação por arraste a vapor, extração com solventes orgânicos (extração por Soxhlet) e com gás carbônico (CO₂)

supercrítico. Dentre as técnicas citadas, destacam-se a destilação por arraste a vapor e extração com solventes orgânicos, por serem de extrema simplicidade e reduzido custo (BUSATTA, 2006). O método de prensagem faz uso de prensas hidráulicas. Após a extração é necessária a utilização de solventes orgânicos para separar o óleo presente na torta obtida após a prensagem. Os solventes mais utilizados são éter etílico, diclorometano e hexano, porém esses solventes também extraem outros compostos lipofílicos além dos OEs. É necessário ressaltar que mesmo após a separação do solvente do óleo podem ser encontrados resíduos de solvente contaminando o mesmo.

O processo de extração de OEs por arraste a vapor é o mais utilizado. Tal método consiste em colocar o material vegetal em um compartimento o qual pode ser uma dorna ou um balão de fundo redondo. O vapor de água ao passar pelo material vegetal extrai os compostos voláteis da planta. O vapor condensa ao chegar ao sistema de condensação sendo assim possível coletar o óleo extraído no sistema de decantação. O óleo essencial, assim que obtido, é colocado em funil de decantação para que haja uma separação minuciosa da água através da diferença de densidade e imiscibilidade das fases. O método de extração utilizando o aparelho de Clevenger (Figura 5) é um exemplo de processo de arraste a vapor (CASTRO *et al.*, 2005).

A extração por CO₂ supercrítico tem elevado custo devido ao fato de trabalhar com altas pressões. Para a extração o CO₂ é liquefeito através de compressão e em seguida aquecido a 31°C. Nessa temperatura o CO₂ atinge um estado no qual sua viscosidade é igual à de um gás, mas a capacidade de dissolução é semelhante à de um líquido. Após a extração é realizada a conversão do CO₂ ao estado gasoso novamente o que resulta em sua total eliminação. Como vantagens da extração por CO₂ supercrítico pode-se notar a não utilização de solventes orgânicos, sendo assim o produto final obtido é mais puro já que não há traços de solvente após a extração.

Na extração por Soxhlet são utilizados solventes orgânicos para extração preferencialmente apolares. A desvantagem é que os solventes apolares podem extrair também outros compostos lipofílicos além do OE. Na extração o solvente passa através de um cartucho ou compartimento contendo o vegetal, produzindo uma solução e levando-a consigo até o balão de aquecimento. Como o solvente está sendo destilado, o soluto vai se concentrando no balão de aquecimento. Tal método é útil quando a diferença de solubilidade do soluto em ambos os solventes não é muito grande.

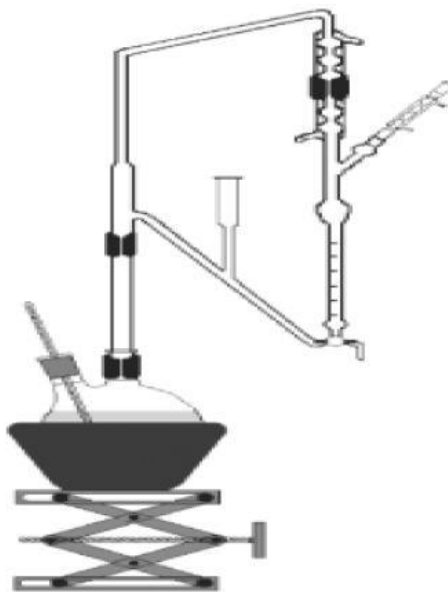


Figura 5. Representação do aparelho de Clevenger.

2.6.2 Influência circadiana na composição química dos óleos essenciais

A composição química dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos, porém, outros fatores, decorrentes da interação planta e ambiente, como planta e microrganismos, planta e planta, também podem gerar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários (MORAIS, 2009).

Estudos realizados afirmam que diversos fatores ambientais, como clima, solo, estações do ano, forma de plantio, adubação, uso de agrotóxicos, irrigação, tempo e condições ambientais, material da colheita fresco ou seco, técnica de extração, padrões de variação geográfica podem afetar a composição química dos óleos essenciais (FRANCO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005; APEL *et al.*, 2006; ASEKUN *et al.*, 2006; CARVALHO FILHO *et al.*, 2006; POTZERNHEIM *et al.*, 2006; TELCI *et al.*, 2006; SEFIDKON *et al.*, 2007).

Outro fator ambiental que contribui na composição química dos óleos essenciais é o regime circadiano, que se refere ao tempo de coleta da planta ao longo do dia. Assim a coleta torna-se, portanto, o ponto crítico, pois é necessário que se defina o momento ideal para obter maior quantidade de óleo essencial e do princípio ativo desejado, visto que não apenas os fatores climáticos interferem na biossíntese dos óleos

essenciais, mas também o estágio de desenvolvimento da planta interfere na produção dos metabólitos secundários (TAVEIRA *et al.*, 2003).

3. JUSTIFICATIVA

Atualmente, a LV é considerada uma das doenças tropicais prioritárias pela OMS devido à sua alta expansão geográfica proporcionada pela adaptação do vetor. No Brasil, o controle direcionado ao vetor, tem sido realizado através da aplicação de inseticidas piretróides sintéticos aplicados no domicílio e peridomicílio. Entretanto, as medidas atuais de controle não têm apresentado a eficácia desejada, apesar do esforço realizado na execução desta e de outras medidas descritas pelo Programa de Vigilância e Controle da LV. Diante disso, há a necessidade de formas de controle alternativas.

Diversas plantas com propriedades inseticidas têm se mostrado promissoras no controle de ampla variedade de insetos. Desta forma, ao se avaliar a ação de produtos naturais de plantas no controle de flebotomíneos, pretende-se promover a redução da incidência da doença, descobrindo novos produtos que sejam eficazes, seguros, menos dispendiosos do que os atuais e tendo boa aceitabilidade e disponibilidade.

Dentre tantas espécies, da rica família Asteraceae, temos a *Trixis vauthieri*, espécie pouco estudada, que pode ser promissora na busca de compostos inseticidas já

que possui metabolitos secundários, principalmente flavonóides e terpenóides, compostos com comprovada ação inseticida a diversos vetores.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial inseticida de óleo essencial de *Trixis vauthieri* sobre a mortalidade de flebotomíneos adultos selvagens da espécie *Lutzomyia longipalpis*, em condições de laboratório.

4.2. Objetivos específicos

- Extrair o óleo essencial das folhas de *Trixis vauthieri* e calcular seu rendimento;
- Identificar as classes de metabólitos secundários presentes nos óleos essenciais obtidos;

- Avaliar a interferência do ritmo circadiano no rendimento do óleo essencial e na possível taxa de mortalidade sobre flebotomíneos selvagens da espécie *Lu. longipalpis*;
- Avaliar o efeito adúlticida do óleo essencial sobre flebotomíneos selvagens da espécie *Lu. longipalpis*;

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material vegetal

5.1.1 Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de indivíduos adultos de *T. vauthieri* foram coletadas no Campus JK da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (S18°12'1" - W43°34'40"), localizado no município de Diamantina/MG, em junho de 2019. A identificação taxonômica e exsicatas foram depositadas e encontram-se em processo de registro no Herbário DIAM da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (Campus JK).

As coletas foram realizadas em três horários distintos (7h 00min, 13h 00min e 19h 00min), a fim de avaliar a interferência do ritmo circadiano no rendimento do óleo essencial e na possível taxa de mortalidade dos flebotomíneos.

5.1.2 Extração do óleo essencial

As extrações do óleo essencial das folhas frescas de indivíduos adultos de *T. vauthieri* foram realizadas através de arraste a vapor, com uso de aparelho tipo Clevenger (Figura 6).

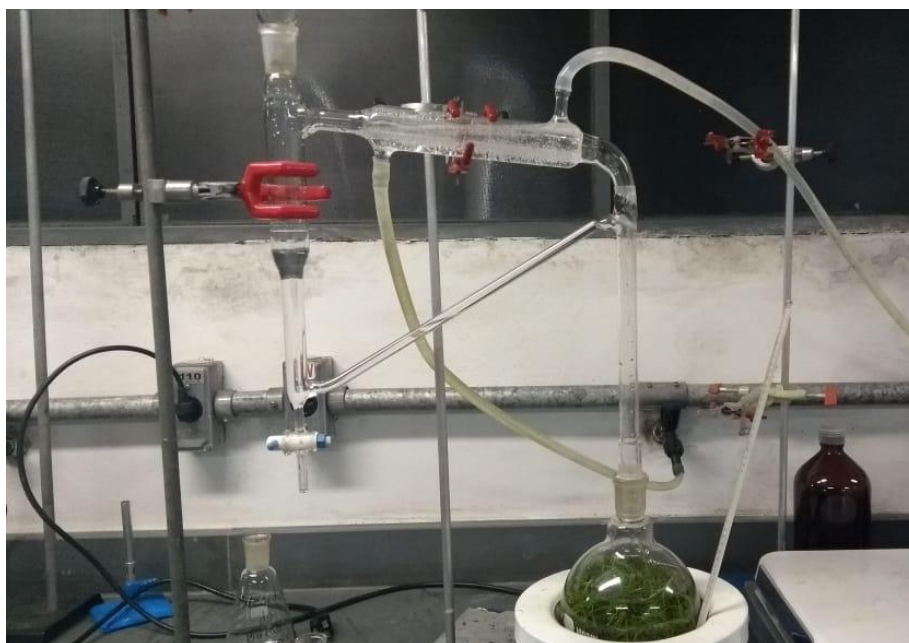


Figura 6: Extração de OE por arraste a vapor, com uso de aparelho tipo Clevenger.

Fonte: acervo pessoal.

Foram realizadas três coletas do material vegetal, e para cada coleta foram realizadas quatro extrações de uma hora cada. A tabela abaixo demonstra a massa vegetal utilizada em cada extração.

Tabela 1: Massa vegetal de *Trixis vauthieri* obtida por horário de coleta utilizada em cada extração de óleo essencial.

Nº de extrações	Horário de coleta		
	7h	13 h	19 h
1	101,15 g	101,01 g	101,83 g
2	101,62 g	102,28 g	101,05 g
3	100,64 g	101,00 g	102,09 g
4	102,20 g	100,86 g	100,10 g
TOTAL	405,61 g	405,15 g	405,07 g

Após cada extração, o hidrolato (água + óleo essencial) foi recolhido e levado para o funil de separação (Figura 7), onde foi submetido à extração por solvente, utilizado o éter etílico PA, com o intuito de separar o óleo essencial da água.

Para evitar umidade no produto final, foi adicionado sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) à amostra, que foi levada para o agitador magnético por 10 minutos e depois filtrado com auxílio de algodão.



