

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LÍGIA MORAES BARIZON DE SOUZA

**Avaliação da ação inseticida de extratos vegetais, óleos essenciais e substâncias sobre imaturos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE), em condições de laboratório**

CURITIBA

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LÍGIA MORAES BARIZON DE SOUZA

**Avaliação da ação inseticida de extratos vegetais, óleos essenciais e substâncias sobre imaturos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE), em condições de laboratório**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.  
Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva

CURITIBA

2012

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo caminho trilhado e pelas conquistas alcançadas.

Aos meus pais, Tânia e Paulo Márcio, por todo incentivo, carinho e amor dedicados durante toda a minha formação, às avessas, de fato, mas verdadeiros, com toda certeza.

Ao meu irmão, Dudu, por me fazer, ou ao menos tentar, criar uma dose de paciência.

Aos demais familiares que, de maneira singular, fizeram-se positivamente presentes durante as fases desse meu projeto.

Ao Prof. Dr. Mário Navarro, pela confiança, apoio, broncas e orientação plena em todas as etapas deste trabalho.

Aos pesquisadores Prof. Dr. Emannel Vilaça Costa e Prof. Dr. Francisco de Assis Marques por toda a contribuição, disponibilidade de tempo e material destinados ao desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu namorado Luiz Gustavo e família, pela paciência, incentivo e ajuda oferecida durante a etapa mais difícil desse trabalho.

Aos queridos amigos e amigas que conquistei nesse período e aos que já estavam anteriormente conquistados: Karine, Melise, David, Daiara, Selene, Debora, Vinícius e André.

Aos companheiros de laboratório, pela paciência e imenso aprendizado repassado: Ana Caroline, Mário, Oscar, Rodrigo e Betina.

Às minhas eternas orientadoras e colegas Médicas Veterinárias, Prof<sup>a</sup>. Rita Maria V. M. Rocha e Prof<sup>a</sup>. Cláudia Turra Pimpão.

Ao programa de Pós- Graduação em Entomologia, pela oportunidade de realização do mestrado concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao programa FAPITEC/SE (Edital FAPITEC-SE/MCT/CNPq No. 07/2009) pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O vírus causador do dengue é transmitido ao ser humano através da picada de fêmeas de *Aedes aegypti*. Na ausência de uma vacina eficaz, o único método atualmente disponível ao combate da doença é o controle do mosquito *Ae. aegypti*. Extratos vegetais surgem como alternativa de encontrar substâncias com propriedades inseticidas contra o vetor do dengue, assim como atuarem como métodos alternativos aos inseticidas os quais os mosquitos já possuem resistência. Pela necessidade de realizar bioensaios para a detecção da atividade larvicida, a criação de *Ae. aegypti* em laboratório é importante, a fim de obter ovos em grande escala. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade larvicida de compostos alternativos contra *Ae. aegypti* e elaborar procedimentos anestésicos para administração em camundongo utilizados como fonte de alimentação sanguínea para fêmeas adultas da mesma espécie, sem interferência na viabilidade dos ovos depositados. Foram realizados bioensaios preliminares com 27 compostos, entre extratos e óleos vegetais das espécies *A. pickelii*, *A. vepretorum* e *X. laevigata* e, em um segundo momento, bioensaios de efetividade com os compostos que apresentaram mortalidade acima de 80%. A mortalidade das larvas foi verificada a cada 24 horas até a emergência completa do último adulto do grupo controle. Os procedimentos anestésicos avaliados foram: P1 (Cetamina + Xilazina), P2 (Cetamina + Midazolam), P3 (Tiopental sódico + Acepromazina) e P4 (Tiletamina-zolazepam), onde cada gaiola recebeu um camundongo, com um procedimento anestésico instaurado, uma vez por semana, durante quatro semanas. A monitoração dos animais se deu pelos reflexos palpebral, pupilar, interdigital e caudal, reação ao pinçamento da pele da parede abdominal, frequência cardíaca, respiratória, coloração das mucosas ocular, oral e genital, tempo de preenchimento capilar, grau de desidratação e temperatura retal. A mortalidade observada para os compostos de extrato de *A. pickelii*, *X. laevigata* e *A. vepretorum* foi inferior a 80%, considerando concentrações abaixo de 250 ppm. O óleo essencial de *A. pickelii* apresentou mortalidade larval acima de 80% nas concentrações acima de 200 ppm, enquanto o óleo essencial de *A. vepretorum* apresentou mortalidade larval acima de 80% nas concentrações acima de 175 ppm e o óleo essencial de *X. laevigata* apresentou mortalidade larval acima de 80% somente nas concentrações de 275 e 500 ppm. Ainda sim, observou-se a emergência de adultos para os óleos essenciais das três espécies de plantas estudadas. Detectou-se comportamento semelhante quanto à frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR) entre os protocolos, verificando queda após administração das drogas e seguido por estabilidade dos valores, a exceção de P3, onde a FC se manteve estável em todos os momentos, e P2, que manteve a FR estável em todos os momentos. Houve redução significativa da temperatura retal nos protocolos P1 e P4. A coloração das mucosas oral e genital apresentou diferenças significativas somente para P4. A ausência de reflexo caudal e reação ao pinçamento abdominal apresentaram diferenças significativas somente até o vigésimo minuto de procedimento para o protocolo anestésico P1. Não houve diferença significativa entre os protocolos anestésicos na viabilidade dos ovos com relação ao controle.

**Palavras-chave:** Dengue. Extratos vegetais. Óleos essenciais. Annonaceae. Viabilidade de ovos. Protocolos anestésicos.

## ABSTRACT

Dengue is transmitted to humans by the bite of *Aedes aegypti* female. In the absence of an effective vaccine, the only method currently available to combat the disease is vector control. Plants extracts emerge as an alternative to find substances with insecticidal properties against *Ae. aegypti*, as well as serve as alternatives to insecticides that mosquitoes are already resistant. In order to do bioassays for detection larvicidal activity, *Ae. aegypti* breeding, at laboratory conditions, is important in order to obtain eggs on large scale. The aim of this study was to evaluate the larvicidal activity of alternative compounds against *Ae. aegypti* and develop anesthetic procedures for mice used as a source of blood meal for adult females of the same species, without interfering on the viability of eggs laid. Preliminary experiments were conducted with 27 compounds, including plant extracts and oils of *A. pickelii*, *A. vepretorum* and *Xylopi laevigata*, and on a second stage, were conducted effective bioassays with compounds that had mortality rate above 80%. The larvae mortality was checked every 24 hours until the emergence of the last adult of control group. The anesthetic procedures were: P1 (ketamina + xylazine), P2 (ketamine + midazolam), P3 (acepromazine + thiopental) and P4 (tiletamine + zolazepam), which cage received one mice, with one anesthetic procedure, once in a week, during four weeks. Observations and reflex tests, respiratory and heart rates, body temperature and color of mucous membranes were used to characterize the quality of anesthesia. The mortality rate for *A. pickelii*, *X. laevigata* and *A. vepretorum* extracts was less than 80%, at concentrations below 250 ppm. *A. pickelii* essential oil showed larval mortality above 80%, at concentrations above 200 ppm, while *A. vepretorum* essential oil showed larval mortality above 80% at concentrations above 175 ppm and *X. laevigata* essential oil showed larval mortality above 80% only for concentrations of 250 and 500 ppm. There was emergence of adults for all of essential oils. A similar behavior was found regarding heart rate (HR) and respiratory rate (RR) between the procedures, checking drop after drug administration an followed by stability values, except for P3, where HR remained stable at all times, and P2, which kept RR stable all the time. There was a significant decrease in body temperature for the procedures P1 and P4. The color of oral and genital mucosa showed significant differences only for P4. The absence of clamping abdominal reflex response was showed only until 20 minutes for procedure P1. There was no significant difference between anesthetic procedures on the viability of eggs.

**Keywords:** Dengue. Plant extract. Essential oils. Annonaceae. Viability of eggs. Anesthetic procedures.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> (a; b; c) Frutos e sementes de <i>A. pickelii</i> e (d) aspecto geral da planta. Fonte: Costa, E. V. (2010).....	53
<b>Figura 2.</b> Aspecto geral de <i>A. vepretorum</i> , (b) raiz e (c; d) seus frutos. Fonte: Costa, E. V. (2010) .....	53
<b>Figura 3.</b> (a; b; c) Inflorescência de <i>X. laevigata</i> e (d) aspecto geral da planta. Fonte: Costa, E. V. (2010) .....	54
<b>Figura 4.</b> Fluxograma de obtenção dos extratos.....	55
<b>Figura 5.</b> (A) Moinho de quatro-facas; (B) Extração à frio (método de maceração). Foto: Costa, E.V. (2010).....	56
<b>Figura 6.</b> Sistema de hidrodestilação. Foto: Costa, E.V. (2010) .....	57
<b>Figura 7.</b> CG-EM do DQI/UFS utilizado na análise qualitativa dos óleos essenciais. Foto: Costa, E.V. (2010).....	58
<b>Figura 8.</b> CG-DIC do DQI/UFS utilizado na análise quantitativa dos óleos essenciais. Foto: Costa, E.V. (2010).....	59
<b>Figura 9.</b> Mortalidade larval não acumulada, por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato APCEH, a partir de 72 horas, quando ocorreu o primeiro registro de mortalidade do extrato em questão. (n) = número total de larvas expostas por produto.....	75
<b>Figura 10.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato APCEH. ....	76
<b>Figura 11.</b> Mortalidade larval não acumulada, por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato APCEM. (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	78
<b>Figura 12.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato APCEM.....	79

<b>Figura 13.</b> Mortalidade larval não acumulada, por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato APFEH. (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	81
<b>Figura 14.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato APFEH.....	82
<b>Figura 15.</b> Mortalidade larval não acumulada, por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato APFEM. (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	84
<b>Figura 16.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato APFEM. ....	85
<b>Figura 17.</b> Mortalidade larval não acumulada, por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio de efetividade realizado com o óleo essencial de <i>A. pickelii</i> (OEAP). (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	87
<b>Figura 18.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o óleo essencial de <i>A. pickelii</i> (OEAP). ....	88
<b>Figura 19.</b> Mortalidade larval não acumulada, por concentração e por réplica no horário em que ocorreu maior porcentagem de mortalidade larval (24 horas), referente ao bioensaio de efetividade realizado com o óleo essencial de <i>A. pickelii</i> (OEAP). (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	90
<b>Figura 20.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o óleo essencial de <i>A. pickelii</i> (OEAP). ....	91
<b>Figura 21.</b> Mortalidade larval não acumulada, por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato AVCEEP. (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	94
<b>Figura 22.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato AVCEEP. ....	95
<b>Figura 23.</b> Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato AVCEM. (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	97

<b>Figura 24.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato AVCEM.....	98
<b>Figura 25.</b> Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato AVFEFP. (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	100
<b>Figura 26.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato AVFEFP. ....	101
<b>Figura 27.</b> Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato AVFEM. (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	103
<b>Figura 28.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato AVFEM. ....	104
<b>Figura 29.</b> Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o óleo essencial de <i>A. vepretorum</i> (OEAV). (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	106
<b>Figura 30.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o óleo essencial de <i>A. vepretorum</i> (OEAV). ....	107
<b>Figura 31.</b> Porcentagem de mortalidade larval por concentração, por réplica e por bioensaio, em 24 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente ao bioensaio de efetividade realizado com o óleo essencial de <i>A. vepretorum</i> (OEAV). (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	110
<b>Figura 32.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio de efetividade realizado com o óleo essencial de <i>A. vepretorum</i> (OEAV). ....	111
<b>Figura 33a.</b> Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato XLCEH. (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	114
<b>Figura 33b.</b> Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato XLCEH. (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	115



<b>Figura 34.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato XLCEH.....	116
<b>Figura 35.</b> Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato XLCEM a partir de 48 horas, quando ocorreu o primeiro registro de mortalidade do composto em questão. (n) = número total de larvas expostas por produto.....	118
<b>Figura 36.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato XLCEM.....	119
<b>Figura 37.</b> Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato XLFEH. (n) = número total de larvas expostas por produto.....	121
<b>Figura 38.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato XLFEH.....	122
<b>Figura 39.</b> Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato XLFEM. (n) = número total de larvas expostas por produto.....	124
<b>Figura 40.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato XLFEM.....	125
<b>Figura 41.</b> Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) até 144 horas, quando ocorreu o último registro de mortalidade do composto em questão, referente ao bioensaio preliminar realizado com o óleo essencial de <i>X. laevigata</i> (OEXL). (n) = número total de larvas expostas por produto.....	127
<b>Figura 42.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o óleo essencial de <i>X. laevigata</i> (OEXL).....	128
<b>Figura 43.</b> Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica, em 24 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente ao bioensaio de efetividade realizado com o óleo essencial de <i>X. laevigata</i> (OEXL). (n) = número total de larvas expostas por produto.....	131

<b>Figura 44.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio de efetividade realizado com o óleo essencial de <i>X. laevigata</i> (OEXL).....	132
<b>Figura 45.</b> Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica, em 24 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente ao bioensaio de efetividade realizado com a substância pura ( <i>E</i> )- cariofileno. (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	135
<b>Figura 46.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio de efetividade realizado com a substância pura ( <i>E</i> )- cariofileno. ....	136
<b>Figura 47.</b> Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica, em 24 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente ao bioensaio de efetividade realizado com a substância pura $\alpha$ -pineno. (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	139
<b>Figura 48.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio de efetividade realizado com a substância pura $\alpha$ -pineno. ....	140
<b>Figura 49.</b> Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica, em 24 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente ao bioensaio de efetividade realizado com a substância pura $\beta$ -pineno. (n) = número total de larvas expostas por produto.....	143
<b>Figura 50.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio de efetividade realizado com a substância pura $\beta$ -pineno. ....	144
<b>Figura 51.</b> Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com a substância pura óxido de cariofileno nas concentrações de 100 e 250 ppm. (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	145
<b>Figura 52a.</b> Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com a substância pura óxido de cariofileno na concentração de 300 ppm. (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	146
<b>Figura 52b.</b> Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com a substância pura óxido de cariofileno na concentração de 300 ppm. (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	147