Figura 7: Funil de separação contendo éter e óleo essencial. Fonte: acervo pessoal

Por fim, cada amostra foi levada para o rotaevaporador na temperatura de 30 °C, onde ocorreu a destilação do solvente. O óleo essencial foi recolhido, armazenado ao abrigo da luz, sendo mantido refrigerado até o momento do uso.

5.1.3. Rendimento dos óleos essenciais

O cálculo do rendimento foi feito pela seguinte fórmula:

$$R (\%) = \frac{\text{Quantidade de óleo obtida na extração} \times 100}{\text{Quantidade de planta fresca pesada}}$$

5.2 Prospecção fitoquímica dos óleos essenciais

A investigação das classes de metabólitos secundários presentes nos OEs foi realizada de acordo com a metodologia de prospecção preliminar proposta por MATOS (1997), que consiste na realização de reações cromogênicas e de precipitações para a identificação de determinados grupos funcionais. Os OEs passaram por uma triagem para a identificação das seguintes classes de compostos orgânicos: triterpenos e/ou esteroides, taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas e cumarinas. Para cada teste foi utilizada uma alíquota de aproximadamente 2,0 mg de cada óleo de acordo com o horário da coleta. Com exceção do teste para as cumarinas, que utilizou placas cromatográficas. Os demais testes foram realizados em tubos de ensaios.

A descrição da metodologia está disposta a seguir, sendo esta diferente para cada classe investigada:

- A presença de triterpenos e/ou esteroides foi identificada pelo aparecimento de cores rosa, azul ou verde após uma reação entre uma alíquota do óleo essencial diluída em clorofórmio com o reagente de Liebermann-Burchard (2,0 ml de anidrido acético e duas gotas de ácido sulfúrico concentrado).
- Para a detecção de taninos, os óleos essenciais foram diluídos em água destilada e solução de cloreto férrico (FeCl_3) a 10%. A coloração azulada como resultado da oxidação da substância indica a presença de taninos hidrolisáveis, enquanto a cor verde acusa a presença de taninos condensados.
- Para a detecção de flavonóides uma alíquota dos óleos essenciais foi diluída em 2,0 ml de água, logo após foi adicionado hidróxido de amônia até a obtenção

de pH 11. O aparecimento de cor amarela aponta a presença de flavonas, flavonóis e xantonas, enquanto a coloração vermelho-púrpura revela que o extrato contém chalconas e auronas. É possível ainda identificar flavononas na amostra quando a reação resultar em coloração vermelho-laranja.

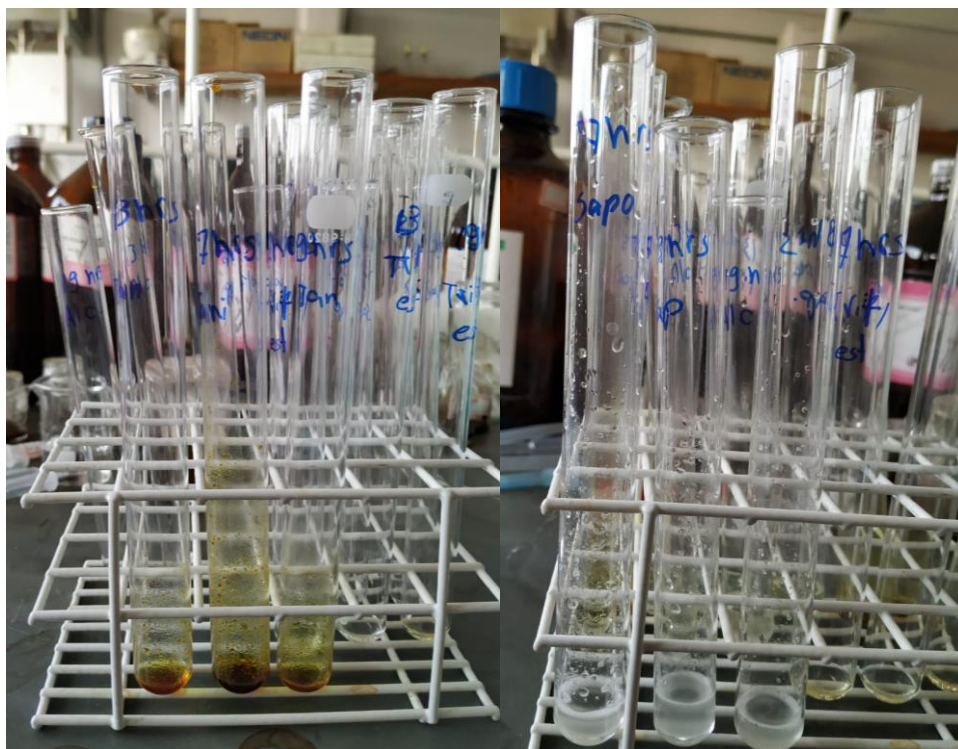


Figura 8: Teste para investigação de metabólitos secundários nos óleos essenciais de *Trixis vauthieri*.
Fonte: Acervo pessoal.

- Para averiguar a presença de alcaloides, os óleos essenciais foram diluídos em 2,0 ml de água e misturados ao reagente Dragendorff (iodo-bismutato de potássio) e a substância mostra-se presente quando há a formação de precipitado floculoso na solução.
- A presença de saponinas foi averiguada após uma alíquota dos óleos essenciais ser adicionada a 2,0 ml de água destilada em tudo de ensaio, que foi agitado vigorosamente. A formação de espuma persistente é indicativa para a presença de saponinas nas amostras.
- Para a verificação de cumarinas, uma pequena quantidade dos óleos essenciais foi exposta em placa com sílica e borrifada com uma mistura 10% (p/v) de hidróxido de sódio e água destilada. A revelação da placa sob luz UV (360 nm) indica a presença de cumarinas com o aparecimento de fluorescência azulada. Todos os testes foram validados através da comparação da solução reativa com um teste em branco.

5.3 Flebotomíneos

5.3.1 Local de coleta

Os flebotomíneos utilizados nos bioensaios foram coletados em Jambreiro (18°16'38,87832" S - 43°35'24,3906" W), comunidade rural do município de Diamantina/MG. As armadilhas luminosas do tipo HP (PUGEDO *et al.*, 2005) foram expostas no peridomicílio de uma residência ao final da tarde e retirada pela manhã (Figura 9).



Figura 9: Armadilha HP adaptada usada para a captura de flebotomíneos exposta em galinheiro. Fonte: acervo pessoal

As coletas dos animais selvagens para ensaio foram realizadas dois dias antes do experimento. O local de exposição foi escolhido pelas características do microambiente, formado pela presença de animais domésticos e matéria orgânica. Duas armadilhas foram colocadas no interior de um galinheiro que se situava próximo ao domicílio.

5.3.2 Manutenção em laboratório

Os flebotomíneos capturados foram levados ao Laboratório de Parasitologia do Campus JK/UFVJM, onde permaneceram em repouso dentro de gaiolas de contenção de

tecido organza, por 24 horas até o início do experimento. Algodões embebidos com água e solução açucarada foram colocados sobre a gaiola, proporcionando umidade e fonte de açúcar para os animais.

Parte dos insetos foi retirada para identificação específica segundo a classificação proposta por YOUNG & DUNCAN (1994).

5.4. Avaliação da atividade inseticida

Os flebotomíneos foram transferidos das gaiolas, com auxílio de um capturador manual, para potes de plástico translúcido com papel filtro na parte superior e inferior. Cada pote continha um número de 20 espécimes de *Lu. longipalpis*, sendo 10 machos e 10 fêmeas, totalizando 720 espécimes para o bioensaio. Na parte lateral dos potes foi feito um orifício para permitir a entrada de oxigênio, onde também foram adicionados algodões embebidos com água e solução açucarada (Figura 10 e 10A).



Figuras 10 e 10A: Potes para a realização dos ensaios para avaliação inseticida dos óleos essenciais de *Trixis vauthieri* sobre *Lu. longipalpis*. Fonte: acervo pessoal.

Foi realizado um total de três ensaios, destinado para a avaliação da atividade biológica para cada horário de coleta. Os óleos essenciais de *Trixis vauthieri* foram diluídos em solução de polisorbato 80 (Tween®) a 3% para a obtenção das concentrações de teste: 5, 10 e 20 mg.mL⁻¹. Também constituíram o experimento três

grupos controle: positivo (cipermetrina 196 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), negativo (água destilada) e Tween® 80 a 3%. O controle positivo representa o inseticida utilizado comercialmente para o controle químico de flebotomíneos; a água permite a avaliação de possíveis mortes naturais e o controle feito com Tween® teve como objetivo estimar se houve interferência da substância na mortalidade registrada pelos extratos.

Os testes foram realizados em triplicatas e 600 μL de cada tratamento foram adicionados no papel filtro, sendo 300 μL na parte inferior e 300 μL na parte superior dos potes. As observações de mortalidade foram registradas após 1, 2, 4, 16, 24, 48 e 72 horas do início da aplicação. Os flebotomíneos foram identificados como mortos quando se apresentavam deitados sobre a superfície e não se movimentavam quando estimulados por toques no pote.

5.5 Análise de dados

Os dados foram analisados através das porcentagens das médias entre as triplicatas. Os dados foram transformados pela fórmula $(x + 1)^{0.5}$, submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Scott-Knott com nível de significância de 0,05% usando o programa SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2014).

6. RESULTADOS

6.1. Rendimento final dos óleos essenciais

O valor percentual do rendimento do óleo essencial de *T. vauthieri* extraído da coleta das 7h 00mim foi de 2,59%. Para a coleta das 13h 00mim obtivemos um rendimento de 3,83%, enquanto que para a coleta das 19h 00mim foi observado um rendimento menor, de apenas 1,95%.

6.2. Identificação das classes de metabólitos secundários dos óleos essenciais

Os testes para a investigação da composição dos metabólitos secundários dos óleos essenciais das folhas frescas de *Trixis vauthieri* foram baseados em colorimetria, precipitação e formação de espuma, conforme pode ser visualizado na Tabela 2.

Tabela 2: Composição fitoquímica dos óleos essenciais de *T. vauthieri* quanto às classes de metabólitos secundários.

Classes	7 h	13 h	19 h
Triterpenos e/ou Esteróides	+	+	+
Taninos	+ ^a - ^b	+ ^a - ^b	+ ^a - ^b
Flavonóides	+ ^c	+ ^c	+ ^c
Alcalóides	+	+	+
Saponinas	+	+	+
Cumarinas	+	+	-

(+) presente; (-) ausente; (a) taninos condensados; (b) taninos hidrolisáveis; (c) flavonas, flavonóis e xantonas;

No teste com o reagente de Liebermann-Burchard, a visualização de coloração verde indicou a presença de triterpenos e/ou esteróides nos três óleos essenciais, entretanto ficou evidente que no óleo essencial extraído da amostra coletada às 7h 00 mim a coloração verde foi mais acentuada em comparação aos demais horários de coleta.