<b>Figura 53.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com substância pura óxido de cariofileno nas concentrações de 100 e 250 ppm.....	148
<b>Figura 54.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com substância pura óxido de cariofileno nas concentrações de 100 e 250 ppm.....	149
<b>Figura 55.</b> Mortalidade larval não acumulada por composto, por réplica e por dia (em horas), referente ao bioensaio preliminar realizado com os compostos C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8. (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	153
<b>Figura 56.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com os compostos C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8.....	154
<b>Figura 57.</b> Mortalidade larval não acumulada por composto e subunidades e por réplica em 48 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente ao bioensaio de efetividade realizado com os compostos C1 e C7 e suas subunidades. (n) = número total de larvas expostas por produto.....	156
<b>Figura 58.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com os compostos C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8.....	157
<b>Figura 59.</b> Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica em 24 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 200 $\mu$ M. (n) = número total de larvas expostas por produto.....	159
<b>Figura 60.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente ao bioensaio de efetividade realizado com o composto C7 na concentração de 200 $\mu$ M.....	159
<b>Figura 61.</b> Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica, em 48 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 30 $\mu$ M. (n) = número total de larvas expostas por produto.....	161
<b>Figura 62.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios realizados com os compostos C7 na concentração de 30 $\mu$ M.....	162

<b>Figura 63.</b> Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica em 24 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 20 $\mu\text{M}$ . (n) = número total de larvas expostas por produto.....	163
<b>Figura 64.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 20 $\mu\text{M}$ .....	164
<b>Figura 65.</b> Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica em 48 e 72 horas, horários nos quais ocorreram maiores mortalidades, referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 18 $\mu\text{M}$ . (n) = número total de larvas expostas por produto.....	166
<b>Figura 66.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 18 $\mu\text{M}$ .....	167
<b>Figura 67.</b> Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica em 72 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 15 $\mu\text{M}$ . (n) = número total de larvas expostas por produto.....	169
<b>Figura 68.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 15 $\mu\text{M}$ .....	170
<b>Figura 69.</b> Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica em 48 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 13 $\mu\text{M}$ . (n) = número total de larvas expostas por produto.....	171
<b>Figura 70.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 13 $\mu\text{M}$ .....	172
<b>Figura 71.</b> Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica em 96 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 10 $\mu\text{M}$ . (n) = número total de larvas expostas por produto.....	173
<b>Figura 72.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 10 $\mu\text{M}$ .....	174

<b>Figura 73.</b> Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica, em 168 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 5 µM. Não houve mortalidade larval em 168 horas no terceiro bioensaio. (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	175
<b>Figura 74.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios de efetividade realizados com os compostos C7 na concentração de 5 µM. ....	176
<b>Figura 75.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 1 µM. ....	177
<b>Figura 76.</b> Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica, em 120 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 sobre imaturos de <i>Ae. aegypti</i> da população de Foz do Iguaçu, na concentração de 40 µM. (n) = número total de larvas expostas por produto. ....	179
<b>Figura 77.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 40 µM sobre imaturos de <i>Ae. aegypti</i> da população de Foz do Iguaçu. ..	179
<b>Figura 78.</b> Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica em 24 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente aos bioensaios de efetividade realizados com a subunidade 3 (SB3) sobre imaturos de <i>Ae. aegypti</i> da população de Foz do Iguaçu, na concentração de 30 µM. (n) = número total de larvas expostas por produto .....	181
<b>Figura 79.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios de efetividade com a subunidade 3 (SB3) na concentração de 30 µM sobre imaturos de <i>Ae. aegypti</i> da população de Foz do Iguaçu. ....	182
<b>Figura 80.</b> Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica em 24 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente aos bioensaios de efetividade realizados com a subunidade 3 (SB3) sobre imaturos de <i>Ae. aegypti</i> da população de Foz do Iguaçu, na concentração de 20 µM. (n) = número total de larvas expostas por produto .....	183
<b>Figura 81.</b> Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios de efetividade com a subunidade 3 (SB3) na concentração de 20 µM sobre imaturos de <i>Ae. aegypti</i> da população de Foz do Iguaçu. ....	184

**Figura 82.** Comparação, em minutos, entre os protocolos anestésicos administrados em camundongos com relação à frequência cardíaca. Letras iguais entre as linhas não apresentam diferenças significativas ( $p>0,05$ ). P1 = protocolo anestésico 1 (cetamina + xilazina); P2 = protocolo anestésico 2 (cetamina + midazolam); P3 = protocolo anestésico 3 (acepromazina + tiopental); P4 = protocolo anestésico 4 (tilemina + zolazepam). ..... 186

**Figura 83.** Comparação, em minutos, entre os protocolos anestésicos administrados em camundongos com relação à frequência respiratória. Letras iguais entre as linhas não apresentam diferenças significativas ( $p>0,05$ ). P1 = protocolo anestésico 1 (cetamina + xilazina); P2 = protocolo anestésico 2 (cetamina + midazolam); P3 = protocolo anestésico 3 (acepromazina + tiopental); P4 = protocolo anestésico 4 (tilemina + zolazepam). ..... 186

**Figura 84** Comparação, em minutos, entre os protocolos anestésicos administrados em camundongos com relação à temperatura. Letras iguais entre as linhas não apresentam diferenças significativas ( $p>0,05$ ). P1 = protocolo anestésico 1 (cetamina + xilazina); P2 = protocolo anestésico 2 (cetamina + midazolam); P3 = protocolo anestésico 3 (acepromazina + tiopental); P4 = protocolo anestésico 4 (tilemina + zolazepam). ..... 187

**Figura 85.** Mediana dos valores obtidos para coloração da mucosa genital, aos 20 minutos, momento no qual ocorreu diferença significativa entre os procedimentos anestésicos ( $p<0,05$ ) em camundongos. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si. P1 = protocolo anestésico 1 (cetamina + xilazina); P2 = protocolo anestésico 2 (cetamina + midazolam); P3 = protocolo anestésico 3 (acepromazina + tiopental); P4 = protocolo anestésico 4 (tilemina + zolazepam). Representação dos valores do eixo y: 3 = coloração normal, 4 = hipocromia e 5= hiperchromia..... 188

**Figura 86.** Mediana dos valores obtidos para coloração da mucosa oral, aos 20 minutos, momento no qual ocorreu diferença significativa entre os procedimentos anestésicos ( $p<0,05$ ) em camundongos. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si. P1 = protocolo anestésico 1 (cetamina + xilazina); P2 = protocolo anestésico 2 (cetamina + midazolam); P3 = protocolo anestésico 3 (acepromazina + tiopental); P4 = protocolo anestésico 4 (tilemina + zolazepam). Representação dos valores do eixo y: 3 = coloração normal, 4 = hipocromia e 5= hiperchromia..... 188

**Figura 87.** Representação da mediana dos valores obtidos para reação ao pinçamento abdominal, no momento logo após a indução anestésica (0 minuto) e aos 20 minutos, momentos nos quais ocorreram diferenças significativas entre os procedimentos anestésicos ( $p<0,05$ ) em camundongos. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si. P1 = protocolo anestésico 1 (cetamina + xilazina); P2 = protocolo anestésico 2 (cetamina + midazolam); P3 = protocolo anestésico 3 (acepromazina + tiopental); P4 = protocolo anestésico 4 (tilemina + zolazepam). Representação dos valores do eixo y: 1 = presença e 2 = ausência. .... 188

**Figura 88.** Representação da mediana dos valores obtidos para reflexo de cauda, no momento logo após a indução anestésica (0 minuto) e aos 20 minutos, momentos nos quais ocorreram diferenças significativas entre os procedimentos anestésicos ( $p < 0,05$ ) em camundongos. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si. P1 = protocolo anestésico 1 (cetamina + xilazina); P2 = protocolo anestésico 2 (cetamina + midazolam); P3 = protocolo anestésico 3 (acepromazina + tiopental); P4 = protocolo anestésico 4 (tilemina + zolazepam). Representação dos valores do eixo y: 1 = presença e 2 = ausência..... 189

**Figura 89.** Média e desvio padrão dos valores de porcentagem de larvas de *Ae. aegypti* eclodidas 24 horas após os ovos depositados por fêmeas da mesma espécie, alimentadas com sangue de camundongos anestesiados com diferentes substâncias anestésicas, serem colocados para eclosão, por semana e por protocolo anestésico. .... 190

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Lista completa dos extratos vegetais, óleos vegetais e substâncias puras utilizados para a avaliação da atividade larvicida sobre *Ae. aegypti* e suas respectivas siglas. .... 51
- Tabela 2.** Dados das espécies de Annonaceae coletadas para o estudo fitoquímico e biológico. .... 54
- Tabela 3.** Rendimento dos extratos brutos das espécies de Annonaceae de Sergipe selecionadas para o estudo fitoquímico e atividade larvicida. .... 56
- Tabela 4.** Composição química dos óleos essenciais das folhas de *A. pickellii*, *A. vepretorum* e *X. laevigata*..... 71
- Tabela 5.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato APCEH sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm e 250 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas. .... 74
- Tabela 6.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato APCEH sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm e 250 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 74
- Tabela 7.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato APCEH. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ..... 76
- Tabela 8.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato APCEM sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas. .... 76



**Tabela 9.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato APCEM sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 77

**Tabela 10.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato APCEM. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ..... 79

**Tabela 11.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato APFEH sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 79

**Tabela 12.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato APFEH sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 80

**Tabela 13.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato APFEH. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 82

**Tabela 14.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato APFEM sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 83

**Tabela 15.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato APFEM sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 83

**Tabela 16.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato APFEM. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 85

**Tabela 17.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *A. pickelii* (OEAP) sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 86

**Tabela 18.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *A. pickelii* (OEAP) sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 86

**Tabela 19.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o óleo essencial de *A. pickelii* (OEAP). Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 87

**Tabela 20.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *A. pickelii* (OEAP) sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 125 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 225 ppm e 250 ppm com duração total de 240 horas (dez dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 89

**Tabela 21.** Emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *A. pickelii* (OEAP) sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 125 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 225 ppm e 250 ppm com duração total de 240 horas (dez dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 90

<b>Tabela 22.</b> Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o óleo essencial de <i>A. pickelii</i> (OEAP). Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). .....	91
<b>Tabela 23.</b> Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato AVCEEP sobre imaturos de <i>Ae. aegypti</i> , nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.....	92
<b>Tabela 24.</b> Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato AVCEEP sobre imaturos de <i>Ae. aegypti</i> a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.....	93
<b>Tabela 25.</b> Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato AVCEEP. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). .....	95
<b>Tabela 26.</b> Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato AVCEM sobre imaturos de <i>Ae. aegypti</i> , nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.....	95
<b>Tabela 27.</b> Emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato AVCEM sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.....	96
<b>Tabela 28.</b> Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato AVCEM. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). .....	98

**Tabela 29.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato AVFEEP sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 98

**Tabela 30.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato AVFEEP sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 99

**Tabela 31.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato AVFEEP. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 101

**Tabela 32.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato AVFEM sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 101

**Tabela 33.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato AVFEM sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 102

**Tabela 34.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato AVFEM. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 104

**Tabela 35.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *A. vepretorum* (OEAV) sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 105

**Tabela 36.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *A. vepretorum* (OEAV) sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 105

**Tabela 37.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o óleo essencial de *A. vepretorum* (OEAV). Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 107

**Tabela 38.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *A. vepretorum* (OEAV) sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 e 300 ppm, com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 108

**Tabela 39.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *A. vepretorum* (OEAV) sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 e 300 ppm, com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 109

**Tabela 40.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio de efetividade com o óleo essencial de *A. vepretorum* (OEAV). Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 110

**Tabela 41.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato XLCEH sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 113

**Tabela 42.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato XLCEH sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 113

**Tabela 43.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato XLCEH. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 115

**Tabela 44.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato XLCEM sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 116

**Tabela 45.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato XLCEM sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 117

**Tabela 46.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato XLCEM. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 119

**Tabela 47.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato XLFEH sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 120

**Tabela 48.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato XLFEH sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 120

**Tabela 49.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato XLFEH. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 122

**Tabela 50.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato XLFEM sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas. .... 123

**Tabela 51.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato XLFEM sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas. .... 123

**Tabela 52.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato XLFEM. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 125

**Tabela 53.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *X. laevigata* (OEXL) sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 126

**Tabela 54.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *X. laevigata* (OEXL) sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 126

**Tabela 55.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o óleo essencial de *X. laevigata* (OEXL). Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 127

**Tabela 56.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *X. laevigata* (OEXL) sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 125 ppm, 150 ppm, 175 ppm, 200 ppm, 225 ppm, 250 ppm, 275 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm e 500 ppm, com duração total de 120 horas (cinco dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 129

**Tabela 57.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *X. laevigata* (OEXL) sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 125 ppm, 150 ppm, 175 ppm, 200 ppm, 225 ppm, 250 ppm, 275 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm e 500 ppm, com duração total de 120 horas (cinco dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 130

**Tabela 58.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio de efetividade com o óleo essencial de *X. laevigata* (OEXL). Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 131

**Tabela 59.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante o primeiro bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida da substância pura (*E*)- cariofileno, sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm e 500 ppm com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 133



**Tabela 60.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida da substância pura (*E*)- cariofileno, sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm e 500 ppm com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 134

**Tabela 61.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio de efetividade com a substância pura (*E*)- cariofileno. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 136

**Tabela 62.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante o primeiro bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida da substância pura  $\alpha$ -pineno, sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm e 500 ppm com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 137

**Tabela 63.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida da substância pura  $\alpha$ -pineno, sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm e 500 ppm com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 138

**Tabela 64.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio de efetividade com a substância pura  $\alpha$ -pineno. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 140

**Tabela 65.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante o primeiro bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida da substância pura  $\beta$ -pineno, sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm e 500 ppm com duração total de 240 horas (dez dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas. .... 141

**Tabela 66.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida da substância pura  $\beta$ -pineno, sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm e 500 ppm com duração total de 240 horas (dez dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas. .... 142

**Tabela 67.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio de efetividade com a substância pura  $\beta$ -pineno. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 144

**Tabela 68.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante o primeiro bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida da substância pura óxido de cariofileno, sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm e 250 ppm, com duração de 144 horas (seis dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas. .... 144

**Tabela 69.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante o segundo bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida da substância pura óxido de cariofileno, na concentração de 300 ppm, sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 300 ppm, com duração de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas. .... 146

**Tabela 70.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com substância pura óxido de cariofileno nas concentrações de 100 e 250 ppm. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 148

**Tabela 71.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com substância pura óxido de cariofileno na concentração de 300 ppm. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 148

**Tabela 72.** Análise da atividade larvicida dos extratos vegetais e óleos essenciais da família Annonaceae e substâncias puras óxido de cariofileno, (*E*)-cariofileno,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno sobre imaturos de *Ae. aegypti*, com suas respectivas concentrações letais (CL), intervalos de confiança, qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e coeficiente angular (*Slope*) após leitura de 24 e ao término dos bioensaios. .... 149

**Tabela 73.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante o bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida dos compostos C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8, sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, na concentração de 40 µM, com duração de 96 horas (quatro dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada. .... 152

**Tabela 74.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar os compostos C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa (p<0,05). .... 154