A presença de taninos condensados foi identificada nos três óleos pela manifestação de cor verde após a reação com solução de cloreto férrico. Taninos hidrossolúveis não foram identificados nas amostras.

Flavonóides nos óleos essenciais foram verificados a partir da alcalinização de solução aquosa das amostras com hidróxido de amônia. A cor amarela indicou a presença de flavonas, flavonóis e xantonas no extrato nas três amostras, sendo que na amostra da coleta das 7h 00mim a coloração amarela ficou mais evidente em comparação as demais amostras.

A precipitação indicou a presença de alcalóides nos óleos essenciais, quando adicionado o reagente Dragendorff nas três amostras, houve formação de precipitado floculoso, e mais uma vez a amostra da coleta das 7h 00mim, apresentou uma precipitação maior ao ser comparado com as outras duas amostras.

A agitação da solução aquosa (óleos essenciais + água destilada) mostrou que o óleo essencial das folhas frescas de *Trixis vauthieri* contém saponinas, pois resultou em formação de espuma persistente, principalmente na amostra coleta às 7h 00mim.

Após a revelação em placas cromatográficas sob a luz UV (360nm), observou-se presença de coloração azul, que indica presença de cumarinas, nas amostras coletadas às 7h 00mim e 13h 00mim.

6.4. Avaliação da mortalidade de *Lu. longipalpis*

Os óleos essenciais preparados a partir das folhas frescas de *T. vauthieri* mostraram-se tóxicas aos flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* e a toxicidade variou de acordo com as concentrações, horário da coleta do material vegetal e com o tempo de exposição. A mortalidade dos insetos foi tabulada na forma de porcentagem das médias dos dados brutos obtidos das triplicatas (Tabela 3).

O controle negativo esclareceu que os óleos essenciais foram tóxicos aos flebotomíneos, pois a mortalidade observada nesse grupo foi estatisticamente inferior.

Isso evidencia que os insetos que não foram expostos a nenhum tipo de substância tiveram maior sobrevivência durante o período do ensaio. O controle com o Tween® possibilitou a conclusão de que esta substancia não interferiu na ação dos óleos sobre os insetos, já que os resultados foram estatisticamente semelhantes ao do controle com a água (Tabela e Figura 15).

Tabela 3: Porcentagem de mortalidade de *Lu. longipalpis* em relação ao tempo de exposição ao óleo essencial de folhas frescas de *T. vauthieri*, em diferentes concentrações e horários de coleta.

Horário da coleta	Tratamento	Mortalidade (%)						
		1h	2h	4h	16h	24h	48h	72h
7 h	5 mg.ml ⁻¹	3,33 ^{aB}	3,33 ^{bB}	3,33 ^{bB}	8,33 ^{bB}	8,33 ^{dB}	26,67 ^{dB}	63,33 ^{bA}
	10 mg.ml ⁻¹	3,33 ^{aB}	5 ^{bB}	6,66 ^{bB}	11,67 ^{bB}	15 ^{dB}	35 ^{dB}	88,33^{aA}
	20 mg.ml ⁻¹	11,67 ^{aC}	26,67 ^{bC}	28,33 ^{bC}	31,67 ^{bC}	63,33 ^{bB}	76,67 ^{bB}	98,33^{aA}
13 h	5 mg.ml ⁻¹	3,33 ^{aB}	3,33 ^{bB}	5 ^{bB}	5 ^{bB}	8,33 ^{dB}	21,67 ^{dB}	70 ^{bA}
	10 mg.ml ⁻¹	3,33 ^{aB}	6,67 ^{bB}	8,33 ^{bB}	15 ^{bB}	16,67 ^{dB}	31,67 ^{dB}	73,33 ^{bA}
	20 mg.ml ⁻¹	3,33 ^{aB}	6,67 ^{bB}	15 ^{bB}	25 ^{bB}	33,33 ^{cB}	46,67 ^{cB}	81,67^{aA}
19 h	5 mg.ml ⁻¹	5 ^{aC}	11,67 ^{bC}	15 ^{bC}	21,66 ^{bC}	33,33 ^{cC}	51,67 ^{cB}	83,33^{aA}
	10 mg.ml ⁻¹	1,67 ^{aC}	10 ^{bC}	16,66 ^{bC}	25 ^{bC}	33,33 ^{cC}	51,67 ^{cB}	90^{aA}
	20 mg.ml ⁻¹	1,67 ^{aC}	10 ^{bC}	21,67 ^{bC}	26,66 ^{bC}	46,67 ^{cB}	71,67 ^{bA}	95^{aA}
Controle	Água	0 ^{aA}	0 ^{bA}	1,66 ^{bA}	6,66 ^{bA}	8,33 ^{dA}	18,33 ^{dA}	23,33 ^{cA}
	Tween	0 ^{aB}	5 ^{bB}	5 ^{bB}	15 ^{bB}	25 ^{cA}	26,66 ^{dA}	30 ^{cA}
	Cipermetrina	23,33 ^{aA}	66,66 ^{aB}	83,33 ^{aA}	100 ^{aA}	100 ^{aA}	100 ^{aA}	100^{aA}
CV (%)		49,18						

Letras minúsculas comparam os valores nas colunas. Letras maiúsculas comparam os valores nas linhas. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. As letras em ordem alfabética classificam os valores em ordem crescente. Foi considerado $p < 0,05$ pelo teste de análise de variância seguido por Scott-Knott. Valores destacados em negrito representam resultados estatisticamente semelhantes entre si.

De modo geral, durante as primeiras quatro horas de experimento não houve mortalidade significativa dos animais expostos aos óleos e aos controles negativo e Tween 80. No entanto, a partir de 16 horas de exposição, a taxa de mortalidade de *Lu. longipalpis* começou a apresentar variação positiva nesses grupos (Figura 11 e Tabela 3). Em compensação, observa-se que a α -cipermetrina, controle positivo, inicia sua ação a partir da primeira hora de experimento, atingindo uma taxa superior de 50% já na segunda hora de exposição.

Dos óleos essenciais extraídos, o da coleta das 7h 00mim na concentração de 20 mg.mL⁻¹ foi o mais tóxico aos flebotomíneos, alcançando 98,33% de mortalidade em 72h de experimento (Tabela 3). Entretanto, o óleo essencial extraído da coleta realizada as 19h 00mim, as três concentrações (5, 10 e 20 mg.mL⁻¹) atingiram, respectivamente, 83,33%, 90% e 95% de mortalidade em 72h, sendo assim, semelhante estatisticamente ao controle positivo α -cipermetrina. Para a coleta de 13h 00mim, a concentração de 20

mg.mL⁻¹, atingiu ao final de 72h, 81,67% de mortalidade, sendo também estatisticamente semelhante ao controle positivo.

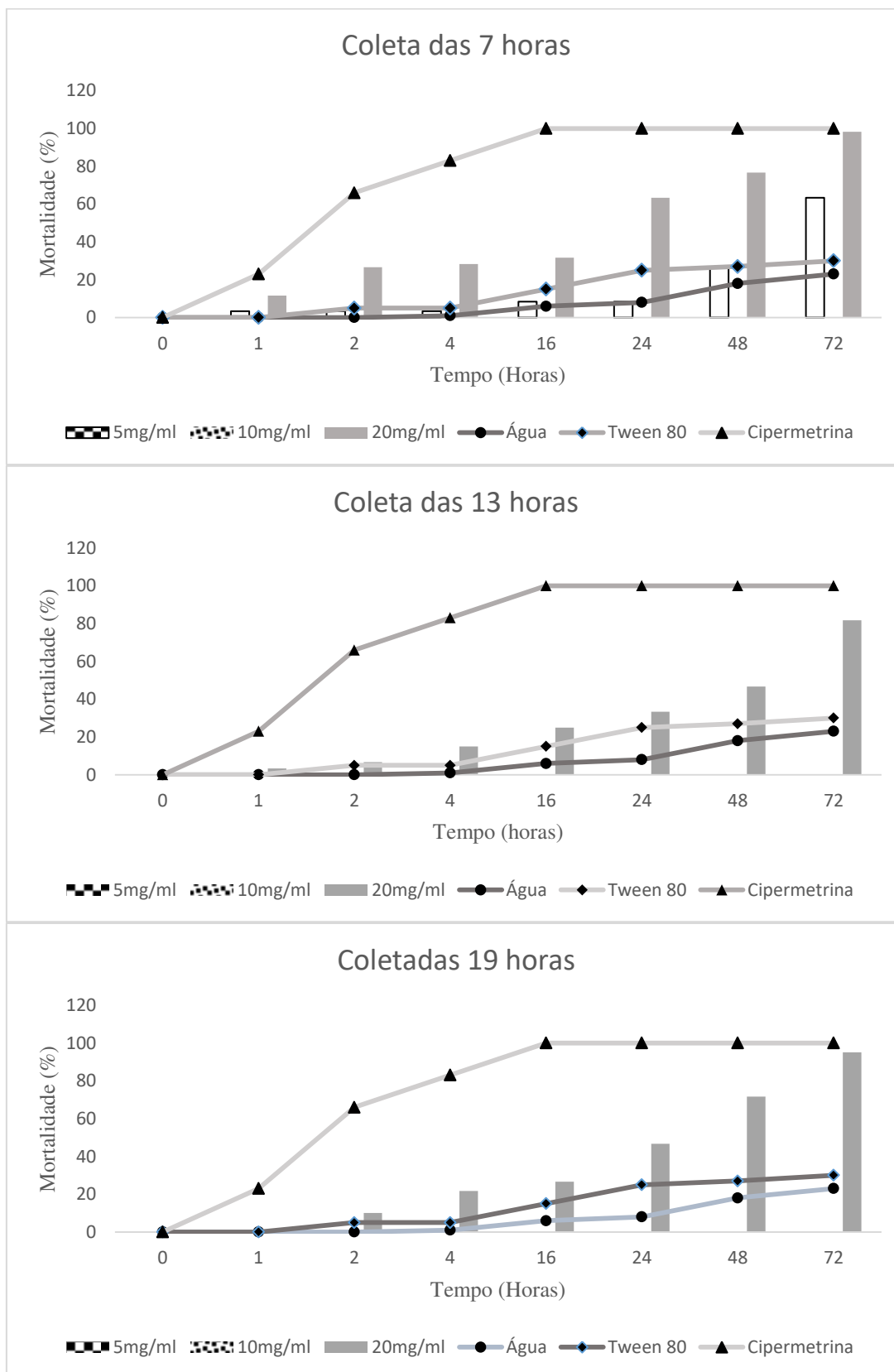


Figura 11: Porcentagem de mortalidade de *Lu. longipalpis* em relação ao tempo de exposição ao óleo essencial de folhas frescas de *T. vauthieri*, em diferentes concentrações e horários de coleta.