**Tabela 75.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios preliminares realizados para avaliação da atividade larvicida dos compostos C1 e C7 e suas subunidades (SB 2, SB 3, SB4, SB 5 e SB6), na concentração de 40 µM, sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 264 horas (onze dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas. .... 155

**Tabela 76.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar os compostos C1 e C7 e suas subunidades (SB 2, SB 3, SB4, SB 5 e SB6). Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa (p<0,05). .... 156

**Tabela 77.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 200 µM, sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 96 horas (quatro dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas. .... 158

**Tabela 78.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 200 µM, sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração de 96 horas (quatro dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas. .... 158

**Tabela 79.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com o composto C7 na concentração de 200 µM. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa (p<0,05). .... 159

**Tabela 80.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 30  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 160

**Tabela 81.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 30  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 160

**Tabela 82.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com o composto C7 na concentração de 30 mM. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 161

**Tabela 83.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 20  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 162

**Tabela 84.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 20  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 163

**Tabela 85.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com o composto C7 na concentração de 20  $\mu\text{M}$ . Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 163

**Tabela 86.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 18  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 240 horas (dez dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 164

**Tabela 87.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 18  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 240 horas (dez dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 165

**Tabela 88.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com o composto C7 na concentração de 18  $\mu\text{M}$ . Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 167

**Tabela 89.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 15  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 240 horas (dez dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 168

**Tabela 90.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 15  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 240 horas (dez dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 168

**Tabela 91.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com o composto C7 na concentração de 15  $\mu\text{M}$ . Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 169

**Tabela 92.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 13 µM, sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 240 horas (dez dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 170

**Tabela 93.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 13 µM, sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 240 horas (dez dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 171

**Tabela 94.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com o composto C7 na concentração de 13 µM. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa (p<0,05). ..... 171

**Tabela 95.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 10 µM, sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 172

**Tabela 96.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 10 µM, sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 173

**Tabela 97.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com o composto C7 na concentração de 10 µM. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa (p<0,05). ..... 173

**Tabela 98.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 174

**Tabela 99.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 175

**Tabela 100.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com o composto C7 na concentração de 5  $\mu\text{M}$ . Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 175

**Tabela 101.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 176

**Tabela 102.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 177

**Tabela 103.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com o composto C7 na concentração de 1  $\mu\text{M}$ . Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). ..... 177

**Tabela 104.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 40 µM, sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu (F3), com duração total de 192 horas (oito dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 178

**Tabela 105.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 40 µM, sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu, a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 192 horas (oito dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 179

**Tabela 106.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com o composto C7 na concentração de 40 µM sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa (p<0,05). ..... 180

**Tabela 107.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida da subunidade 3 (SB3), na concentração de 30 µM, sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu (F3), com duração total de 144 horas (seis dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 180

**Tabela 108.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida da subunidade 3 (SB3), na concentração de 30 µM, sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu, a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 144 horas (seis dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas..... 181

**Tabela 109.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com a subunidade 3 (SB3) sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu, na concentração de 30 µM. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa (p<0,05). ..... 182



<b>Tabela 110.</b> Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida da subunidade 3 (SB3), na concentração de 20 µM, sobre imaturos de <i>Ae. aegypti</i> da população de Foz do Iguaçu (F3), com duração total de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.....	182
<b>Tabela 111.</b> Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida da subunidade 3 (SB3), na concentração de 20 µM, sobre imaturos de <i>Ae. aegypti</i> da população de Foz do Iguaçu, a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.....	183
<b>Tabela 112.</b> Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade subunidade 3 (SB3) sobre imaturos de <i>Ae. aegypti</i> da população de Foz do Iguaçu, na concentração de 20 µM. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa (p<0,05). .....	183
<b>Tabela 113.</b> Média e desvio padrão dos valores de tempo de latência e de recuperação (em minutos) dos produtos em camundongos anestesiados por protocolos anestésicos.....	185
<b>Tabela 114.</b> Média e desvio padrão dos valores de porcentagem de larvas de <i>Ae. aegypti</i> eclodidas em 24 horas após os ovos serem colocados para eclosão, por semana e por protocolo anestésico. ....	189
<b>Tabela 115.</b> Valores normais de frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (TR) apresentados para camundongos ( <i>Mus musculus</i> ). .....	197

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	37
1.1 DENGUE .....	37
1.2 PROGRAMAS DE CONTROLE DE <i>Ae. aegypti</i> NO BRASIL.....	40
1.3 RESISTÊNCIA DE <i>Ae. aegypti</i> A INSETICIDAS .....	42
1.4 MÉTODOS COMPLEMENTARES A ORGANOFOSFORADOS PARA O CONTROLE DE <i>Ae. aegypti</i> .....	44
1.5 INSETICIDAS BOTÂNICOS DA FAMÍLIA ANNONACEAE .....	46
1.6 CAMUNDONGOS UTILIZADOS COMO FONTE DE ALIMENTAÇÃO SANGUÍNEA PARA FÊMEAS ADULTAS DE <i>Ae. aegypti</i> EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO .....	47
1.7 JUSTIFICATIVA .....	49
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	50
2.1 OBJETIVO GERAL .....	50
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	50
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	51
3.1 SUBSTÂNCIAS, ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS UTILIZADOS PARA A REALIZAÇÃO DE BIOENSAIOS DE DETECÇÃO DE ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE <i>Ae. aegypti</i> .....	51
3.2 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO PROCESSADO NA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE (UFS) .....	52
3.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS DAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA ANNONACEAE .....	55
3.4 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA ANNONACEAE E METODOLOGIA DE ANÁLISE .....	56
3.5 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM) .....	57
3.6 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A UM DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMAS (CG-DIC) .....	59
3.7 PADRÕES DE MONOTERPENOS E SEQUITERPENOS .....	59
3.8 PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS EXTRATOS VEGETAIS E ÓLEOS ESSENCIAIS DA FAMÍLIA ANNONACEAE E SUBSTÂNCIAS .....	60

3.9	PREPARAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS PROCESSADAS NA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCAR) .....	60
3.10	MANEJO DAS LARVAS .....	60
3.11	BIOENSAIOS .....	61
3.11.1	Atividade larvicida e verificação do período de atividade larvicida dos extratos vegetais e óleos essenciais da família Annonaceae e substâncias puras .....	61
3.11.2	Atividade larvicida e verificação do período de atividade larvicida das substâncias processados na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) .....	63
3.12	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS DE LABORATÓRIO DESTINADOS AO PROCEDIMENTO DE REPASTO SANGUÍNEO POR FÊMEAS DE <i>Ae. aegypti</i> .....	64
3.13	OBTENÇÃO DOS MOSQUITOS DESTINADOS AO PROCEDIMENTO DE REPASTO SANGUÍNEO POR FÊMEAS DE <i>Ae. aegypti</i> .....	65
3.14	PROTOCOLOS ANESTÉSICOS .....	66
3.15	PROCEDIMENTO DE REPASTO SANGUÍNEO .....	66
3.16	AVALIAÇÃO E MONITORAMENTO DOS ANIMAIS DURANTE E APÓS O PROCEDIMENTO DE REPASTO SANGUÍNEO .....	67
3.17	EUTANÁSIA .....	68
3.18	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS OVOS DE <i>Ae. aegypti</i> .....	68
3.19	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	69
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>70</b>
4.1	ESTUDO QUÍMICO: COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DAS ESPÉCIES <i>Annona pickelii</i> (OEAP), <i>Annona vepretorum</i> (OEAV) e <i>Xylopiia laevigata</i> (OEXL) .....	70
4.2	ATIVIDADE LARVICIDA E VERIFICAÇÃO DO PERÍODO DE ATIVIDADE LARVICIDA DOS EXTRATOS VEGETAIS E ÓLEOS ESSENCIAIS DA FAMÍLIA ANNONACEAE E SUBSTÂNCIAS PURAS.....	72
4.3	ATIVIDADE LARVICIDA E VERIFICAÇÃO DO PERÍODO DE ATIVIDADE LARVICIDA DAS SUBSTÂNCIAS PROCESSADAS NA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCar) .....	151
4.4	AVALIAÇÃO E MONITORAMENTO DOS ANIMAIS DURANTE E APÓS O PROCEDIMENTO DE REPASTO SANGUÍNEO .....	184

4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS OVOS DE <i>Ae. aegypti</i> .....	189
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	191
5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DAS ESPÉCIES <i>A. pickelii</i> (OEAP), <i>A. vepretorum</i> (OEAV) e <i>X. laevigata</i> (OEXL) ....	191
5.2 ATIVIDADE LARVICIDA E VERIFICAÇÃO DO PERÍODO DE ATIVIDADE LARVICIDA DOS EXTRATOS VEGETAIS E ÓLEOS ESSENCIAIS DA FAMÍLIA ANNONACEAE E SUBSTÂNCIAS PURAS .....	192
5.3 AVALIAÇÃO E MONITORAMENTO DOS ANIMAIS DURANTE E APÓS O PROCEDIMENTO DE REPASTO SANGUÍNEO .....	197
5.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS OVOS DE <i>Ae. aegypti</i> .....	201
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	202
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	203
<b>8 ANEXOS</b> .....	214

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 DENGUE

O agente etiológico causador do dengue é um vírus, transmitido por vetores artrópodes, pertencente ao gênero *Flavivirus*, família Flaviridae. Atualmente são conhecidos quatro sorotipos do vírus: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2002).

O vírus do dengue é transmitido ao ser humano através da picada de fêmeas dos mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* o único vetor de importância epidemiológica nas Américas, onde a circulação do vírus já se estabeleceu desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina. Existem 2,5 bilhões de pessoas vivendo em áreas de risco endêmico do dengue em todo o mundo e podem surgir, a cada ano, 50 milhões de novos casos de dengue (WHO, 2011a).

Depois que o hospedeiro é infectado, as primeiras manifestações clínicas da febre do dengue, como febre alta com início abrupto, dor de cabeça, dores musculares e nas articulações, manchas cutâneas avermelhadas e eruptivas com presença ou não de prurido, perda de apetite e consequente perda de peso, náuseas, vômitos e diarreia, demoram de 4 a 10 dias para aparecerem. Pode ocorrer evolução para o quadro da febre do dengue hemorrágico, com manifestações hemorrágicas por todo o corpo ao final do período febril somada aos sinais anteriormente descritos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2005).

Com hábitos diurnos e característica antropofílica, o vetor *Ae. aegypti* compartilha o mesmo ambiente que o homem, desenvolvendo seus criadouros em recipientes artificiais que viabilizem o acúmulo de água, como pneus, tambores para armazenamento de água para consumo humano e demais materiais recicláveis descartados incorretamente (RAJU, 2003).

A atual situação epidemiológica do dengue no continente americano assemelha-se ao encontrado no sudeste asiático, onde as causas da reemergência da doença são de origem social e demográfica. Inúmeros assentamentos informais e desordenados em grandes centros urbanos e com alta densidade populacional, onde água potável, saneamento e coleta adequada de

lixo não são acessíveis, tem proporcionado criação de ambientes ideais para reprodução do mosquito transmissor do dengue (GUZMAN & KOURI, 2003).

No Brasil, as primeiras ocorrências de epidemia de dengue datam de 1982, com a identificação dos vírus DEN-1 e DEN-4 em Roraima. Como o vetor *Ae. aegypti* ainda não estava disperso pelo território brasileiro, o vírus do dengue não se expandiu para outras áreas. O sorotipo DEN-1 foi reintroduzido no estado do Rio de Janeiro somente em 1986, enquanto a reintrodução dos sorotipos DEN-2 e DEN-3 ocorreram, respectivamente, em 1990 e em 2001 (BARRETO & TEIXEIRA, 2008).

Um levantamento realizado por Coelho (2012), utilizando dados obtidos em relatórios elaborados por Secretarias Estaduais de Saúde de todo o país, mostra que, em 13 anos, houve um aumento significativo no número de cidades brasileiras infestadas pelo vírus do dengue, saltando de 1.753 cidades, em 1996, para 4.000, em 2009.

De janeiro a março de 2011 a Secretaria de Vigilância em Saúde já havia registrado 254.734 casos notificados de dengue no Brasil, sendo que a região Sudeste possuía o maior número de casos registrados (32%), seguido pela região Norte (30%), Nordeste (19%), Sul (11%) e Centro-Oeste (8%). Em comparação ao mesmo período de 2010, constatou-se diminuição de 43% do total de casos notificados. Das amostras coletadas e diagnosticadas positivas para dengue, 73,1% era do sorotipo DEN-1. No Sul, 100% das amostras foram positivas para o sorotipo DEN-1, enquanto sorotipo DEN-4 foi isolado nos estados do Rio de Janeiro, Pernambuco, Piauí, Pará, Roraima e Amazonas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2011).

Nesse mesmo período, foram confirmados 5.684 casos de dengue no Paraná, sendo 5.508 autóctones e 176 importados; e 76,7% dos casos se concentraram em quatro municípios, em ordem decrescente de números de casos detectados: Londrina, Foz do Iguaçu, Cornélio Procópio e Jacarezinho. A taxa de letalidade para o período foi de 22,2%, com 10 casos de óbitos confirmados (SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE, CURITIBA, 2011).

De acordo com o levantamento da Secretaria da Saúde do Estado do Paraná, entre agosto de 2010 e julho de 2011, foram notificados 29.207 casos confirmados de dengue, sendo 28.511 casos autóctones e 696 casos importados. Foram confirmados 14 óbitos, sendo oito mortes causadas por febre do dengue e

seis mortes por febre hemorrágica do dengue (taxa de letalidade de 6,01%). A taxa de incidência no Estado foi de 273,10 casos por 100.000 habitantes (28.511/10.439.601 hab.), considerada média (100 a 300 casos/100.000 hab.) pelo Ministério da Saúde. Comparando os casos notificados no período 2010/2011 (65.649), em relação aos dados no mesmo período de 2009/2010 (61.591), observou-se um aumento de 6,6%. Quanto aos confirmados autóctones houve redução de 13% dos casos no período 2010/2011 comparado ao mesmo período de 2009/2010 (SESA, 2011a).

Entre agosto e dezembro de 2011, o estado do Paraná registrou uma queda de 78% nos casos autóctones de dengue (191 casos), em relação ao mesmo período de 2010 (887 casos). O balanço aponta ainda uma diminuição de 75% nos casos totais (autóctones e importados), em comparação ao mesmo período de 2010, apesar do aumento no número de notificações registradas no período em questão (10.317 em 2011 contra 7.108 em 2010). A taxa de incidência no estado para o período foi de 1,83 casos por 100.000 habitantes (191 casos/10.439.601 hab.), considerada baixa (menor que 100 casos/100.000 hab.) pelo Ministério da Saúde (SESA, 2011b).

O dengue não possui cura e, devido à imunidade homóloga que cada sorotipo do vírus confere ao seu hospedeiro, o desenvolvimento de vacinas para a doença é dificultado, pois torna-se necessário o desenvolvimento de vacinas polivalentes (BRICKS, 2004).

Na ausência de uma vacina eficaz contra o dengue, o único método atualmente disponível ao combate da doença é o controle do mosquito *Ae. aegypti*. Para tal, faz-se necessário a implementação de programas integrados de vigilância epidemiológica, educação ambiental, assim como a integração com a sociedade em ações destinadas a redução de potenciais locais de desenvolvimento de formas imaturas do vetor (WHO, 2011b). Ao poder público cabem as ações contra a deficiência de saneamento básico e ocupação desordenada dos espaços urbanos, assim como acesso à água potável e coleta e destino do lixo realizado de forma adequada (CONASS, 2011).

## 1.2 PROGRAMAS DE CONTROLE DE *Ae. aegypti* NO BRASIL

No Brasil, os programas de controle ao vetor *Ae. aegypti* possuem como base a integração entre ações de vigilância epidemiológica, manejo ambiental através da eliminação dos criadouros do mosquito e armadilhas, controle biológico e controle químico com uso de inseticidas e repelentes (BRAGA & VALLE, 2007a).

Já na década de 1930 os programas de controle ao mosquito *Ae. aegypti* foram implantados em todos os países das Américas nos quais havia a presença do vetor, sendo essa espécie quase totalmente erradicada do continente entre o final da década de 1940 e metade de 1950. No Brasil a primeira erradicação do vetor ocorreu em dois de abril de 1955. Porém em 1967 o mosquito foi reintroduzido no país, pelo estado do Pará. Novamente o vetor foi eliminado do país em 1973 e, devido a falhas na vigilância epidemiológica do país, o mosquito foi reintroduzido em 1976 pelos estados do Rio Grande do Norte e Rio de Janeiro. O crescimento acelerado do país associado a mudanças sociais e ambientais decorrentes da intensa urbanização das cidades proporcionou excelentes condições de desenvolvimento e sobrevivência ao mosquito *Ae. aegypti*. Desde então, o ministério da Saúde tem implementado programas de controle ao vetor. Em 2002 implantou-se o Programa Nacional de Controle do Dengue (PNCD), após introdução do sorotipo DEN-3 no país e sua rápida disseminação pelo país em curto espaço de tempo (BRAGA & VALLE, 2007b; GUBLER, 2011).

Em vigência atualmente, o PNCD visa a elaboração de ações permanentes de controle do vetor, através das seguintes frentes de atuação: (1) vigilância epidemiológica, subdividida em vigilância dos casos de dengue, vigilância laboratorial, vigilância em áreas de fronteira e vigilância entomológica; (2) combate ao vetor *Ae. aegypti*, através da utilização de inseticidas químicos; (3) assistência aos pacientes com dengue, com finalidade de reduzir, principalmente, a ocorrência das formas graves da doença; (4) integração com o sistema de atenção básica a saúde, órgão responsável pela notificação imediata da ocorrência de casos de dengue; (5) ações de saneamento ambiental, para correto fornecimento de água tratada, coleta e destinação dos resíduos sólidos e armazenamento de água em domicílio; (6) ações integradas de educação em saúde e mobilização social; (7) capacitação de recursos humanos voltados às



ações educativas; (8) fornecimento de suporte ao programa através de legislação; (9) sustentação política e social, assegurando o aporte financeiro necessário à implantação e execução do programa; e (10) acompanhamento permanente a execução das ações do PNCD, avaliação dos resultados obtidos e redirecionamento de novas estratégias adotadas (FUNASA, 2002; SILVA *et al.*, 2008).

A erradicação do vetor tornou-se inviável a médio prazo devido a grande disponibilidade de depósitos artificiais, gerados pela estrutura urbana em constante crescimento, grande facilidade de dispersão do inseto, deficiência nas ações de saneamento básico, assim como o aspecto sócio- econômico e cultural da sociedade. Contudo, programas destinados ao controle do dengue são incapazes de obter sucesso quando são focados basicamente no combate químico ao vetor, sem haver estímulo à participação da comunidade nas medidas de controle do inseto e integração entre os diversos setores públicos de atendimento á população, com poucos recursos de análise epidemiológica. Atualmente, a dificuldade para a implantação de levantamentos rápidos de índice de infestação por *Ae. aegypti* nos municípios contemplados pelas ações do PNCD revela a importância do desenvolvimento de estratégias eficientes para o combate ao vetor, assim como maior envolvimento das Secretarias Estaduais de Saúde atuando em conjunto com a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (FERREIRA *et al.*, 2009).

Dados obtidos por Pessanha *et al.* (2009) revelaram que no período entre 2003 e 2006, as ações estabelecidas pelo PNCD não foram alcançadas em boa parte dos municípios classificados como prioritários no combate a dengue das regiões Sudeste e Centro-Oeste. As taxas de redução de 50% no número de casos de 2003 em relação a 2002 e nos anos seguintes (25% a cada ano), estabelecidas inicialmente pelo programa, não foram alcançadas em 49% municípios prioritários analisados. Ainda, para 22,6% dos municípios, a taxa de letalidade ficou acima do limite preconizado de 1% após início do PNCD.

As dificuldades atuais para o combate ao mosquito vetor do dengue relacionadas ao poder público incluem as atividades de vigilância sanitária em nível municipal, que necessitam de legislação de apoio, aliadas as práticas de fiscalização; a ampliação e regularização do abastecimento de água encanada e da coleta frequente de lixo, com destinação adequada; e finalmente, a atenção à

informação e educação da população sobre a necessidade e as formas de reduzir os fatores domiciliares que favorecem a proliferação do inseto (GUBLER, 2002).

Já que o controle de vetores tem sido a única opção para reduzir a incidência do dengue, é fundamental o desenvolvimento de indicadores epidemiológicos e entomológicos para obtenção de sucesso das ações de campo, como a aplicação de inseticidas. O controle químico ainda assume papel importante na estratégia de controle de *Ae. aegypti* desenvolvida no Brasil (DONALÍSIO & GLASSER, 2002; PAUL *et al.*, 2006).

Atualmente o combate ao vetor encontra, ainda, uma nova barreira, referente á resistência crescente dos insetos aos inseticidas químicos atualmente utilizados nas atividades de controle no país. Portanto, faz-se necessário o monitoramento da resistência dos mosquitos aos compostos químicos, assim como pesquisas constantes para o desenvolvimento de novos produtos inseticidas, eficazes e ecologicamente seguros (TAUIL, 2002).

### **1.3 RESISTÊNCIA DE *Ae. aegypti* A INSETICIDAS**

Inseticidas químicos ainda são uma ferramenta importante no controle do vetor da dengue. Aprovado pela Organização Mundial da Saúde para utilização em água potável, o inseticida organofosforado temefós tem sido o inseticida mais utilizado no Brasil, tendo seu uso intensificado a partir de 1986 (MCCALL & KITTAYAPONG, 2006).

Os primeiros estudos realizados para verificação da resistência de *Ae. aegypti* a inseticidas foi com populações de mosquito do estado de São Paulo e Rio de Janeiro, já na segunda metade da década de 1990. A rede MoReNAa (Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Ae. aegypti* a Inseticidas), atualmente incorporada ao PNCD, foi então instituída em 1999, com o objetivo de agregar laboratórios de referência para a realização de avaliações da suscetibilidade do vetor da dengue a inseticidas, através de bioensaios (BRAGA & VALLE, 2007c).

Atualmente, existem inúmeros estudos sobre populações de *Ae. aegypti* resistentes a inseticidas em vários estados brasileiros, como Rio Grande do Norte, Sergipe (MONTELLA *et al.*, 2007), Alagoas, Rio de Janeiro (BRAGA *et al.*,

2007) Paraíba (BESERRA *et al.*, 2007), Ceará (LIMA *et al.*, 2006), São Paulo (MARCORIS *et al.*, 2003) e Distrito Federal (PROPHIRO *et al.*, 2011).

Sob pressão do intenso uso de inseticidas, uma população de mosquito pode desenvolver resistência aos compostos, resultado do efeito seletivo dos mesmos, matando indivíduos suscetíveis e mantendo vivos os indivíduos resistentes, possibilitando, ainda, a transferência de tal capacidade de resistência a seus descendentes (DONALÍSIO & GLASSER, 2002).

A resistência dos insetos a inseticidas é um tema central de discussão atualmente, uma vez que tal característica dificulta ou até mesmo inviabiliza programas de controle destinados ao vetor *Ae. aegypti*. O nível de resistência dos organismos depende da concentração, frequência e tempo aos quais foram expostos ao inseticida (PAUL *et al.*, 2006; REGIS *et al.*, 2009).

Os mecanismos desenvolvidos pelo vetor que estão relacionados à resistência incluem a redução da penetração do inseticida por alterações na cutícula, aumento do metabolismo capaz de inibir a ação inseticida pela atividade de enzimas esterases, monoxigenases e glutathion S-transferase, modificação do sítio alvo do inseticida e/ou comportamental. Ainda assim, esses são mecanismos inespecíficos, que podem conferir resistência cruzada a várias classes de inseticidas estruturalmente relacionados (GUIRARDO & BICUDO, 2009).

A resistência é uma característica genética herdada e caracterizada pela frequência em que genes alelos que a conferem aparecem em uma população, resultado do efeito seletivo do uso de inseticidas, podendo gerar indivíduos capazes de tolerar doses que normalmente causariam a morte. A medida em que aumenta o número de gerações por ano, mais rápido se estabelece níveis de resistência em uma população (COLEMAN & HEMINGWAY, 2007). O próprio inseticida não produz mudanças genéticas, mas o seu uso de forma indiscriminada pode selecionar indivíduos resistentes (BRAGA & VALLE, 2007a).

A capacidade dos insetos em tolerar concentrações destes produtos inicialmente letais, promove a redução gradual na eficácia dos produtos até a sua completa ineficiência, incitando, conseqüentemente, o desenvolvimento de estudos voltados à formulação de novas substâncias alternativas com capacidade inseticida (MACIEL *et al.*, 2010).

#### **1.4 MÉTODOS COMPLEMENTARES A ORGANOFOSFORADOS PARA O CONTROLE DE *Ae. aegypti***

Dentre as estratégias complementares ao uso de inseticidas organofosforados para o controle ao *Ae. aegypti* no Brasil, destaca-se a utilização de substâncias químicas reguladoras de crescimento (IGR, derivada de Insect Growth Regulator), seletivos contra artrópodes e de baixa toxicidade a mamíferos, que atuam nas fases de desenvolvimento do inseto, interferindo no processo normal de crescimento e inviabilizando a emergência dos adultos (FOURNET *et. al.*, 1997).

Os IGR mais comumente utilizados no combate ao vetor do dengue pertencem aos grupos de inseticidas inibidores de síntese de quitina - que alteram o sistema hormonal de produção de quitina, inibindo sua síntese e resultando na má formação de cutícula a cada muda do vetor - e análogos ao hormônio juvenil – que são compostos quimicamente semelhantes ao hormônio juvenil produzido por insetos, afetam o sistema endócrino e induzem a incompleta metamorfose do mosquito (VALLE *et. al.*, 2008).

Embora possuam mecanismos de ação completamente diferentes dos demais inseticidas químicos, já existem relatos de ocorrência de resistência de *Ae. aegypti* aos IGR associada à ativação de enzimas esterases, oxidases de função mista e monoxigenases, sendo esse o mesmo mecanismo que confere resistência do mosquito aos inseticidas organofosforados (BRAGA *et. al.*, 2005; MORRISON, 2008).

Adicionalmente, o controle biológico de larvas do vetor pela ingestão da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*, variedade *israelensis* (*Bti*) caracteriza-se como mais uma alternativa complementar aos programas de controle ao mosquito *Ae. aegypti*. A atividade inseticida dessa bactéria é dada através de proteinases tóxicas, encontradas sob forma de cristais no interior da célula bacteriana, liberadas por dissolução dentro do aparelho digestório da larva, provocando a lise das células do intestino médio do inseto, assim como a interrupção de secreções normais do epitélio e consequente diminuição do pH do lúmen, favorecendo a liberação dos cristais de conteúdo tóxico, culminando com a morte do inseto (POLANCZYK *et al.*, 2003; MCCALL E KITTAYAPONG, 2007).

Contudo, existem empecilhos quanto ao uso desse método em maiores escalas, ao considerar: (1) altos custos de produção e baixo efeito residual do *Bti* devido à exposição direta à luz solar, ocasionando a inativação da toxina pela radiação ultravioleta; (2) reduzidas taxas de ingestão das toxinas pelas larvas por competição, devido à presença de maiores quantidades de partículas sólidas e coliformes fecais presentes na água e/ou por maior densidade larval; (3) a influência da temperatura que, abaixo de 20° C, reduz a atividade metabólica do mosquito, diminuindo as taxas de ingestão do bacilo; e (4) dificuldade de utilização do larvicida em ralos e calhas, onde o preparado flutua e é facilmente eliminado. Ainda assim, a utilização de *Bti* possui vantagens por não poluir o ambiente, preservar a fauna associada aos criadouros do mosquito e ser atóxico ao ser humano e animais (DUQUE & NAVARRO-SILVA, 2006; ESPINDOLA *et al.*, 2008).

A utilização deste inseticida biológico constitui uma alternativa a ser utilizada em alternância com demais inseticidas químicos, prevenindo o desenvolvimento de resistência do mosquito a estas substâncias e aumentando a eficiência do combate ao vetor (VILARINHOS *et al.*, 2003; OCAMPO *et al.*, 2009).

Nesse contexto, ainda, o controle mecânico também caracteriza-se como um importante método complementar de combate ao *Ae. aegypti*, baseando-se em medidas capazes de eliminar adequadamente os criadouros do mosquito, impedindo, assim, a sua reprodução e propagação (BALLENGER-BROWNING & ELDER, 2009). Para obtenção de êxito nesse tipo de controle ao vetor, tais medidas demandam ações preventivas ininterruptas por parte da população (GUBLER & CLARK, 1996; TEIXEIRA *et al.*, 2002; FORATTINIA & BRITO, 2003; CLARO *et al.*, 2004; LENZI & COURA, 2004; SANCHEZ *et al.*, 2005; FAVIER *et al.*, 2006; PEREZ *et al.*, 2007; TOLEDO *et al.*, 2007; MORRISON *et al.*, 2008; SERPA *et al.*, 2010).

Utilizada como instrumento de apoio técnico, a vigilância entomológica desempenha um papel decisivo dentro de programas de controle ao *Ae. aegypti*, ao fornecer indicadores que auxiliem na tomada de decisões e operacionalização de medidas para a eliminação - mecânica, química e biológica - do mosquito. A contínua coleta de informações acerca das características biológicas e ecológicas do inseto proporciona o desenvolvimento de conhecimento adequado capaz de

identificar alterações na forma de transmissão de doenças pelo vetor (MARZOCHI, 2004; LAGROTTA *et al.*, 2008; COELHO, 2012).