6.4.1 Avaliação da mortalidade em machos e fêmeas de *Lu. longipalpis*

Os óleos essenciais de *T. vauthieri* apresentaram toxicidade para adultos de *Lu. longipalpis*, entretanto houve diferença na mortalidade entre machos e fêmeas. Foi possível observar que em 72h de experimento, a mortalidade de machos foi estatisticamente semelhante ao controle positivo, para todas as concentrações e em todos horários de coleta (Tabela 4, Figura 12). Dessa forma, podemos inferir que os machos de *Lu. longipalpis* foram mais sensíveis ao óleo essencial de *T. vauthieri*.

Tabela 4: Porcentagem de mortalidade de *Lu. longipalpis* (machos) em relação ao tempo de exposição ao óleo essencial de folhas frescas de *T. vauthieri*, em diferentes concentrações e horários de coleta.

Horário da coleta	Tratamento	Mortalidade (%)						
		1h	2h	4h	16h	24h	48h	72h
7 h	5 mg.ml ⁻¹	3,33 ^{aB}	3,33 ^{bB}	3,33 ^{bB}	13,33 ^{bB}	13,33 ^{dB}	30 ^{cB}	66,66^{aA}
	10 mg.ml ⁻¹	6,66 ^{aB}	10 ^{bB}	10 ^{bB}	16,66 ^{bB}	20 ^{dB}	33,33 ^{cB}	93,33^{aA}
	20 mg.ml ⁻¹	16,66 ^{aC}	30 ^{bC}	30 ^{bC}	33,33 ^{bC}	70 ^{bB}	80 ^{aB}	100^{aA}
13 h	5 mg.ml ⁻¹	3,33 ^{aB}	3,33 ^{bB}	3,33 ^{bB}	3,33 ^{bB}	10 ^{dB}	23,33 ^{cB}	73,33^{aA}
	10 mg.ml ⁻¹	3,33 ^{aB}	10 ^{bB}	10 ^{bB}	23,33 ^{bB}	23,33 ^{dB}	36,66 ^{cB}	83,33^{aA}
	20 mg.ml ⁻¹	6,66 ^{aD}	10 ^{bD}	16,66 ^{bD}	36,66 ^{bC}	43,33 ^{cC}	60 ^{bB}	86,66^{aA}
19 h	5 mg.ml ⁻¹	6,66 ^{aC}	10 ^{bC}	16,66 ^{bC}	23,33 ^{bC}	36,66 ^{cC}	60 ^{bB}	86,66^{aA}
	10 mg.ml ⁻¹	0 ^{aD}	10 ^{bD}	20 ^{bD}	33,33 ^{bC}	43,33 ^{cC}	56,66 ^{bB}	60^{aA}
	20 mg.ml ⁻¹	0 ^{aD}	6,66 ^{bD}	23,33 ^{bC}	33,33 ^{bC}	53,33 ^{bB}	76,66 ^{aB}	100^{aA}
Controle	Água	0 ^{aA}	0 ^{bA}	0 ^{bA}	6,66 ^{bA}	10 ^{dA}	23,33 ^{cA}	26,66 ^{bA}
	Tween	0 ^{aB}	3,33 ^{bB}	3,33 ^{bB}	16,66 ^{bB}	33,33 ^{cA}	36,66 ^{cA}	40 ^{bA}
	Cipermetrina	20 ^{aC}	66,66 ^{aB}	100 ^{aA}	100 ^{aA}	100 ^{aA}	100 ^{aA}	100^{aA}
CV (%)	45,54							

Letras minúsculas comparam os valores nas colunas. Letras maiúsculas comparam os valores nas linhas. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. As letras em ordem alfabética classificam os valores em ordem crescente. Foi considerado $p < 0,05$ pelo teste de análise de variância seguido por Scott-Knott. Valores destacados em negrito representam resultados estatisticamente semelhantes entre si.

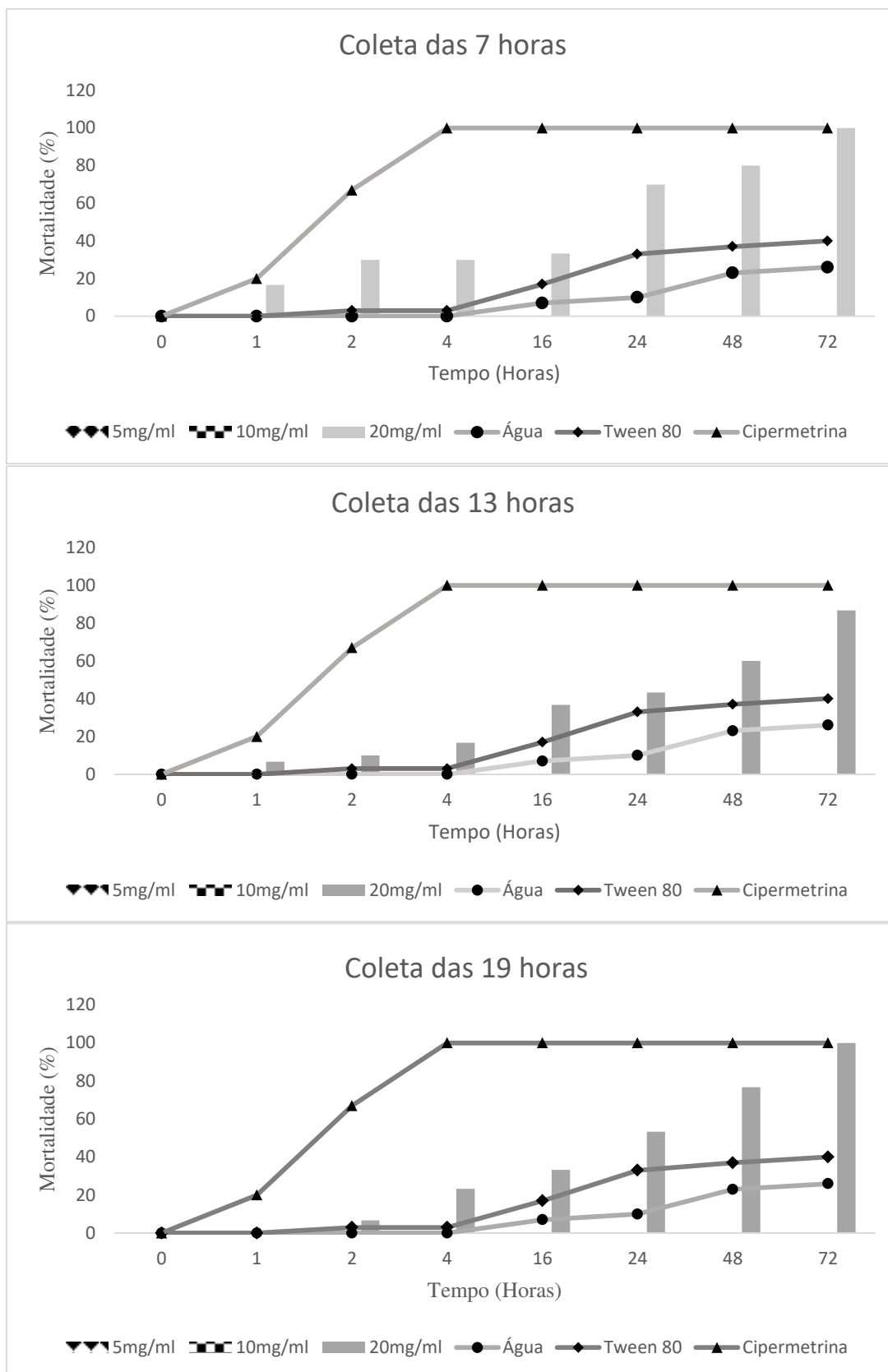


Figura 12: Porcentagem de mortalidade de *Lu. longipalpis* (machos) em relação ao tempo de exposição ao óleo essencial de folhas frescas de *T. vauthieri*, em diferentes concentrações e horários de coleta.

Em contrapartida, fêmeas em 72 horas de experimento apresentaram mortalidade estatisticamente semelhante ao controle positivo, apenas nos óleos essenciais da coleta de 7h 00min nas concentrações de 10 e 20 mg.ml⁻¹, com mortalidade de 83,33 e 96,66 %, respectivamente (Tabela 5, Figura 13) e no óleo essencial extraído da coleta de 19h 00min nas três concentrações testadas (5, 10 e 20 mg.ml⁻¹). Assim, podemos inferir que as fêmeas são menos sensíveis ao óleo essencial de *T. vauthieri* comparado aos machos.

Tabela 5: Porcentagem de mortalidade de *Lu. longipalpis* (fêmeas) em relação ao tempo de