### 1.5 INSETICIDAS BOTÂNICOS DA FAMÍLIA ANNONACEAE

Com característica de seleção recíproca entre organismos interdependentes, as plantas produzem substâncias inseticidas e antimicrobianas como resultado dos mecanismos de defesa desenvolvidos contra insetos predadores. Alcalóides, terpenóides e derivados de fenilpropanóides são substâncias de baixo peso molecular, oriundos do metabolismo secundário das plantas e os principais constituintes envolvidos nas interações planta-inseto (BARRETO, 2005).

Tendo em vista a grande diversidade botânica existentes no Brasil, estudos a partir de extratos vegetais, que são meios pelos quais se consegue extrair metabólitos provenientes do metabolismo secundário de plantas, surgem como alternativa de encontrar substâncias com propriedades inseticidas sobre *Ae. aegypti* (FURTADO *et al.*, 2005).

A Família Annonaceae possui 130 gêneros e 2.500 espécies descritas (RICHARDSON, 2004), sendo 26 gêneros e 260 espécies encontradas no Brasil (MAAS *et al.*, 2001). Presente na região dos trópicos, essa Família de planta, além de poder ser cultivada em diversas regiões, tem atraído a atenção desde a década de 1980 devido à presença de acetogeninas, alcalóides, óleos essenciais, flavonóides, diterpenos e lignóides obtidos das folhas, caule e sementes de várias espécies, com destaque a atividade inseticida que possui (LEBOEUF, *et al.*, 1982; SIEBRA *et al.*, 2006; CASTILLO-SÁNCHEZ *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2011).

É sabido que as acetogeninas atuam nas mitocôndrias, bloqueando a cadeia respiratória pela inibição do complexo I (também conhecido como complexo NADH: redutase ubiquinona), principal mecanismo de produção de energia na célula, ocasionando a diminuição dos níveis de ATP e afetando diretamente o transporte de elétrons na mitocôndria, levando, por fim, à morte celular (ZAFRA-POLO *et al.*, 1998; BERMEJO *et al.*, 2005).

O emprego de substâncias extraídas de plantas com propriedades inseticidas possuem inúmeras vantagens quando comparado aos sintéticos, como

a obtenção de inseticidas botânicos através de recursos renováveis e rapidamente degradáveis, a não detecção de desenvolvimento da resistência pelos insetos a essas substâncias, fácil extração, baixo custo de produção e não acumulam resíduos em alimentos (MACIEL *et al.*, 2010).

Dentre todas as espécies da família Annonaceae, apenas sete têm sido classificadas como substâncias de forte atividade larvicida contra mosquitos, sendo quatro delas pertencentes ao gênero *Annona* (MAGADULA *et al.*, 2009). Diversos estudos têm comprovado a eficiência de extratos vegetais e óleos essenciais de espécies da Família Annonaceae contra formas imaturas de *Ae. aegypti* (BOBADILLA *et al.*, 2005; MAGADULA *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2011 e OLIVEIRA *et al.*, 2011).

## **1.6 CAMUNDONGOS UTILIZADOS COMO FONTE DE ALIMENTAÇÃO SANGUÍNEA PARA FÊMEAS ADULTAS DE *Ae. aegypti* EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

A transmissão do vírus do dengue ocorre no momento em que o a fêmea do inseto, e somente ela, realiza a alimentação sanguínea, necessária para o amadurecimento dos seus ovos. O número de postura de ovos por fêmeas de *Ae. aegypti* está diretamente relacionado com a quantidade de sangue ingerido. Sob condições favoráveis o embrião está apto a eclodir por volta de quatro a sete dias após a oviposição. Quando completamente amadurecido, o ovo resiste às situações adversas como dessecação, baixa de temperatura e insolação, realizando a diapausa. Assim, o ovo de *Ae. aegypti* resiste meses ou anos no ambiente, só eclodindo ao contato com a água (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Em condições naturais, o estudo do desenvolvimento e comportamento de *Ae. aegypti*, com o objetivo de fornecer informações que auxiliem no planejamento de ações para o controle do vetor, é uma tarefa difícil. Um dos requisitos básicos para o sucesso dessas ações de controle ao inseto é a criação e manutenção de colônias de *Ae. aegypti* sob condições controladas de laboratório. Há a necessidade de criá-los para a obtenção de quantidade suficiente de ovos desta espécie, para posterior eclosão de larvas, com o objetivo

de realizar ensaios biológicos com produtos de potencial ação larvicida. Para tal, faz-se necessário a parceria e manutenção paralela do biotério, local responsável pelo fornecimento de animais a serem empregados como fonte de sangue para a realização do repasto sanguíneo aos insetos (PINA *et al.*, 1999).

Segundo Greenberg (1950), não há relatos na literatura de que fêmeas adultas de *Ae. aegypti* sejam capazes de realizar oviposição de ovos viáveis sem que haja alimentação sanguínea.

Por motivo específico do projeto em questão, além de muitos outros que utilizam-se de animais para obtenção de resultados científicos, a experimentação animal reveste-se de uma importância incalculável nas pesquisas científicas, contribuindo para o desenvolvimento da ciência e tecnologia (SIMÕES *et al.*, 2008).

Entretanto, na literatura não são encontrados relatos referentes a utilização de camundongos como fonte de repasto sanguíneo para fêmeas de *Ae. aegypti* aprovados por comitês de ética em experimentação animal.

Assim como os seres humanos, o animal de laboratório destinado a auxiliar em pesquisas científica possui a propriedade de perceber as modificações do meio externo e interno e de reagir a elas de maneira adequada, sendo, portanto, classificado como portador de sensibilidade. É necessário pesquisar subsídios para a escolha mais adequada ao manejo do animal e que seja adaptada aos propósitos da investigação científica. Alguns preceitos devem ser observados, destacando-se a facilidade da alimentação, do manuseio, da execução do procedimento técnico e o custo operacional (SCHNAIDER & SOUZA, 2003).

Embora os animais submetidos a um estímulo nociceptivo não tenham capacidade de se comunicar verbalmente quando da ocorrência da dor, eles são capazes de exibir respostas comportamentais, motoras e fisiológicas semelhantes às observadas em seres humanos. Quando a utilização de animais é necessária para experimentos científicos que implique em dor ou desconforto, o animal de laboratório necessita, por questões de melhor manejo e, acima de tudo, humanitárias, ser submetido à anestesia (PERAZA *et al.*, 2007)

Ser ético no tratamento com animais não é uma opção, mas sim uma obrigação daqueles que desejam fazer ciência. Devem-se utilizar seres vivos somente nos casos em que o resultado gerado seja fundamental para salvar



muito mais vidas do que aquelas que estão sendo finalizadas durante a fase de experimentação (TABORDA *et al.*, 2004).

A regulamentação do uso de animais em pesquisa está fundamentada na preocupação em não se infringir sofrimento. Atualmente no Brasil os animais de laboratório estão protegidos por leis a nível federal. Aprovada pelo Governo Federal em 1998, a Lei contra Crimes Ambientais nº 9.605 considera crime “praticar ato de abuso, maus-tratos, ferir ou mutilar animais silvestres, domésticos ou domesticados, nativos ou exóticos, além de realizar experiências dolorosas ou cruéis em animal vivo, ainda que para fins didáticos ou científicos, quando existirem alternativas”. Em 2008 o Conselho Federal de Medicina Veterinária instituiu a Resolução nº 879, que dispõe sobre a normatização do uso de animais sencientes em ensino e pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. Outras leis que baseiam-se na premissa de crime contra animais são a Lei Federal nº 11.794, de 08 de outubro de 2008 e o Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009. Para o estado do Paraná, ainda, existe a Lei estadual nº 14037, de 20 de março de 2003 (BONES *et. al.*, 2010; BRASIL, 1998, 2008; 2009; CFMV, 2008; PARANÁ, 2003).

## 1.7 JUSTIFICATIVA

Diante de grande incidência do dengue, apesar da diminuição do número de casos da doença entre os anos 2010 e 2011, e da alta dispersão e densidade de *Ae. aegypti*, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos alternativos aos organofosforados, inseticidas estes ainda muito utilizados no Brasil e com alta razão de resistência pelo mosquito em muitas regiões do país.

Da necessidade em realizar inúmeros bioensaios para a detecção da atividade larvicida de novos compostos sobre o vetor em questão, a criação de *Ae. aegypti* em laboratório é de extrema importância, com objetivo de obter ovos em grande escala. Para tal, alternativas de fármacos anestésicos devem ser estudadas, objetivando a eliminação do desconforto e de fontes de estresse em camundongos destinados ao repasto sanguíneo realizado por fêmeas de *Ae. aegypti*, sem haver danos aos ovos pelas drogas administradas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar a atividade larvicida de novos compostos, sob condições de laboratório, contra *Aedes aegypti*; e elaboração de procedimentos anestésicos para administração em camundongo variedade Swiss (*Mus Domesticus*) utilizados como fonte de alimentação sanguínea para fêmeas adultas de *Aedes aegypti* em condições de laboratório.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Avaliar a ação inseticida sobre imaturos de *Ae. aegypti* de extratos, óleos essenciais e substâncias puras de representante da família Annonaceae;
2. Avaliar a ação inseticida sobre imaturos de *Ae. aegypti* de compostos produzido pelo Laboratório de Fotoquímica Inorgânica e Bioinorgânica, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar);
3. Determinação das concentrações letais (CL50, CL90 e CL99) das larvas de *Ae. aegypti*, provenientes das colônias controle e silvestre, expostas aos extratos e óleos essenciais representante da família Annonaceae e substâncias puras;
4. Determinar o período de atividade larvicida dos compostos sobre as larvas de terceiro ínstar final e/ou quarto ínstar inicial;
5. Avaliação dos diferentes procedimentos anestésicos a serem utilizados para camundongo variedade Swiss (*Mus Domesticus*), utilizando como preceito a alteração dos parâmetros fisiológicos normais dos animais utilizados;
6. Avaliar a viabilidade de ovos de *Aedes aegypti* depositados por fêmeas quando alimentadas com sangue de animais expostos a diferentes procedimentos anestésicos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 SUBSTÂNCIAS, ÓLEOS VEGETAIS E EXTRATOS VEGETAIS UTILIZADOS PARA A REALIZAÇÃO DE BIOENSAIOS DE DETECÇÃO DE ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Ae. aegypti*

Para melhores esclarecimentos, as amostras utilizadas para avaliação da atividade larvicida sobre *Ae. aegypti* estão identificadas na Tabela 1. As amostras de extratos vegetais, substâncias puras e óleos essenciais das espécies de Annonaceae foram procedentes da Universidade Federal de Sergipe, sob responsabilidade do Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa. As demais substâncias sem identificação de origem, representados somente pelo nome de “composto”, são procedentes da Universidade Federal de São Carlos, sob responsabilidade da Prof. Dra. Rose Maria Carlos e do Prof. Dr. Francisco de Assis Marques (Departamento de Química – Universidade Federal do Paraná). Como tais substâncias estão sob processo de patente, a origem e forma de obtenção dos mesmos não poderá ser identificada e apresentada neste documento.

**Tabela 1.** Lista completa dos extratos vegetais, óleos vegetais e substâncias puras utilizados para a avaliação da atividade larvicida sobre *Ae. aegypti* e suas respectivas siglas.

COMPOSTOS	SIGLA
<b>EXTRATOS VEGETAIS</b>	
Extrato hexânico das folhas de <i>A. pickelii</i>	APFEH
Extrato metanólico das folha de <i>A. pickelii</i>	APFEM
Extrato hexânico da casca de <i>A. pickelii</i>	APCEH
Extrato metanólico da casca de <i>A. pickelii</i>	APCEM
Extrato hexânico das folha de <i>X. laevigata</i>	XLFEH
Extrato metanólico das folha de <i>X. laevigata</i>	XLFEM
Extrato hexânico do caule de <i>X. laevigata</i>	XLCEH
Extrato metanólico do caule de <i>X. laevigata</i>	XLCEM
Extrato éter de petróleo das folha de <i>A. vepretorum</i>	AVFEHP
Extrato metanólico das folha de <i>A. vepretorum</i>	AVFEM
Extrato éter de petróleo da casca de <i>A. vepretorum</i>	AVCEEP
Extrato metanólico da casca de <i>A. vepretorum</i>	AVCEM

Continua

**Tabela 1.** Lista completa dos extratos vegetais, óleos vegetais e substâncias puras utilizados para a avaliação da atividade larvicida sobre *Ae. aegypti* e suas respectivas siglas.

COMPOSTOS	SIGLA	conclusão
<b>ÓLEOS VEGETAIS</b>		
Óleo essencial de <i>A. pickelii</i>	OEAP	
Óleo essencial de <i>X. laevigata</i>	OEXL	
Óleo essencial de <i>A. vepretorum</i>	OEAV	
<b>SUBSTÂNCIAS PURAS</b>		
$\alpha$ -pineno	$\alpha$ - pineno	
$\beta$ -pineno	$\beta$ -pineno	
( <i>E</i> )-cariofileno	( <i>E</i> )-cariofileno	
óxido de cariofileno	O.C.	
<b>COMPOSTOS UFSCar</b>		
Composto 1	C1	
Composto 2	C2	
Composto 3	C3	
Composto 4	C4	
Composto 5	C5	
Composto 6	C6	
Composto 7	C7	
Composto 8	C8	

### 3.2 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO PROCESSADO NA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE (UFS)

O material botânico (folhas, casca e caule) das espécies da família Annonaceae selecionadas para o estudo fitoquímico e biológico, *A. pickelii* (Figura 1), *A. vepretorum* (Figura 2) e *X. laevigata* (Figura 3), foi coletado em diferentes localidades do Estado de Sergipe e identificados pela professora Dra. Ana Paula do Nascimento Prata, taxonomista vegetal e curadora do Herbário ASE da Universidade Federal de Sergipe (ASE/UFS). Uma exsicata com número de registro de cada planta foi depositada no Herbário ASE/UFS (Tabela 2).



**Figura 1.** (a; b; c) Frutos e sementes de *A. pickelii* e (d) aspecto geral da planta. Fonte: Costa, E. V. (2010)



**Figura 2.** Aspecto geral de *A. vepretorum*, (b) raiz e (c; d) seus frutos. Fonte: Costa, E. V. (2010)



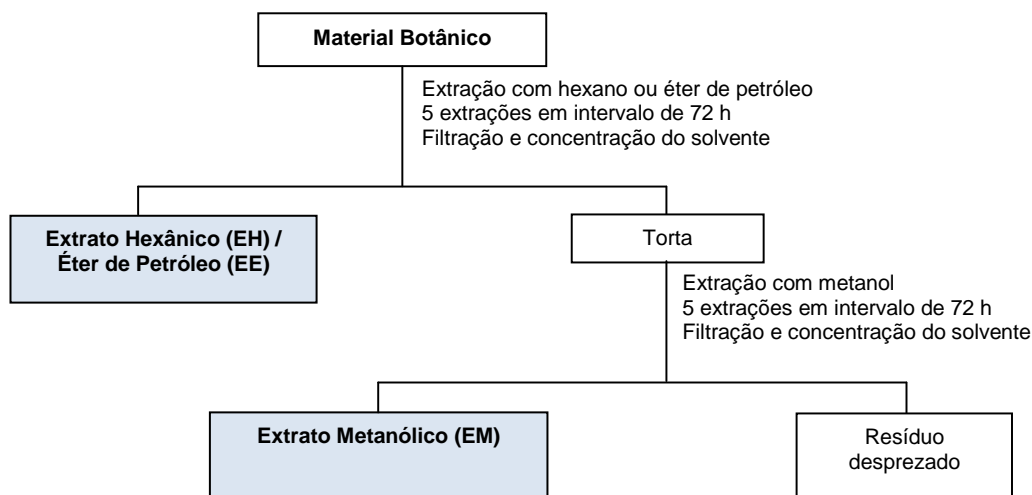
**Figura 3.** (a; b; c) Inflorescência de *X. laevigata* e (d) aspecto geral da planta.  
Fonte: Costa, E. V. (2010)

**Tabela 2.** Dados das espécies de Annonaceae coletadas para o estudo fitoquímico e biológico.

<b>Espécie</b>	<b>Parte Coletada</b>	<b>Localidade e Data</b>	<b>Nº de Exsicata</b>
<i>A. pickelii</i>	Folhas e casca	Município de Santa Luzia do Itanhhy (Mata do Crasto). (Coordenadas: 11°23'01" S, 37°25'13" W); 29/03/2010	15442
<i>A. vepretorum</i>	Folhas e casca	Município de Poço Redondo (Serra da Guia). (Coordenadas: 9°57'54" S, 37°51'46" W); 20/04/2010	15441
<i>X. laevigata</i>	Folhas e caule	Município de Itabaiana (Serra de Itabaiana). (Coordenadas: 10°44'53" S, 37°20'21" W); 02/03/2010	15440

### 3.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS DAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA ANNONACEAE

Todos os extratos foram preparados conforme a Figura 4. O material botânico das espécies em estudo foi seco em estufa de ar-circulante à 50° C e posteriormente pulverizados em um moinho de quatro facas (Figura 5). Após a secagem a quantidade do material botânico variou entre 363 e 1400 g. O material pulverizado foi então submetido à extração a frio (método de maceração) utilizando solventes em ordem crescente de polaridade (éter de petróleo ou hexano e metanol), renovando o solvente em intervalo de 72 horas (Figura 4 e 5). O resíduo remanescente foi desprezado. Os extratos obtidos foram concentrados em um evaporador rotativo à pressão reduzida a temperatura entre 40 e 50° C e em seguida secados em um dessecador. Após completa secagem dos extratos foram realizados cálculo dos rendimentos obtidos (Tabela 3) e pequenas quantidades (aproximadamente 1000 mg) dos extratos, foram retirados e submetidos à realização de ensaios biológicos.



**Figura 4.** Fluxograma de obtenção dos extratos



**Figura 5.** À esquerda: Moinho de quatro-facas; à direita: extração à frio (método de maceração). Foto: Costa, E.V. (2010)

**Tabela 3.** Rendimento dos extratos brutos das espécies de Annonaceae de Sergipe selecionadas para o estudo fitoquímico e atividade larvívica.

Espécie	Parte da Planta	Massa (g)	Extrato	Extrato	Extrato
			Éter de Petróleo (EP)	Hexânico (H)	Metanólico (M)
			Rendimento (sigla)	Rendimento (sigla)	Rendimento (sigla)
<i>A. pickelii</i>	Casca	790	-----	5,53g (APCEH)	129,32g (APCEM)
	Folhas	363	14,54g (APFEFP)	-----	42,16g (APFEM)
<i>A. vepretorum</i>	Casca	653	39,03g (AVCEFP)	-----	85,00g (AVCEM)
	Folhas	500	17,03g (AVFEFP)	-----	107,48g (AVFEM)
<i>X. laevigata</i>	Caule	1400	-----	18,77g (XLCEH)	87,79g (XLCEM)
	Folhas	750	-----	54,31g (XLFEH)	191,11g (XLFEM)

### 3.4 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA ANNONACEAE E METODOLOGIA DE ANÁLISE

As folhas das espécies *A. pickelii*, *A. vepretorum* e *X. laevigata*, coletadas aleatoriamente, foram secas em uma estufa de ar-circulante a temperatura de 50° C durante 72 h para *A. pickelii* e 24 h para *A. vepretorum* e *X. laevigata*.



Posteriormente 200g do material obtido foi pulverizado em um moinho de quatro-facas e submetido à hidrodestilação por três horas utilizando um aparelho do tipo Clevenger (Figura 6). O óleo essencial obtido foi seco sob sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e a percentagem do seu conteúdo foi calculada baseada no peso do material seco. A extração foi realizada em duplicata. Uma parte do óleo essencial foi submetida às análises cromatográficas (CG-EM e CG-DIC) e a outra parte aos testes de atividade larvicida.



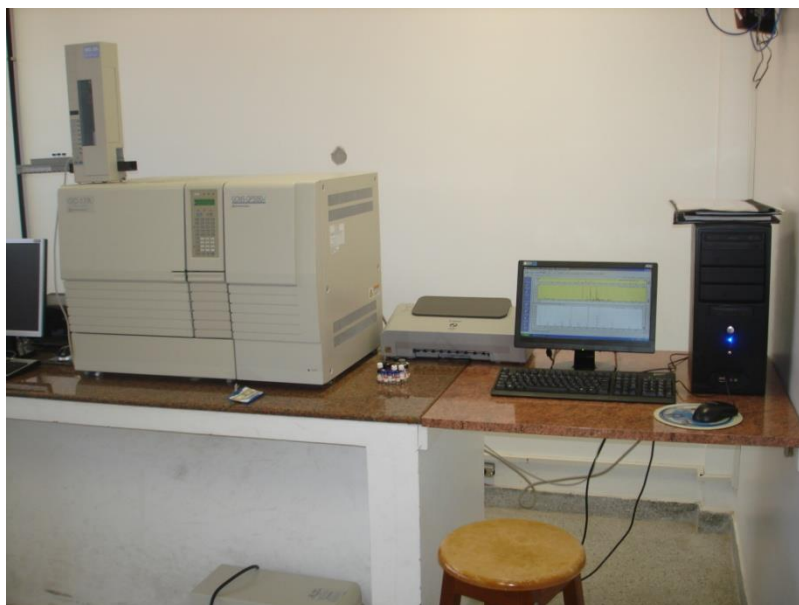
**Figura 6.** Sistema de hidrodestilação. Foto: Costa, E.V. (2010)

### **3.5 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)**

A análise qualitativa da composição química dos óleos essenciais das três espécies em estudo foi realizada em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas CG-EM (Shimadzu, modelo QP5050A), equipado com um autoinjeter AOC-20i (Shimadzu) (Figura 7). As condições de análise foram: coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific (30m x 0,25mm d.i., 0,25 $\mu\text{m}$  de

film) composta por 5%-fenil-95%-dimetilpolisiloxano; gás de arraste Hélio (99.999%) com fluxo constante de  $1,2\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; temperatura programada mantendo  $50^{\circ}\text{C}$  por 2,0 min (isoterma), seguido de um aumento de  $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até atingir  $200^{\circ}\text{C}$ , posteriormente  $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até atingir  $300^{\circ}\text{C}$ , e finalmente uma isoterma de  $300^{\circ}\text{C}$  por 15 min. O volume de injeção foi de  $0,5\mu\text{L}$  da amostra do óleo solubilizada em diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) com taxa de partição de 1:100; a temperatura do injetor e detector foi de  $250^{\circ}\text{C}$  e  $280^{\circ}\text{C}$ , respectivamente; para a obtenção dos espectros de massas foi utilizado um detector de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV com um intervalo de 0,5s e fragmentos de 40 a 500Da.

A identificação dos componentes individuais presentes nos óleos essenciais foi realizada pela comparação dos espectros de massas adquiridos com aqueles presentes na biblioteca do aparelho (NIST e WILEY), injeção de padrões e pela comparação de seus índices de retenção e espectros de massas autênticos (ADAMS, 2007), relativo a uma série de *n*-alcanos  $\text{C}_8\text{-C}_{20}$  (VAN DEN DOOL & KRATZ, 1963) em uma rampa de temperatura programada.



**Figura 7.** CG-EM do DQI/UFS utilizado na análise qualitativa dos óleos essenciais. Foto: Costa, E.V. (2010)

### 3.6 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A UM DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMAS (CG-DIC)

A análise quantitativa dos constituintes voláteis presentes nos óleos essenciais das três espécies em estudo foi realizada em um cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização de chamas (DIC), usando um equipamento Shimadzu GC-17A (Figura 8), sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida ZB-5MS (30,0m x 0,25mm i.d. x 0,25µm de filme) contendo 5% dimetilpolisiloxano, usando as mesmas condições do CG-EM. A quantificação dos constituintes foi realizada pela normatização da área (%). As concentrações dos constituintes foram calculadas pela área e colocadas em ordem de eluição do CG.



**Figura 8.** CG-DIC do DQI/UFS utilizado na análise quantitativa dos óleos essenciais. Foto: Costa, E.V. (2010)

### 3.7 PADRÕES DE MONOTERPENOS E SESQUITERPENOS

Padrões dos monoterpenos  $\alpha$ - e  $\beta$ -pinenos, e sesquiterpenos (*E*)-cariofileno e óxido de cariofileno, frequentemente encontrado em Annonaceae, foram adquiridos comercialmente da Sigma-Aldrich para identificação nos óleos essenciais, bem como para a realização dos ensaios de atividade larvicida.

### **3.8 PREPARO DAS SOLUÇÕES DOS EXTRATOS VEGETAIS E ÓLEOS ESSENCIAIS DA FAMÍLIA ANNONACEAE E SUBSTÂNCIAS PURAS**

Após a obtenção das substâncias puras, extratos vegetais e óleos essenciais extraídos de plantas da família Annonaceae, provenientes da UFS, as substâncias foram encaminhadas ao Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). As amostras foram previamente solubilizadas com dimetilsulfóxido (DMSO) a 1%, produzindo uma “substância-mãe” de cada produto, e mantidas à temperatura ambiente até o momento da sua utilização nos bioensaios.

### **3.9 PREPARAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS PROCESSADAS NA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCAR)**

As substâncias processados na UFSCar, sob orientação da Prof. Dra. Rose Maria Carlos, foram preparados no Laboratório de Ecologia Química e Síntese de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sob responsabilidade do Prof. Dr. Francisco de Assis Marques. As substâncias foram encaminhadas ao Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV) do Departamento de Zoologia da mesma universidade prontos para uso e em quantidade suficiente para realização dos bioensaios.

### **3.10 MANEJO DAS LARVAS**

Para obtenção de larvas a serem utilizadas nos bioensaios, os ovos de *Ae. aegypti* foram submersos em copos plásticos, de capacidade para 770 mL, preenchido com água desclorada e com adição de 0,026g de ração triturada. Passado 24 horas após a observação de eclosão larval, as mesmas foram transferidas para bandejas plásticas (35,5cm x 21,5cm x 6,5cm) contendo três litros de água desclorada. As larvas, então, foram mantidas sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada Modelo 347 CDG. Assim permaneceram até atingirem o

estágio de 3º instar final ou 4º inicial, alimentadas a cada 48 horas com a mesma ração anteriormente citada. Os ovos de *Ae. aegypti* foram obtidos a partir da colônia “Rockefeller-CDC” (Center of Disease Control) e da colônia de população silvestre de procedência de Foz do Iguaçu (F3), ambas com criação previamente estabelecida no insetário do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da Universidade Federal do Paraná.

### **3.11 BIOENSAIOS**

#### **3.11.1 Atividade larvicida e verificação do período de atividade larvicida dos extratos vegetais e óleos essenciais da Família Annonaceae e substâncias puras**

Inicialmente realizou-se apenas um bioensaio preliminar para cada produto, em quadruplicata, com 15 amostras (extratos vegetais e óleos essenciais de *A. pickelii*, *X. laevigata* e *A. Vepretorum*), dos 27 listados anteriormente. As substâncias puras  $\alpha$ - pineno,  $\beta$ -pineno e (*E*)-cariofileno foram utilizadas para o desenvolvimento de três bioensaios completos.

O bioensaio preliminar de atividade larvicida seguiu o mesmo método para extratos vegetais e óleos essenciais: as larvas foram expostas em três diferentes concentrações (100, 250 e 500 ppm) dos extratos vegetais de *A. pickelii*, *X. laevigata* e *A. Vepretorum*, em suas diferentes partes (casca e folhas), com exceção do extrato APCEH, que foi exposto somente em duas concentrações diferentes (100 e 250 ppm) devido ao fornecimento de quantidade insuficiente do produto.

Quanto às substâncias puras  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno e (*E*)-cariofileno, as larvas foram expostas a concentrações de 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 ppm, reproduzido três vezes e em dias diferentes, classificando este, portanto, como um bioensaio completo de efetividade. E para a substância pura óxido de cariofileno realizou-se apenas dois bioensaios preliminares, com exposição às concentrações de 100 e 250 ppm no primeiro, sendo possível somente a exposição das larvas à concentração de 250 ppm em duplicata, e 300

ppm no segundo, também devido ao fornecimento de quantidade insuficiente do produto.

Todos os testes foram realizados com larvas da colônia Rockefeller-CDC mantidas em câmara climatizada sob as mesmas condições de temperatura, umidade e fotoperíodo, como anteriormente relatadas.

Atingindo o estágio de 3<sup>o</sup> instar final ou 4<sup>o</sup> inicial, as larvas foram contadas e transferidas, com auxílio de uma pipeta Pasteur para copos plásticos descartáveis com capacidade para 50 mL. Cada copo continha 20 larvas submersas em 20 mL da mesma água desclorada onde se encontravam as larvas anteriormente. Essas larvas ficaram armazenadas em câmara climatizada enquanto os copos com as soluções para o bioensaio eram preparados.