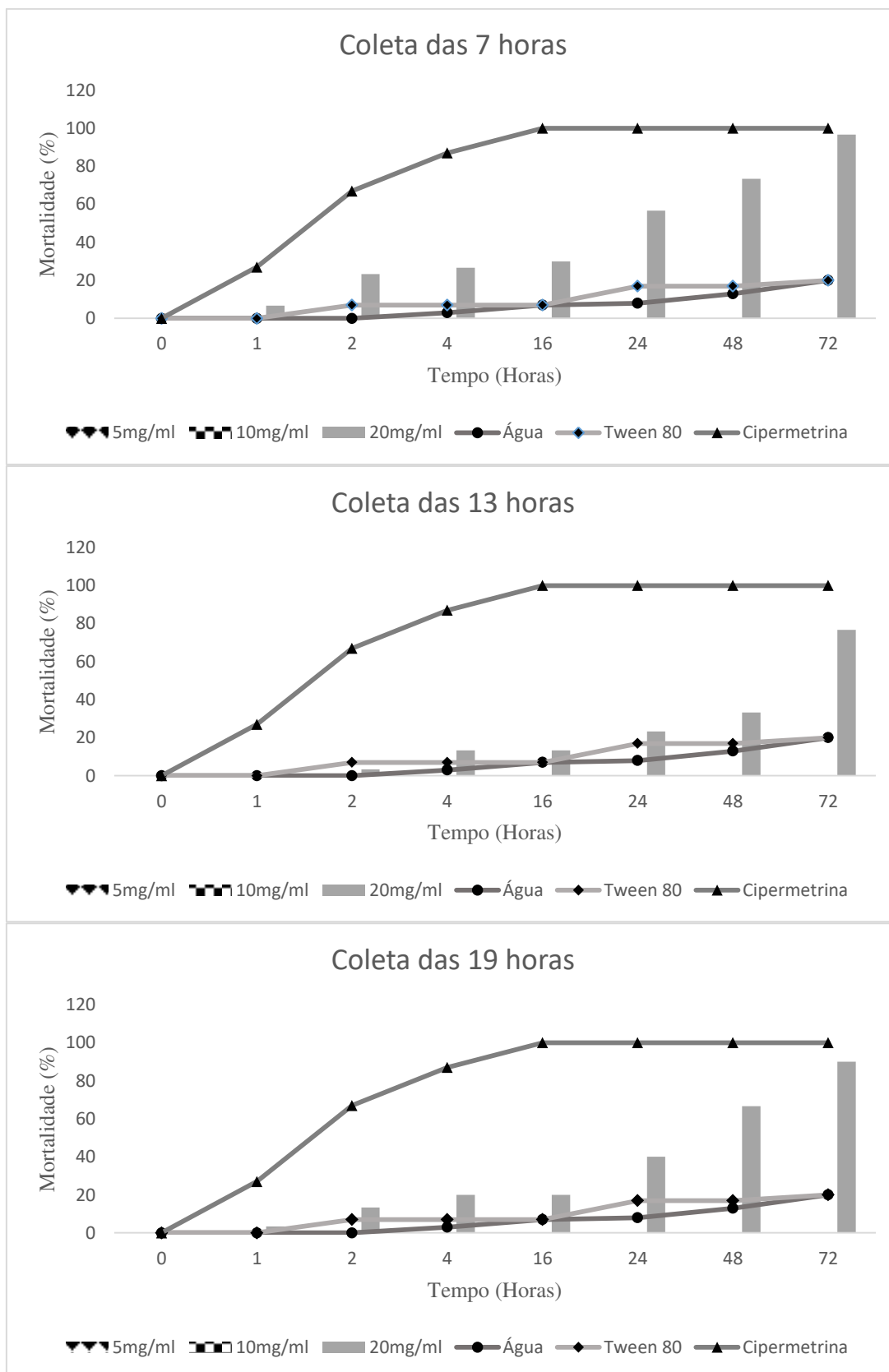
Horário da coleta	Tratamento	Mortalidade (%)						
		1h	2h	4h	16h	24h	48h	72h
7 h	5 mg.ml ⁻¹	3,33 ^{aB}	3,33 ^{bB}	3,33 ^{bB}	3,33 ^{bB}	3,33 ^{cB}	23,33 ^{cB}	60 ^{bA}
	10 mg.ml ⁻¹	0 ^{aC}	0 ^{bC}	3,33 ^{bC}	6,66 ^{bC}	10 ^{cC}	36,66 ^{cB}	83,33^{aA}
	20 mg.ml ⁻¹	6,66 ^{aC}	23,33 ^{bC}	26,66 ^{bC}	30 ^{bC}	56,66 ^{bB}	73,33 ^{bB}	96,66^{aA}
13 h	5 mg.ml ⁻¹	3,33 ^{aB}	3,33 ^{bB}	6,66 ^{bB}	6,66 ^{bB}	6,66 ^{cB}	20 ^{cB}	66,66 ^{bA}

exposição ao óleo essencial de folhas frescas de *T. vauthieri*, em diferentes concentrações e horários de coleta.

	10 mg.ml ⁻¹	3,33 ^{aB}	3,33 ^{bB}	6,66 ^{bB}	6,66 ^{bB}	10 ^{cB}	26,66 ^{cB}	63,33 ^{bA}
	20 mg.ml ⁻¹	0 ^{aB}	3,33 ^{bB}	13,33 ^{bB}	13,33 ^{bB}	23,33 ^{cB}	33,33 ^{cB}	76,66 ^{bA}
19 h	5 mg.ml ⁻¹	3,33 ^{aB}	13,33 ^{bB}	13,33 ^{bB}	20 ^{bB}	30 ^{cB}	43,33 ^{cB}	80^{aA}
	10 mg.ml ⁻¹	3,33 ^{aC}	10 ^{bC}	13,33 ^{bC}	16,66 ^{bC}	23,33 ^{cC}	46,66 ^{cB}	86,66^{aA}
	20 mg.ml ⁻¹	3,33 ^{aB}	13,33 ^{bB}	20 ^{bB}	20 ^{bB}	40 ^{cB}	66,66 ^{bA}	90^{aA}
Controles	Água	0 ^{aA}	0 ^{bA}	3,33 ^{bA}	6,66 ^{bA}	6,66 ^{cA}	13,33 ^{cA}	20 ^{cA}
	Tween	0 ^{aA}	6,66 ^{bA}	6,66 ^{bA}	6,66 ^{bA}	16,66 ^{cA}	16,66 ^{cA}	20 ^{cA}
	Cipermetrina	26,66 ^{aB}	66,66 ^{aA}	86,66 ^{aA}	100 ^{aA}	100 ^{aA}	100 ^{aA}	100^{aA}
CV (%)		60,84						

Letras minúsculas comparam os valores nas colunas. Letras maiúsculas comparam os valores nas linhas. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. As letras em ordem alfabética classificam os valores em ordem crescente. Foi considerado $p < 0,05$ pelo teste de análise de variância seguido por Scott-Knott. Valores destacados em negrito representam resultados estatisticamente semelhantes entre si.

Figura 13: Porcentagem de mortalidade de *Lu. longipalpis* (fêmeas) em relação ao tempo de exposição ao óleo essencial de folhas frescas de *T. vauthieri*, em diferentes concentrações e horários de coleta.



7. DISCUSSÃO

A eliminação do *Lutzomyia longipalpis* tem se mostrado como um método bastante eficiente no combate da LV, uma vez que interrompe o ciclo da doença. Para o controle dos flebotomíneos, atualmente são empregados inseticidas piretróides, que são compostos neurotóxicos de ação rápida sobre insetos (BRASIL, 2014; SANTOS; AREAS; REYES, 2007). Apesar de serem poucos, já existem relatos de resistência de *Lu. longipalpis* a piretróides como a permetrina e a deltametrina (ALEXANDER *et al.*, 2009; MAZZARRI *et al.*, 1997).

No presente estudo foi utilizado o óleo essencial de *T. vauthieri*, uma espécie pertencente à família Asteraceae, cuja toxicidade sobre *Lu. longipalpis* não havia sido testada. A ação biológica dessa espécie foi demonstrada por RIBEIRO *et al.*, (1999) que em uma triagem biológica concluiu que os extratos de *T. vauthieri*, foram capazes de matar o protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* presente no sangue de camundongos experimentalmente infectados.

A espécie *T. vauthieri* apresentou, neste estudo, rendimento variando entre 1,95% a 3,83% dentre os horários de coleta. A produção de óleo essencial apresenta variações entre espécies diferentes, podendo ter o seu rendimento variando de 0,05% a 10% da massa da planta (TRENTINI & TESKE, 2001). O rendimento do óleo essencial é um fator muito importante para determinar a viabilidade de estudo das espécies como fontes de substâncias bioativas, caso seja necessário o isolamento desta, ou ainda que o óleo essencial apresente atividade equiparada à da substância isolada (RIBEIRO *et al.*, 2018).

Segundo TAIZ & ZEIGER (2013) a maior produção de metabólitos secundários ocorre sob altos níveis de radiação solar devido às reações biossintéticas que são realizadas por meio de processos fotossintéticos. Provavelmente por esse motivo, às 13 horas a espécie *T. vauthieri*, nesse estudo, apresentou maior rendimento de óleo essencial e às 19 horas menor rendimento.

Estudos realizados com outras espécies como a *Cymbopogon zehntneri* e *Cymbopogon citratus* DC também demonstram que o período próximo ao horário de 12 horas foi o que apresentou um maior rendimento, quando comparado com outros horários (MORAIS, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2018). Diferentemente dos resultados obtidos por SILVA (2001) ao verificar um rendimento maior em plantas coletadas pela manhã. Essa diferença pode ser atribuída às diferentes condições de solo, clima, temperatura e entre as regiões (CASTELO *et al.*, 2013).

Além do efeito das variações ambientais que ocorrem ao longo do dia, o rendimento pode ainda variar bastante, em função da época de coleta do material, entre épocas de chuva e seca (CASTELO *et al.*, 2013). Foi observado que os óleos essenciais extraídos das folhas coletadas 7h 00min e 19h 00min no outono seco, demonstraram maiores taxas de mortalidade dos flebotomíneos, resultados diferentes poderão ser encontrados quando avaliados esses mesmos itens na estação chuvosa.

Na investigação fitoquímica realizada no presente estudo, encontramos a presença de triterpenos e/ou esteróides e flavonóides. BOHLMANN *et al.* (1981) em pesquisas com os extratos da parte aérea da *T. vauthieri* também revelaram a presença da classe dos terpenos e dos flavonóides.

Os terpenos abrangem uma grande variedade de substâncias de origem vegetal, e sua importância ecológica como defensivos de plantas estão bem estabelecidas, podendo ser classificados, basicamente, em monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos (VIEGAS-JÚNIOR, 2003). A classe dos terpenos representa uma grande quantidade de compostos, e conseqüentemente possuem muitos mecanismos possíveis de atuação, gerando diversas ações sobre o comportamento alimentício, reprodutivo e de desenvolvimento de acordo com o modelo biológico utilizado e seu estágio de vida (VIEGAS-JÚNIOR, 2003).

Foram identificados compostos da classe dos alcalóides, taninos e saponinas nos OEs dos três horários de coleta. A presença de alcalóides já foi associada à atividade inseticida do extrato aquoso de *Capsicum baccatum* sobre insetos adultos de *Sitophilus zeamais* por GUIMARÃES *et al.* (2014) a mesma associação foi descrita por CAVALCANTE *et al.* (2006) ao utilizar extrato aquoso de *Prosopis juliflora* sobre ninfas de moscas-branca. Diante disso, podemos apontar que a presença de alcalóides no óleo essencial *T. vauthieri* poderia ter causado a morte do flebotomíneos utilizados nesse estudo.

A classe das saponinas representa um amplo grupo de moléculas glicosadas, esteroidais ou triterpênicas, que alteram a permeabilidade da membrana celular, alterando seu funcionamento ou causando sua destruição (SIMONS *et al.*, 2006). Algumas saponinas esteroidais, apresentam toxicidade a mamíferos, mas são frequentemente mais tóxicas a peixes e insetos (PAPADOPOULOU *et al.*, 1999). A ação larvicida das saponinas também já foi observada sobre larvas de *Aedes aegypti* (PAULINO *et al.*, 2014).