A quantidade necessária para cada concentração de cada amostra foi calculada, uma vez que cada amostra apresentou concentrações diferentes de “solução-mãe”, e colocada em recipientes plásticos com capacidade para 330 mL, previamente completados com 80mL de água mineral, atingindo, após a adição das larvas mantidas submersas em 20 mL de água em copos plásticos descartáveis, um volume final de 100mL. Após homogeneização da solução, com auxílio de bastão de vidro por 20 segundos, esperou-se cerca de cinco minutos e então as larvas acondicionadas foram adicionadas. Para os grupos controle a um ml de DMSO a 1% e mais 80 larvas foram expostas a água mineral, também preparados em quadruplicata, separando, portanto, 20 larvas para cada réplica. As larvas foram mantidas sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada Modelo 347 CDG. A cada 96 horas adicionou-se 0,026 gramas de ração e realizou-se a reposição de água em caso de evaporação, sempre que necessário, não permitindo a diminuição do volume final abaixo de 100 mL em cada réplica.

A mortalidade das larvas foi verificada a cada 24 horas até a emergência completa do último adulto do grupo controle contendo água mineral ou até a mortalidade completa das larvas submetidas à ação dos produtos avaliados. As larvas incapazes de atingir a superfície da água ou imóveis quando submetidas a estímulos (batidas sucessivas na parede dos copos com pipeta de Pauster) foram consideradas como larvas mortas. As larvas mortas foram descartadas a cada leitura de 24 horas. Ao final do experimento as larvas sobreviventes foram descartadas.

Em um segundo momento, e atendendo aos critérios estabelecidos de selecionar substâncias que atingiram taxa de mortalidade larval acima de 80% nas concentrações testadas acima de 250 ppm no bioensaio preliminar para os extratos vegetais e óleos essenciais, foram realizados bioensaios de efetividade, com objetivo de explorar a atividade larvicida dos seguintes compostos: OEAV (realizou-se dois bioensaios completos nas concentrações de 100 ppm, 125 ppm, 150 ppm, 175 ppm, 200 ppm, 225 ppm, 250 ppm, 275 ppm e 300 ppm, em quadruplicata), OEAP (realizou-se apenas um bioensaio completo nas concentrações de 125 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 225 ppm e 250 ppm, em triplicata) e OEXL (realizou-se apenas um bioensaio completo nas concentrações 100 ppm, 125 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 225 ppm, 250 ppm, 275 ppm e 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm e 500 ppm, em quadruplicata). O método aplicado para o bioensaio preliminar foi mantido para os bioensaios de efetividade.

Apesar de atender os critérios estabelecidos, para o composto XLFEH não foi possível realizar essa terceira etapa devido à quantidade insuficiente da amostra.

Novamente a mortalidade das larvas foi verificada a cada 24 horas até a emergência completa do último adulto do grupo controle contendo água mineral ou até a mortalidade completa das larvas submetidas à ação dos produtos avaliados. As larvas incapazes de atingir a superfície da água ou imóveis quando submetidas a estímulos (batidas sucessivas na parede dos copos com pipeta de Pauster) foram consideradas como larvas mortas. As larvas mortas foram descartadas a cada leitura de 24 horas. Ao final do experimento as larvas sobreviventes foram descartadas.

### **3.11.2 Atividade larvicida e verificação do período de atividade larvicida das substâncias processados na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)**

Inicialmente realizou-se apenas um bioensaio preliminar para cada produto, em quadruplicata, com oito compostos (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8), dos 27 listados anteriormente.

O bioensaio preliminar de atividade larvicida seguiu o mesmo método utilizado para extratos vegetais e óleos essenciais provenientes da UFS, porém

as larvas utilizadas foram expostas a apenas uma concentração (40 µM) de cada substância e a leitura ocorreu a cada 24 horas até 96 horas de duração, quando determinou-se o término do bioensaio preliminar. Portanto, não houve adição de ração nessa primeira etapa.

Em um segundo momento, e atendendo aos critérios estabelecidos de selecionar substâncias que atingiram maiores taxas de mortalidade larval no bioensaio preliminar, foram realizados bioensaios completos de efetividade, com objetivo de explorar a atividade larvicida dos produtos C1, C7 e suas frações separadamente (realizou-se três bioensaios completos, apenas na concentração de 40 µM, para as duas substâncias e suas subunidades) e, após, selecionou-se C7 para a realização de três bioensaios completos de efetividade nas concentrações 1, 10, 13, 15, 18, 20, 30 e 200 µM, em quadruplicata. O método aplicado para o bioensaio preliminar foi mantido para os bioensaios de efetividade.

Em um último momento, realizou-se mais três bioensaios, em dias diferentes, com o composto C7, em uma única concentração (40 µM), e com a subunidade 3, nas concentrações de 20 e 30 µM, para avaliação da atividade larvicida contra a população silvestre de *Ae. aegypti* proveniente de Foz do Iguaçu, utilizando a terceira geração (F3), mantidas sob criação no insetário do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da Universidade Federal do Paraná. Mais uma vez, o método aplicado para o bioensaio preliminar foi mantido para os bioensaios de efetividade com população silvestre de *Ae. aegypti*.

### **3.12 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS DE LABORATÓRIO DESTINADOS AO PROCEDIMENTO DE REPASTO SANGUÍNEO POR FÊMEAS DE *Ae. aegypti***

As espécies animais selecionadas para o repasto sanguíneo de fêmeas adultas de *Ae. aegypti* foram camundongo variedade Swiss (*Mus domesticus*), com idade entre 60 e 90 dias e peso entre 30 e 60 gramas. A escolha dessa espécie deve-se, principalmente, ao fato dos animais possuírem porte pequeno, alta prolificidade, período de gestação curto e fácil domesticação e manutenção.



A espécie *Mus domesticus* foi obtida através do biotério da Universidade Federal do Paraná (UFPR), que possui produção própria. Os animais foram mantidos sob condições do biotério da UFPR, criados em caixas de polipropileno, com cama de maravalha, em condições de temperatura e umidade controladas. A disponibilidade de água e ração foi checada duas vezes por semana, durante toda a duração do experimento. A ração utilizada para a alimentação dos animais foi do tipo peletizada e composta primariamente de cereais suplementados com proteína adicional, vitaminas e minerais.

### **3.13 OBTENÇÃO DOS MOSQUITOS DESTINADOS AO PROCEDIMENTO DE REPASTO SANGUÍNEO POR FÊMEAS DE *A. aegypti***

Os adultos de *Ae. aegypti* foram obtidos a partir de ovos da colônia “Rockefeller-CDC” (Center of Disease Control - USA), já estabelecidas no insetário do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV) da Universidade Federal do Paraná.

Para tal, ovos de *Ae. aegypti* foram submersos em água desclorada, dentro de copos plásticos com capacidade para 770 mL, com adição de 0,026g de ração triturada para induzir a eclosão larval. Passado 24 horas e após observação da eclosão, as larvas foram transferidas para bandejas plásticas (com medidas 35,5cm de comprimento x 21,5cm de largura x 6,5cm de altura) contendo três litros de água desclorada. Estas larvas foram mantidas sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12), controlados em câmara climatizada Modelo 347 CDG e alimentadas com ração a cada 48 horas. Assim permaneceram até atingirem o estágio de pupa, sendo, então, realocadas em gaiolas para posterior emergência do mosquito adulto.

Foram colocadas 150 pupas para cada gaiola utilizada, obedecendo o seguinte esquema: para cada procedimento, duas gaiolas foram destinadas para a criação de fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas com sangue de camundongo submetido aos protocolos anestésicos P1, P2, P3 e P4 e uma gaiola foi destinada para a criação de fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas com sangue de camundongo submetido somente a imobilização, sem adição de nenhuma substância anestésica, denominado grupo controle.

Para a alimentação dos insetos adultos recém- emergidos foi ofertada uma solução de glicose a 10%.

### **3.14 PROTOCOLOS ANESTÉSICOS**

Como método de seleção para a definição dos melhores protocolos anestésicos a serem administrados nos animais oferecidos como fonte alimentar aos mosquitos, considerou-se a espécie animal com a qual foi trabalhado (*Mus Domesticus*), o estado de higidez de cada animal, a duração do procedimento a ser realizado, locais de aplicação, além do custo operacional.

Os fármacos acepromazina, midazolam, zolazepam e xilazina, destinados à medicação pré-anestésica, foram selecionados para administração nos camundongos utilizados. Quanto aos anestésicos gerais, os escolhidos foram tiopental, cetamina e tiletamina.

Os procedimentos anestésicos utilizados para camundongos a serem testados nesse estudo foram:

1. Procedimento 1 (P1): Cetamina + Xilazina. Associou-se na mesma seringa 100 mg/Kg de cetamina com 10 mg/Kg de xilazina, via intraperitoneal (IP);
2. Procedimento 2 (P2): Cetamina + Midazolam. Associou-se na mesma seringa 100 mg/Kg de cetamina com 5mg/Kg de midazolan, via IP;
3. Procedimento 3 (P3): Tiopental sódico + Acepromazina. Administrou-se previamente 2,5 mg/Kg de acepromazina, via subcutânea. Após 10 minutos, administrou-se 12,5 mg/Kg de tiopental sódico a 2,5%, via IP;
4. Procedimento 4 (P4): Tiletamina-zolazepan. Administrou-se 75 mg/Kg de Zoletil50® Virbac, via intramuscular (IM);

### **3.15 PROCEDIMENTO DE REPASTO SANGUÍNEO**

O primeiro repasto sanguíneo ocorreu após o sétimo dia após a emergência completa dos mosquitos adultos.

Os animais utilizados não precisaram estar sob restrição alimentar e hídrica para a realização dos procedimentos anestésicos.

Cada gaiola recebeu um único animal, com um único procedimento anestésico instaurado, uma vez por semana, durante quatro semanas. Ao total foram utilizados oito camundongos. Os repastos sanguíneos ocorreram entre nove e dez horas da manhã, pois o mosquito *Ae. aegypti* tem hábito hematófago diurno, e também para que os animais pudessem ser acompanhados durante a recuperação anestésica ao longo do dia.

O procedimento de repasto sanguíneo foi de curta duração, sendo realizado durante 20 minutos a partir do momento em que ocorreu a perda de consciência do animal.

Passado os 20 minutos de repasto sanguíneo, e conseqüente retirada do animal da presença dos insetos, dentro de cada gaiola foi colocado um recipiente para oviposição de cor escura, com um copo plástico em seu interior, preenchido com água desclorada, e coberto por um papel filtro umedecido, permanecendo assim por 24 horas. Após este período, o papel filtro contendo a postura foi retirado e substituído por outro papel filtro, permanecendo assim, também, por mais 24 horas, sendo repetido por seis dias consecutivos. Ao sétimo dia, o procedimento de repasto sanguíneo foi novamente realizado, totalizando, ao final, quatro repastos, durante quatro semanas.

### **3.16 AVALIAÇÃO E MONITORAMENTO DOS ANIMAIS DURANTE E APÓS O PROCEDIMENTO DE REPASTO SANGUÍNEO**

Foram avaliados o período de latência, que corresponde ao intervalo entre a administração e o início dos efeitos dos fármacos; o período de recuperação anestésica, que corresponde ao intervalo entre o término do período de latência e o restabelecimento dos movimentos; e parâmetros fisiológicos, tais quais: (1) Reflexo palpebral, através do toque sutil na comissura nasal da pálpebra, observando o fechamento ou não das mesmas; (2) Reflexo pupilar, com auxílio de uma lanterna para averiguar a presença do estímulo fotomotor; (3) Reflexos interdigital e caudal, para determinar o estabelecimento de analgesia, com auxílio de uma pinça; (4) Reação ao pinçamento da pele da parede abdominal, também para determinar o estabelecimento de analgesia, com auxílio de uma pinça; (5) Frequência dos batimentos cardíacos, com auxílio de um

estetoscópio; (6) Reflexos respiratórios, aferindo a freqüência dos movimentos de respiração; (7) Avaliação da coloração das mucosas ocular, oral e genital; (8) Tempo de preenchimento capilar, através do toque a mucosa oral; (9) Grau de desidratação; e (10) Temperatura retal, com auxílio de um termômetro digital.

O monitoramento dos animais se deu no minuto zero apartir da inoculação dos fármacos anestésicos, a cada 20 minutos durante a primeira hora, e após, de hora em hora até a recuperação completa dos parâmetros fisiológicos normais dos animais.

Após o procedimento de alimentação sanguínea pelas fêmeas de *Ae. aegypti* findado, os camundongos foram colocados isoladamente em caixas de polipropileno, para a recuperação anestésica, em local silencioso, com pouca luz, disponibilidade de água e com mínima manipulação, evitando estressá-los. A temperatura do ambiente em que os animais estavam localizados variou de 28°C a 32°C. Quando os animais começaram a restabelecer os parâmetros normais, a temperatura foi reduzida para 25° C.

### **3.17 EUTANÁSIA**

Seguindo a Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, a eutanásia foi realizada após o término dos experimentos de cada grupo, utilizando a solução de cloreto de potássio a 19% (2,56 mEq/mL) associado a anestesia geral prévia, na dose de 1mL/Kg ou 2,56mEq/Kg, por via intra-cardíaca.

### **3.18 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS OVOS DE *Ae. aegypti***

A avaliação da viabilidade dos ovos de *Ae. aegypti* foi realizada após nove dias após cada postura de 24 horas, selecionando quantidade aleatória de ovos e colocando-os para eclosão em água desclorada, dentro de copos plásticos com capacidade para 300 mL, com adição de 0,026g de ração triturada. Após 24 horas, os papéis filtro destinados a oviposição foram retirados e foi realizada a

contagem do número absoluto de larvas eclodidas, e, por fim, calculada a porcentagem de eclosão em 24 horas.

### 3.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estimativa das concentrações dos compostos com potencial ação inseticida sobre imaturos de *Ae. aegypti* capazes de ocasionar mortalidade de 50% (CL50), 90% (CL90) e 99% (CL99) das larvas e os intervalos de confiança foram determinados através do teste de  $\chi^2$ , utilizando o software PROBIT GW-Basic, a partir dos dados de mortalidade obtidos nos bioensaios, com nível de significância de  $p < 0,05$ .

Antes de proceder qualquer tipo de análise dos dados, observou-se a distribuição normal e/ou a homogeneidade de variâncias.

Para avaliação estatística dos compostos com potencial ação inseticida sobre imaturos de *Ae. aegypti*, avaliação da viabilidade dos ovos da mesma espécie e determinação dos períodos de latência e recuperação anestésica, foi utilizado ANOVA fatorial, uma vez que os dados apresentaram-se paramétricos. Quando detectou-se diferenças significativas, utilizou-se o teste de Tukey para denotar as diferenças entre os níveis de cada fator. O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o programa STATISTICA (data analysis software system), versão 7.0.