Os taninos observados nesse estudo são produzidos pelas plantas, e são conhecidos por apresentar diferentes atividades biológicas, como antioxidante, antisséptica, antimicrobiana e antifúngica (SCALBERT, 1991; MONTEIRO *et al.*, 2005; BARBEHEN; CONSTABEL, 2011). Alguns taninos provenientes de plantas apresentam atividade tóxica contra insetos herbívoros, porém a toxicidade pode depender da espécie da qual eles se originam (AYRES *et al.*, 1997). A ação tóxica desta classe de compostos foi registrada em vários insetos, dentre eles o vetor *Aedes aegypti* (SILVA *et al.*, 2004) e algumas espécies de coleópteros e lepidópteros (AYRES *et al.*, 1997).

As cumarinas foram identificadas no óleo essencial *T. vauthieri*, exceto no material coletado às 19 horas. A ausência dessa classe no último horário de coleta pode ser explicada pelo fotoperíodo. CASTRO *et al.* (2006) verificaram em seus estudos que o fotoperíodo aumentou significativamente o conteúdo de cumarinas nas folhas e caules de *Mikania glomerata*, concluindo que a luz solar pode favorecer o acúmulo desse metabólito secundário.

Quanto às variações na composição química percebe-se que existe uma variação na quantidade e no tipo de constituinte encontrado em relação à espécie e o horário de coleta (RIBEIRO *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos neste trabalho indicam atividade tóxica do óleo essencial de folhas frescas de *T. vauthieri* sobre *Lu. longipalpis*. Nos três horários de coletas, os óleos essenciais, apresentaram mortalidade significativa dos flebotomíneos, quando comparados ao controle positivo. Entretanto, o óleo essencial da coleta das 19h00mim sobressaiu sobre os demais, pois as três concentrações testadas, apresentaram semelhança estatística com o controle positivo no tempo de 72h. Todavia, a maior porcentagem de mortalidade (98,33%) foi observada na concentração de 20 mg.mL⁻¹ do óleo essencial da coleta de 7h 00mim no tempo de 72h.

A concentração letal varia de acordo com a planta, com o horário de coleta e com a parte utilizada. BARACHO (2018) utilizando extrato hidroetanólico de folhas e cascas de *Caryocar brasiliense* sobre *Lu. longipalpis*, concluiu que em 72 horas a concentração de 400 mg.mL⁻¹ do extrato da casca foi mais tóxicos ao flebotomíneos. Já com as folhas, a concentração de 100 mg.mL⁻¹ apresentou maior toxicidade, chegando a 81,1% na mortalidade total de *Lu. longipalpis* em 72 horas.

Com relação ao tempo de observação, foi possível perceber que durante as primeiras quatro horas de experimento, a mortalidade dos insetos não apresentou significância, com exceção do controle positivo, o que já era esperado. Somente a partir de 16 horas de exposição aos óleos essenciais, foi possível observar o aumento significativo da mortalidade dos insetos. O mesmo foi observado por BARACHO (2018) e SINCURÁ (2018).

Quando comparamos a mortalidade de gênero, percebemos que os machos, nesse estudo, foram mais sensíveis ao óleo essencial de *T. vauthieri*. SINCURÁ (2018) demonstrou que fêmeas de *Lu. longipalpis* são mais sensíveis aos extratos hidroalcoólicos de folhas e cascas de *Protium heptaphyllum*. Enquanto os machos são mais sensíveis aos extratos ciclo-hexânico de casca de *P. heptaphyllum* e etanólico de casca da mesma planta.

No presente estudo, também foi observado que o Tween não interferiu na mortalidade gerada pelos extratos, corroborando com os resultados encontrados por MACIEL *et al.* (2010), BARACHO (2018) e SANTOS (2018).

Embora exista registro da diminuição da suscetibilidade dos flebotomíneos, em especial os da espécie *Lu. longipalpis*, aos inseticidas comercialmente utilizados (ALEXANDER *et al.*, 2009), nossos ensaios mostraram que os flebotomíneos coletados em Jambreiro/MG são suscetíveis à α -cipermetrina. Em 16 horas de exposição à α -cipermetrina, 100% dos flebotomíneos utilizados já estavam mortos.

A utilização de insetos selvagens nesse experimento contribui para uma taxa variável de mortalidade natural, que pode ser atribuída à idade do flebotomíneos ou a outras condições biológicas, como alimentação e fatores genéticos (BARACHO, 2018). A vantagem de adotar esta metodologia é justificada pelo fato de utilizar populações que serão expostas aos inseticidas na aplicação do controle químico do vetor, aproximando o ensaio de laboratório às respostas de campo (SANTOS *et al.*, 2007).

Na busca por inseticidas botânicos eficientes contra o vetor da LV, diversas pesquisas foram elaboradas nos últimos anos, seja utilizando óleo essencial ou extratos de plantas. MACIAL *et al.* (2009, 2010b, 2010c), utilizou óleos essenciais extraídos de diversas plantas sobre *Lu. longipalpis*, e concluiu que óleos essenciais de *Lippia sidoides* e de *Coriandrum sativum* são tóxicos a ovos, larvas e adultos do inseto. O mesmo autor utilizando óleos essenciais de *Eucalyptus* concluiu que três espécies do

gênero têm efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento dos flebotomíneos, sobretudo *Eucalyptus staigeriana*, que indicou ser altamente eficiente contra todas as fases de *Lu. longipalpis*.

Utilizando extrato de duas espécies vegetais, LUITGARDS-MOURA *et al.* (2002) concluíram que, *Antonia ovata* e *Derris amazonica*, possuem atividade inseticida sobre *Lu. longipalpis*.

Estas observações permitem a conclusão de que a mortalidade dos flebotomíneos expostos ao óleo essencial de *T. vauthieri* verificada nesse estudo, ocorreu pela ação dos compostos orgânicos extraídos de suas folhas. De forma genérica, foram identificados metabólitos secundários que já possuem comprovados efeitos tóxicos sobre outros grupos de insetos, mas isto abre margem para uma análise mais detalhada da composição fitoquímica do óleo essencial de *T. vauthieri*, como uma caracterização por técnicas cromatográficas, que indiquem com mais precisão quais são os metabólitos secundários presentes e qual é o majoritário, indicando qual o princípio ativo é responsável pela atividade inseticida com mais exatidão.

8. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- O rendimento do óleo essencial de *T. vauthieri* variou entre 1,95 a 3,83% dentre os horários de coleta, sendo a coleta de 13h a de maior rendimento (3,83%);
- Foi identificada a presença de triterpenos e/ou esteróides, taninos, flavonóides, alcalóides, saponinas e cumarinas no óleo essencial de *Trixis vauthieri*.
- O óleo essencial de folhas frescas de *Trixis vauthieri* apresentou atividade inseticida sobre populações selvagens de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*;
- O óleo essencial de *T. vauthieri* extraído da coleta das 07h 00min mostrou uma atividade inseticida sobre *Lu. longipalpis* mais eficiente, principalmente na concentração de 20 mg.mL⁻¹, com 98,33% de mortalidade sobre os insetos;
- O ritmo circadiano interferiu no rendimento do óleo essencial e na taxa de mortalidade sobre *Lu. longipalpis*;

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O primeiro teste de avaliação do potencial inseticida do óleo essencial de *Trixis vauthieri* sobre os flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* indicou que essa planta pertencente à família Asteraceae, possui alcalóides, cumarinas, saponinas, flavonóides, taninos e esteróides e ou/ triterpenos entre os metabólitos secundários constituintes de suas partes aéreas (folhas), e que os mesmos podem estar envolvidos na atividade inseticida descrita nesse trabalho. Estes resultados contribuem com a busca de substâncias de origem natural com fins de formulação de um inseticida botânico.

Sendo assim, resultados encontrados neste trabalho revelam que a *Trixis vauthieri* é uma planta promissora como fonte de princípios ativos e pode ser investigada de forma mais profunda e sistemática na busca por compostos naturais com atividade biológica em diversos grupos de pragas agrícolas e vetores de doenças.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHOUNDI, M *et al.* A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 43-49, 2016.
- ALEXANDER, B *et al.* Susceptibility to chemical insecticides of two Brazilian populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Tropical Medicine and International Health**, v. 14, n.10, p. 1272-1277, 2009.
- ALEXANDER, B.; USMA, M.C. Potential source of sugar for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**; v. 88, p. 543-549, 1994.
- ALVAR, J *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, 2012.
- ALVES, W.A. Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil. **BEPA**, v.6, n.71, p.25-29, 2009.
- AMORA, S.S.A *et al.* Control of phlebotomine (Diptera: Psychodidae) leishmaniasis vectors. **Neotropical Entomology**., v. 38, n. 3, p. 303-310, 2009.
- ANDRADE, A.J.; GURGEL-GONÇALVES, R. New record and update on the geographical distribution of *Pintomyia monticola* (Costa Lima, 1932) (Diptera: Psychodidae) in South America. **Check List** v. 11, p. 1566, 2015.
- ANSARI, M.A; RAZDAN, R.K. Relative efficacy of various oils in repelling insects. **Indian Journal of Malariology**, v.32, p. 104, 1995.
- APEL, M.A., SOBRAL, M. & HENRIQUES, A.T. Composição química do óleo volátil de *Myrcianthes* nativas da região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 402-407, 2006.
- ASEKUN, O.T., GRIERSON, D.S.; AFOLAYAN, A.J. Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. capensis. **Food Chemistry**, p. 995-998, 2006.
- AYRES, M. P *et al.* Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. **Ecology**, v. 78, n. 6, p. 1696-1712, 1997.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p. 446-475, 2008.
- BARACHO, A.O. Avaliação do potencial inseticida de extratos de *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) sobre *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Dissertação** (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal) - UFVJM, Diamantina, 2018.

BARATA, R.A *et al.* Controle da leishmaniose visceral no município de Porteirinha, Estado de Minas Gerais, no período de 1998 a 2003. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.3, p. 386-388, 2011.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v.32, n.3, p. 679-688, 2009.

BASTOS, T. S. A. Espécies de flebotomíneos e ecoepidemiologia na cidade de Goiás-GO, Brasil. 2014. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1097-1106, 2007.

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

BOHLMANN, F.; SUWITA, A.; JAKUPOVIC, J.; KING, R. M.; ROBINSON, H. **Phytochem**, p.1649-1655, 1981.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. **Ministério da Saúde**, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância, prevenção e controle de zoonoses: normas técnicas e operacionais. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação-Geral de Doenças Transmissíveis. Brasília; **Ministério da Saúde**, p. 121, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, MS, 814 p. 2014.

BRAZIL, R.P.; BRAZIL, B.G. Bionomia. In: Rangel, E. F., Lainson, R. Flebotomíneos do Brasil. **Editora da Fundação Oswaldo Cruz**, p. 257-274, 2003.

BRAZIL, R.P.; RODRIGUES, A.A.F.; ANDRADE-FILHO, J.D. Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas - a mini review. **Entomology, Ornithology and Herpetology**; v. 4, p. 144, 2015.

BREMER, K. Asteraceae: Cladistics and classification. Portland: **Timber Press**, p. 429, 1994.

BROUSSALIS, A.M *et al.* Argentine plants as potential source of insecticidal compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 219-223, 1999.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n.3, p. 223-53, 2004.

BUSATTA, C. Caracterização Química e Atividade Antimicrobiana in vitro e em alimentos dos extratos de orégano e manjerona. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim, 2006.

CANCELLI, R.R.; EVALDT, A.C.P.; BAUERMANN, S.G.B. Contribuição à morfologia polínica da família Asteraceae Martinov. no Rio Grande do Sul - parte I. **Pesquisas Botânicas**, n.58, p. 347-374, 2007.

CARVALHO, A.F.U *et al.* Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, p. 569-571, 2003.

CARVALHO, G.M.L *et al.* Study of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) collected in a Leishmania-endemic area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil. **Journal Medical Entomology**; v. 47, p. 972-976, 2010.

CARVALHO-FILHO, J.L.S., BLANK, A.F., ALVES, P.B., EHLERT, P.A.D., MELO, A.S. CAVALCANTI, S.C.H., ARRIGONI-BLANK, M.F. & SILVA-MANN, R. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 24-30, 2006.

CASTELO, A.V.M *et al.* Rendimento e composição química do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Chell, na região do Distrito Federal. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. Recife, v.8, n.1, p.143-147, 2013.

CASTRO, C.; SILVA, M. L.; PINHEIRO, A. L.; JACOVINE, L. A. G. Análise econômica do cultivo e extração do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 241-249, 2005.

CASTRO, E.M *et al.* Coumarin contents in young *Mikania glomerata* plants (Guaco) under different radiation levels and photoperiod. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, 2006.

CAVALCANTE, G.M.; MOREIRA, A.F.C.; VASCONCELOS, S.D. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**., v. 41, n. 1, p. 9-14, 2006.

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

COSTA, C.H.N. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 223-228, 2001.

COSTA, C.H.N.; PEREIRA, H.F.; ARAÚJO, M.V. Epidemia de leishmaniose visceral no nordeste do Piauí, Brasil, 1980-1986*. **Revista de Saúde Pública de São Paulo**, v. 24, n. 5, p. 361-372, 1990.

COSTA, E.L.N.; SILVA, R.F.P.; FIUZA, L.M. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. **Acta Biologica Leopoldensia**, v. 26, p. 173-85, 2004.

COSTA, G.S *et al.* Avaliação sobre a preferência alimentar, produtividade e sobre vida da *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) submetida a repasto sanguíneo em diferentes mamíferos. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v.12, n.1, 2014.

COSTA, P.L *et al.* Ecology of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in north-eastern Brazil. **Acta Tropica**, v. 126, p. 99-102, 2013.

COURTENAY, O. Deltamethrin-impregnated bednets reduce human landing rates of sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* in Amazon households. **Medical and Veterinary Entomology**. v.21, n.2, p.168-76, 2007.

COUTINHO, J.V.S.C *et al.* Visceral leishmaniasis and leishmaniasis-HIV coinfection: comparative study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 670-674, 2017.

DABAGUE, I.C.M. Rendimento e composição do óleo essencial de rizomas de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) sob diferentes épocas de colheita e períodos de secagem. 2008. **Dissertação** - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

DANTAS-TORRES, F; BRANDÃO-FILHO, SP. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, p. 352-356, 2006.

DE PAULA, J.P.; FARAGO, P. V.; CHECCHIA, L.E.M.; HIROSE, K.M.; RIBAS, J.L.C. Atividade repelente do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth (variedade eugenol) contra o *Anopheles braziliensis* Chagas. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. v. 23, p. 376-378, 2004.

DEANE, L.M. Leishmaniose visceral no Brasil: Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. **Tese de Livre Docência**. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1956.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, p. 417-423, 1996.

DIAS, F.O.P.; LOROSA, E.S.; REBÊLO, J.M.M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 5, p. 1373-1380, 2007.

DIAS-LIMA, A.G.; CASTÉLLON, E.G.; SHERLOCK, I. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma floresta primária de terra firme da estação experimental de silvicultura tropical, estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**; v. 33, p. 303-316, 2003.

EZEONU, F.C.; CHIDUME, G.I.; UDEDI, S.C. Insecticidal properties of volatile extracts of orange peels. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 273, 2001.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109–112, 2014.

FOGANHOLI, J.N.; ZAPPA, V. Importância da leishmaniose na saúde pública. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. v.9, n.17, p.1-45, 2011.

FOGLIA MANZILLO, V *et al.* Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: Evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 1-2, p. 142–145, 2006.

FRANCO, I.M. Asteraceae do Parque Estadual do Biribiri, Diamantina, Minas Gerais: Barnadesieae, Mutisieae *sensu lato*, Astereae e Senecioneae. **Dissertação**, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. Universidade Federal de Uberlândia, 2014.

FRANCO, J.; NAKASHIMA, T.; FRANCO, L; BOLLER, C. Composição química e atividade antimicrobiana in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.15, p.191-194, 2005.

GALATI, E.A.B. Classificação de Phlebotominae. In RANGEL, E. F.; LAINSON R. (Org.). Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro: **FIOCRUZ**, 2003.

GALATI, E.A.B *et al.* An illustrated guide for characters and terminology used in descriptions of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). **Parasite**, v. 24, n. 26, 2017.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**; v. 7, p. 338-349, 2004.

GUIMARÃES, S.S *et al.* Ação repelente, inseticida e fago-inibidora de extratos de pimenta dedo-de-moça sobre o gorgulho do milho. **Arquivos do Instituto Biológico**., São Paulo, v.81, n.4, p. 322-328, 2014.

HASHIGUCHI, Y *et al.* Leishmaniasis in Ecuador: Comprehensive review and current status. **Acta Tropica**, v.166, p. 299-315, 2017.

HIND, D.J.N.; BEENTJE, H.J. Compositae: Systematics. **Royal Botanic Gardens**, v.1, p.621-626, 1996.

HUMMELBRUNNER, L.A.; ISMAN, M.B.; Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the Tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 715-720, 2001.

ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, p. 603-608, 2000.

KATINAS, L. Revisión de las Especies Sudamericanas del Género *Trixis* (Asteraceae, Mutisieae). **Darwiniana**, p. 27-108, 1996.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical Veterinary Entomology**, v. 4, p. 1-24, 1990.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17, p. 279-289, 1999.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis with particular reference to Brazil - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811-827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS W, KILLICK-KENDRICK R. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, p. 1-120. 1987.

LUITGARDS-MOURA, J.F *et al.* Preliminary assays indicate that *Antonia ovata* (Loganiaceae) and *Derris amazonica* (Papilionaceae), ichthyotoxic plants used for fishing in Roraima, Brazil, have an insecticide effect on *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 737-742, 2002.

LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero Phlebotomos existentes no Brasil. Manguinhos. Rio de Janeiro, 1912.

MACEDO, I.T.F *et al.* Sazonalidade de flebotomíneos em área endêmica de Leishmaniose Visceral no município de Sobral, Ceará, Brasil. **Ciência Animal**; v. 18, p. 67-74, 2008.

MACÍAS, F.A.; OLIVEROS-BASTIDAS, A.; MARIN, D.; CARRERA, C.; CHINCHILLA, N.; MOLINILLO, J.M.G. Plant biocommunications: their phytotoxicity, degradation Studies and potential use as herbicide models. **Phytochemistry Reviews**, v.7, p. 179-194, 2008.

MACIEL, M.V *et al.* Atividade inseticida dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Coriandrum sativum* sobre *Lutzomyia longipalpis*. **Ciência Animal**, v. 19, n. 2, p. 77-87, 2009.

MACIEL, M.V *et al.* Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 105-112, 2010. (a)

MACIEL, M.V *et al.* Atividade inseticida in vitro do óleo de sementes de nim sobre *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 7-11, 2010 (b).

MACIEL, M.V *et al.* Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, p. 1-7, 2010 (c).

MAIA-ELKHOURY, A.N.S *et al.* Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**; v. 24, p. 2941-2947, 2008.

MANGABEIRA, O. Sobre duas novas espécies de *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 33, n. 3, p. 349-356, 1938.

MARESCA, C *et al.* A survey on canine leishmaniasis and phlebotomine sand flies in central Italy. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 1, p. 36-38, 2009.

MATOS, F.J.A. Introdução à Fitoquímica Experimental. 2d. UFC, Fortaleza, 124 p, 1997.

MAZZARRI, M.B *et al.* Susceptibility of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to selected insecticides in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Venezuela. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 13, n. 4, p. 335-341, 1997.

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

MISSAWA, N.A *et al.* Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 76-78, 2011.

MONGE, M; ROQUE, N. *Chaptalia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2014.

MONTEIRO, J.M *et al.* Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, p.4050-4063, 2009.

MORAIS, M.H.F.; FIUZA, V.O.P.; ARAÚJO, V.E.M. Avaliação das atividades de controle da leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006-2011. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 3, p. 485-496, 2015.

MUNOZ-SUANO, A.; CHINCHILLA, D.; AGUILAR, S.; MOLINILLO, J.M.G.; MACIAS, F.A.; RODRÍGUEZ-IGLESIA, M.A.; GARCIA-COZAR, F. Sesquiterpenes as immunosuppressants. **Transplantation**, v.88, n.3, p. 24-30, 2009.

NAKATANI, M.; ABDELGALEIL, S.A.M.; SAAD, M.M.G.; HUANG, R.C.; DOE, N.; IWAGAWA, T. Phragmalin limonoids from *Chukrasia tabularis*. **Phytochemistry**, v.65, p. 2833-2841, 2004.

OLIVEIRA A.G.; ANDRADE-FILHO, J.D.; FALCÃO, A.L.; BRAZIL, R.P. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. **Cadernos de Saúde Pública**, 2003.

OLIVEIRA, E.F *et al.* Experimental infection and transmission of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite vector interactions. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, 2017.

OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; VIEIRA, W.L.; FREIRE K.R.L; TRAJANO, V.N.; LIMA, I.O.; SOUZA E.L.; TOLEDO, M.S.; SILVA-FILHO, R.N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 77-82, 2006.

OLIVEIRA, R.N., DIAS, I.J.M.; CÂMARA, C.A.G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 39-43, 2005.

OLIVEIRA, S *et al.* Presence of anti-*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Leishmania* spp. and *Ehrlichia canis* antibodies in free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) in the northeastern region of the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 3, p. 243-250, 2016.

OPAS/OMS. Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas. **Informe Leishmanioses**, v. 2, p. 1-4, 2016.

PAHO. Pan American Health Organization. Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas: Washington: **PanAmerican Health Organization**, 2017.

PAHO. Pan American Health Organization. Plan of action for the elimination of neglected infectious diseases and post-elimination actions 2016-2022. 55th Directing council; **68th Session of the Regional Committee of WHO for the Americas**, Washington, D.C., USA, 26-30, 2017.

PAPADOPOULOU, K *et al.* Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 22, p. 12923-12928, 1999.

PATHAK, N.; MITTAL, P.K.; SINGH, O.P.; VIDYA SAGAR.; VASUDEVAN, P. Larvicidal action of essential oils from plants against the vector insects *Anopheles stephensi* (Liston) *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (L). **Interest Pest Control**, v. 42, p. 53, 2000.

PAULINO, B.L *et al.* Utilização de saponina triterpênicas no combate às larvas do *Aedes aegypti*. **Simpósio de Ciências Farmacêuticas - Centro Universitário São Camilo**, p. 23-26, 2014.

PAVELA, R. Insecticidal activity of certain medicinal plants. **Fitoterapia**, v.75, p. 745-749, 2004.

PESSOA, S.B.; BARRETO, M.P. Leishmaniose Tegumentar Americana. 1948. **Serviço de Parasitologia**, Departamento de Medicina, Faculdade de São Paulo, São Paulo, 1948.

POTZERNHEIM, M.; BIZZO, H. R.; COSTA, A.T.S.; VIEIRA, R.F.; CARVALHO, C.M.; GRACINDO, L.A.M.B. Chemical characterization of seven *Piper* species

(Piperaceae) from Federal District, Brazil, based on volatile oil constituents. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 10-12, 2006.

POTZERNHEIM, M.C.L., BIZZO, H.R. & VIEIRA, R.F. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 246-251, 2006.

PUGEDO, H *et al.* HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 1, p. 70-72, 2005.

QUINNEL, R.J.; DYE, C.; SHAW, J.J. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 6, p. 195-200, 1992.

RAJENDRAN, S.; SRIRANJINI, V. Plant products as fumigants for stored-product insect control. **Journal of Stored Products Research**, v. 44, p. 126-135, 2008.

RANGEL, E.F.; VILELA, M.L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24, n.12, p.2948-2952, 2008.

REBELO, J.M.M *et al.* Ocorrência de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em focos de leishmanioses, em área de ecoturismo do entorno do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.26, n.1, p.195-198, 2010.

REIS, L.L *et al.* Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 638-645, 2017.

REY, L *et al.* American visceral leishmaniasis (kala-azar) in hospitalized children from an endemic area. **Jornal de Pediatria**, v. 81, p. 73-78, 2005.

RIBEIRO, A.; PILÓ-VELOSO, D.; HOWARTH, O.; ZANI, C.L. A new cyclohexadecane derivative from *Trixis vauthieri* DC (Asteraceae). **Organic Letters**, p. 1897-1900, 1999.

RIBEIRO, S.M *et al.* Influência da sazonalidade e do ciclo circadiano no rendimento e composição química dos óleos essenciais de *Croton* spp. da Caatinga. **Iheringia**, Série Botânica, Porto Alegre, p. 31-38, 2018.

RODRÍGUEZ-ROJO, S.; VARONA, S.; NÚÑEZ, M.; COCERO, M.J. Characterization of rosemary essential oil for biodegradable emulsions. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 137-140, 2012.

ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. **Revista Internacional do Desenvolvimento Local**, p. 43-50, 2001.

- ROMERO, G.A.S. O controle de leishmaniose visceral no Brasil: transformar é preciso. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 6, 2016.
- ROSÁRIO, I. N. G. *et al.* Evaluating the adaptation process of sandfly fauna to anthropized environments in a leishmaniasis transmission area in the Brazilian Amazon. **Journal of Medical Entomology**, v. 23, p. 1–10, 2016.
- SANTOS, D.R.; FERREIRA, A.C.; BISETTO-JUNIOR, A. The first record of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Paraná, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 45, n.5, p. 643-645, 2012.
- SANTOS, D.D.M. Avaliação do efeito inseticida de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) sobre *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), vetor da leishmaniose visceral no Brasil. **Dissertação** (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - UFVJM. Diamantina, 2018.
- SANTOS, D.R. Curso de Capacitação: Coleta e Identificação de Flebotomíneos. Companhia Paranaense de Energia: COLÍDER/MT, 2014.
- SANTOS, M.A.T.; AREAS, M.A.; REYES, F.G.R. Piretróides - uma visão geral. **Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2007.
- SANTOS, S.O *et al.* Incrimination of *Lutzomyia (Lutzomyia) cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**; v. 12, p. 315-317, 1998.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.
- SCHIMMING, C; PINTO-E-SILVA, J.R.C. Canine Leishmania infestions - Review. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 2012.
- SEFIDKON, F.; ABBASI, K.; JAMZAD, Z.; AHMADI, S. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. **Food Chemistry**, p. 1054-1058, 2007.
- SHAALAN, E.A.S.; CANYON, D.; YOUNES, M.W.F.; ABDEL-WAHAB, H; MANSOUR, A. H. A review of botanical phytochemicals with insecticidal potential. **Environment International**, v. 31, p. 1149-1166, 2005.
- SHERLOCK, I.A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 671-683, 1996.
- SHERLOCK, I.A. Importância médico-veterinária. In: Rangel, E. F., Lainson, R. Flebotomíneos do Brasil. **Editora da Fundação Oswaldo Cruz**, p. 15-19, 2003.

SHERLOCK, I.A.; SHERLOCK, V.A. Métodos práticos para criação de flebotomíneos em laboratório. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 32, p. 209-217, 1972.

SHIMABUKURO, P.H.F.; GALATI, E.A.B. Checklist dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotropica**, v. 11, 2011.

SILVA, E.A.; ANDREOTTI, R.; HONER, M.R. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 420-425, 2007.

SILVA, H.H.G *et al.* Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 5, p. 396-399, 2004.

SILVA, S.R.S. Composição química, avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e deficiência hídrica de *Melaleuca alternifolia* Chell crescida no Brasil. **Dissertação** (Mestrado em Agroquímica) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

SIMÕES, C. M. O *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. **Editora UFRGS**, Porto Alegre, p.1104, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. Farmacognosia das Plantas ao Medicamento. 5 ed. **Revista Associação Médica do Paraná**. Porto Alegre: UFSC, p. 1102, 2003.

SIMONS, V *et al.* Dual effects of plant steroidal alkaloids on *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2732-2740, 2006.

SINAN – Sistema de informação de agravo de notificação. Leishmanioses. 2017.

SINCURÁ, Y. R. Ação inseticida de extratos de folhas e cascas de *Protium heptaphyllum* (aubl.) marchand (Burseraceae) sobre *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). **Dissertação** (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal) - UFVJM. Diamantina, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Artmed, Porto Alegre, 820p., 2013.

TAVEIRA, F.S.N.; LIMA W.N.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S. Seasonal essential oil variation of Anibacanelilla. **Biochemical Systematics and Ecology**, p. 69-75, 2003.

TELICI, I.; BAYRAM, E.; YILMAZ, G.; AVCI, B. Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). **Biochemical Systematics and Ecology**, p. 489-497, 2006.

TRENTINI, A.M.M.; TESKE, M. Herbarium compêndio de fitoterapia. **Herbarium Laboratório Botânico**, Curitiba, 370p., 2001.

URSINE, R.L. *et al.* Human and canine visceral leishmaniasis in an emerging focus in Araçuaí, Minas Gerais: spatial distribution and socio-environmental factors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 8, p. 505-511, 2016.

VARONA, S.; KARETHB, S.; MARTÍNA, A.; COCEROA, M.J. Formulation of lavandin essential oil with biopolymers by PGSS for application as biocide in ecological agriculture. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, p. 369-377, 2010.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.1, 2005.

VIEGAS-JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, p. 390-400, 2003.

VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; ANDREI, C.C. Plantas inseticidas. In: SIMÕES, C.M. VIEIRA, P.C.; MAFEZOLI, J.; BIAVATTI, M.W. Inseticidas de origem vegetal. In: FERREIRA, J.T.B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P.C. Produtos naturais no controle de insetos. São Carlos: **Editora da UFSCar**, 2001.

VIEIRA, P.C; FERNANDES, J.B; ANDREI; C.C. Plantas inseticidas. In: SIMÕES, CMO; SCHENKEL, EP; GOSMAM, G; MELLO, JCP; METZ, LA; PETROVICK, PR. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6.ed.- Porto Alegre: Editor da UFRGS, 2007.

VITALINI, S.; BERETTA, G.; IRITI, M.; ORSENIGO, S.; BASILICO, N.; DALL'ACQUA, S.; IORIZZI, M.; FICO, G. Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity. **Acta Biochimica Polonica**, v.58, n.2, p. 203-209, 2011.

VON ZUBEN, A.P.B.; DONALÍSIO, M.R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 6, 2016.

WARD, R.D. Vector biology and control. In CHANG K.P.; BRAY, R (Org.). Leishmaniasis. **Elsevier Science Publishers**, Amsterdam: New York & Oxford, p. 199-12, 1985.

WERNECK, G.L. Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo? **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 2016.

WERNECK, G.L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 5, p. 851-856, 2014.

WHO. World Health Organization Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2016.

WHO. World Health Organization. Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2015.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis, 2018.

YAGHOOBI-ERSHADI, M.R.; AKHAVAN, A.A.; JAHANIFARD, E.; VANTANDOOST, H.; AMIN, G.H.; MOOSAVI, L.; RAMAZANI, A.R.Z.; ABDOLI, H.; ARANDIAN, M.H. Repellency effect of myrtle essential oil and DEET against *Phlebotomus papatasi*, under laboratory conditions. **Iranian Journal Public Health**, v. 35, p. 7-13, 2006.

YOUNG, D.G.; DUNCAN, M.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**, v. 54, p. 1-881, 1994.

ZANI, C. L., CHAVES, P. P. G., QUEIROZ, R., CARDOSO, J. E., ANJOS, A. M. G., GRANDI, T. S. M., OLIVEIRA, A. B. Brine shrimp lethality assay as a pre-screening system for anti-*Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine**, p. 47-50, 1995