Para a análise estatística dos procedimentos anestésicos em camundongo como fonte de alimentação sanguínea para fêmeas adultas de *Ae. aegypti* em condições de laboratório, quando os dados apresentaram-se paramétricos, foi utilizado ANOVA a um critério, seguida de Teste de Bonferroni para comparação das médias. Para os dados não paramétricos foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis, seguido de Teste de Dunn's, para comparação das médias. O nível de significância adotado foi 5%. Todas as análises foram realizadas utilizando o Software estatístico *GraphPad Prism* version 3.00 for Windows.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ESTUDO QUÍMICO: COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DAS ESPÉCIES *Annona pickelii* (OEAP), *Annona vepretorum* (OEAV) e *Xylopia laevigata* (OEXL)

A composição química dos óleos essenciais das três espécies de Annonaceae selecionadas para o estudo químico e investigação da atividade larvicida contra o *Ae. aegypti* é mostrada na Tabela 4. Foi possível identificar 50 compostos, sendo 27 em *A. pickelii*, 18 em *A. vepretorum* e 36 em *X. laevigata*. As três espécies em estudo são constituídas em sua grande maioria por compostos pertencentes à classe dos sesquiterpenos com 97,7% em *A. pickelii*, 68,9% em *A. vepretorum* e 92,5% em *X. laevigata*. Os constituintes majoritários presentes no óleo essencial de *A. pickelii* foram: biciclogermacreno (45,4%), (*E*)-cariofileno (14,6%) e  $\alpha$ -copaeno (10,6%); enquanto que biciclogermacreno (43,7%), espatulenol (11,4%),  $\alpha$ -felandreno (10,0%),  $\alpha$ -pineno (7,1%), (*E*)- $\beta$ -ocimeno (6,8%), germacreno D (5,8%) e *p*-cimeno (4,2%) foram os principais constituintes do óleo essencial de *A. vepretorum*. Já o óleo essencial de *X. laevigata* é constituído por  $\gamma$ -muuroleno (21,5%),  $\alpha$ -copaeno (8,3%),  $\delta$ -cadineno (8,1%), (*E*)-cariofileno (5,9%), aromadendreno (5,7%),  $\gamma$ -cadineno (5,6%), biciclogermacreno (5,1%) e  $\gamma$ -amorfeno (4,7%).

**Tabela 4.** Composição química dos óleos essenciais das folhas de *A. pickelii*, *A. vepretorum* e *X. laevigata*

	Compostos	IR <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	% Óleo Essencial Folha		
				<i>A. pickelii</i> (OEAP) <sup>c</sup>	<i>A. vepretorum</i> (OEAV)	<i>X. laevigata</i> (OEXL)
1	$\alpha$ -Pineno	931	932	0,3	7,0	0,6
2	$\beta$ -Pineno	976	974	0,3	0,6	0,2
3	Mirceno	988	988		0,5	
4	$\alpha$ -Felandreno	1005	1002		10,0	
5	<i>p</i> -Cimeno	1023	1020		4,2	
6	Limoneno	1028	1024			2,6
7	( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimeno	1044	1044		6,8	
8	$\delta$ -Elemeno	1331	1335	0,3	1,1	0,7
9	$\alpha$ -Cubebeno	1347	1345	2,3		3,5
10	Ciclosativeno	1368	1369	0,3		
11	$\alpha$ - Ylangeno	1367	1373			1,5
12	$\alpha$ -Copaeno	1375	1374	10,6		8,3
13	$\beta$ -Bourboneno	1383	1387	1,1		0,6
14	$\beta$ -Cubebeno	1387	1387	3,8		1,2
15	$\beta$ -Elemeno	1389	1389	0,1		
16	$\alpha$ -Gurjuneno	1406	1409	0,3		
17	( <i>E</i> )-Cariofileno	1419	1417	14,6	1,3	5,9
18	$\beta$ -Copaeno	1429	1430	0,4		2,2
19	Aromadendreno	1437	1439	0,8	0,5	5,7
20	Trans-Murolo-3,5-dieno	1447	1451			0,2
21	$\alpha$ -Humuleno	1455	1452	2,3		0,7
22	allo-Aromadendreno	1459	1458	0,9	1,3	0,3
23	Cis-Cadina-1(6),4-dieno	1460	1461			0,1
24	Trans-Cadina-1(6),4-dieno	1472	1475	0,2		Tr
25	$\gamma$ -Murolo	1475	1478	0,8		21,5
26	Germacreno D	1481	1484	5,0	5,8	2,9
27	$\delta$ -Selineno	1485	1492			0,1
28	$\gamma$ -Amorfeno	1490	1495			4,7
29	Viridifloreno	1490	1496		0,9	
30	Valenceno	1491	1496	0,8		
31	Biciclogermacreno	1495	1500	45,4	43,7	5,1
32	$\alpha$ -Muruleno	1496	1495			Tr
33	( <i>E,E</i> )- $\alpha$ -Farnesene	1507	1505	0,2		
34	$\gamma$ -Cadineno	1512	1513	0,2		5,6
35	$\delta$ -Amorpheno	1515	1511		0,6	Tr
36	$\delta$ -Cadineno	1518	1522	4,8		8,1
37	Trans-Calameno	1520	1521			1,4

continua

**Tabela 4.** Composição química dos óleos essenciais das folhas de *A. pickelii*, *A. vepretorum* e *X. laevigata*.

Compostos	IR <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	conclusão			
			% Óleo Essencial Folha			
			<i>A. pickelii</i> (OEAP) <sup>c</sup>	<i>A. vepretorum</i> (OEAV)	<i>X. laevigata</i> (OEXL)	
38	Trans-Cadina-1,4-dieno	1532	1533	0,3		0,8
39	$\alpha$ -Cadineno	1534	1537			0,4
40	$\alpha$ -Calacoreno	1540	1544			0,8
41	Germacreno B	1557	1559			2,5
42	$\beta$ -Calacoreno	1560	1564			Tr
43	( <i>E</i> )-Nerolidol	1561	1561	0,3		
44	Espatulenol	1577	1577	1,7	11,4	3,5
45	Óxido de Cariofileno	1582	1582	0,2		1,3
46	Globulol	1584	1590		1,0	
47	Viridiflorol	1594	1592		0,7	
48	$\alpha$ -Murolol	1644	1644			1,7
49	$\delta$ -Cadinol	1653	1649			1,2
50	8-Cedren-13-ol	1668	1669		0,6	
<b>Monoterpenos</b>				<b>0,6</b>	<b>29,1</b>	<b>3,4</b>
<b>Sesquiterpenos</b>				<b>97,7</b>	<b>68,9</b>	<b>92,5</b>
<b>Total de compostos</b>				<b>98,3</b>	<b>98,0</b>	<b>95,9</b>

<sup>a</sup>IR (calc.), Índice de retenção calculado em coluna ZB-5MS (Dool & Kratz, 1963). <sup>b</sup>IR Índice de retenção da literatura (Adams, 2007). <sup>c</sup>Dados de Costa *et al.* (2011). Tr (traço).

#### 4.2 ATIVIDADE LARVICIDA E VERIFICAÇÃO DO PERÍODO DE ATIVIDADE LARVICIDA DOS EXTRATOS VEGETAIS E ÓLEOS ESSENCIAIS DA FAMÍLIA ANNONACEAE E SUBSTÂNCIAS PURAS

Devido à grande quantidade de extratos vegetais, substâncias puras e óleos essenciais analisados, e consequente falta de espaço físico para a realização dos bioensaios preliminares e de efetividade com todos os produtos em um mesmo momento, tornou-se inviável a análise estatística dos mesmos de forma agrupada, seguindo esta, portanto, de forma individual para cada produto anteriormente citado.

É importante ressaltar que não ocorreu a diluição completa de todos os extratos vegetais em DMSO a 1%, dificultado, principalmente, a pipetagem de cada produto e a determinação correta das concentrações utilizadas.



Os extratos metanólico e hexânico de *A. pickelii* mostraram atividade larvívica abaixo de 80% sob condições controladas ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ , umidade  $70\% \pm 10$  e fotoperíodo 12:12) sobre populações de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, a partir de bioensaios preliminares com duração de 216 horas, com exceção de APCEM e APFEH na concentração de 500 ppm, onde a mortalidade larval foi de 98,8% e 82,9%, respectivamente. Todas as concentrações testadas permitiram a emergência de adultos (Tabelas 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14 e 15 e Figuras 9, 11, 13 e 15).

Apesar dos resultados não satisfatórios para os extratos metanólico e hexânico de *A. pickelii*, as análises estatísticas para APCEM, APFEH e APFEM mostraram que as variáveis tempo e concentração, assim como a interação entre elas, são significativas ( $p < 0,05$ ) em relação à variável porcentagem de mortalidade larval (Tabelas 7, 10, 13 e 16 e Figuras 10, 12, 14 e 16).

Pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, a média do percentual de mortalidade observada para o grupo referente à concentração de 500 ppm de APCEM em 144 horas mostrou-se maior e diferente das médias dos grupos analisado no bioensaio preliminar realizado com o mesmo produto. Pelo mesmo teste e para APFEH, a média do percentual de mortalidade observada nos grupos referentes às concentrações de 100 e 500 ppm em 24 horas mostraram-se maiores e diferentes das médias dos demais grupos analisados no bioensaio preliminar com o produto em questão. E para APFEM, a média do percentual de mortalidade observada no grupo referente à concentração de 500 ppm em 48 horas mostrou-se maior e diferente das médias dos demais grupos analisados no bioensaio preliminar com tal produto. Não existiram diferenças para os demais grupos analisados.

Pelo teste de Dunnett, os grupos referentes às concentrações de 500 ppm de APCEM em 48, 144 e 168 horas; 100, 250 e 500 ppm de APFEH em 24 horas e 250 ppm de APFEM em 24 e 48 horas e 500 ppm em 24, 48, 72 e 96 horas diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle água. Não existiram diferenças para os demais grupos analisados.

**Tabela 5.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato APCEH sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm e 250 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

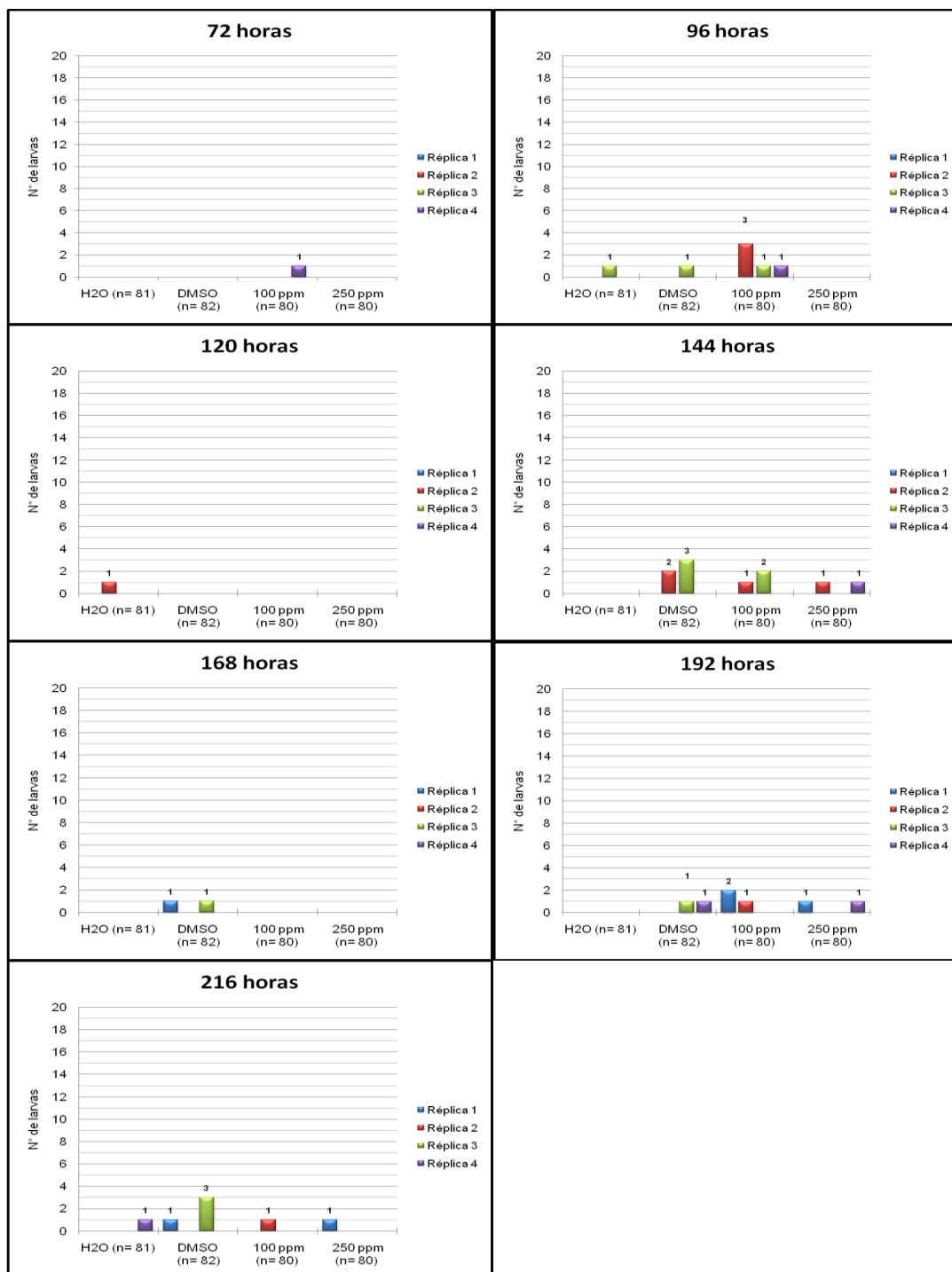
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 81)		CONTROLE DMSO (n= 82)		APCEH 100 ppm (n= 80)		APCEH 250 ppm (n= 80)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
42 h	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0
72 h	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0
96 h	1,2	11,1	1,2	8,5	8,8	0,0	0,0	0,0
120 h	2,5	42,0	1,2	26,8	8,8	17,5	0,0	2,5
144 h	2,5	64,2	7,3	54,9	12,5	46,3	2,5	8,8
168 h	2,5	66,7	9,8	67,1	12,5	67,5	2,5	37,5
192 h	2,5	75,3	12,2	72,0	16,3	75,0	5,0	73,8
216 h	3,7	96,3	17,1	73,2	17,5	77,5	6,3	92,5
<b>TOTAL</b>	<b>3,7</b>	<b>96,3</b>	<b>17,1</b>	<b>73,2</b>	<b>17,5</b>	<b>77,5</b>	<b>6,3</b>	<b>92,5</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 6.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato APCEH sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm e 250 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (216 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 81)	82,7	13,6	0,0
DMSO (n= 82)	68,3	4,9	9,8
100 ppm (n= 80)	75,0	2,5	5,0
250 ppm (n= 80)	77,5	15,0	1,3

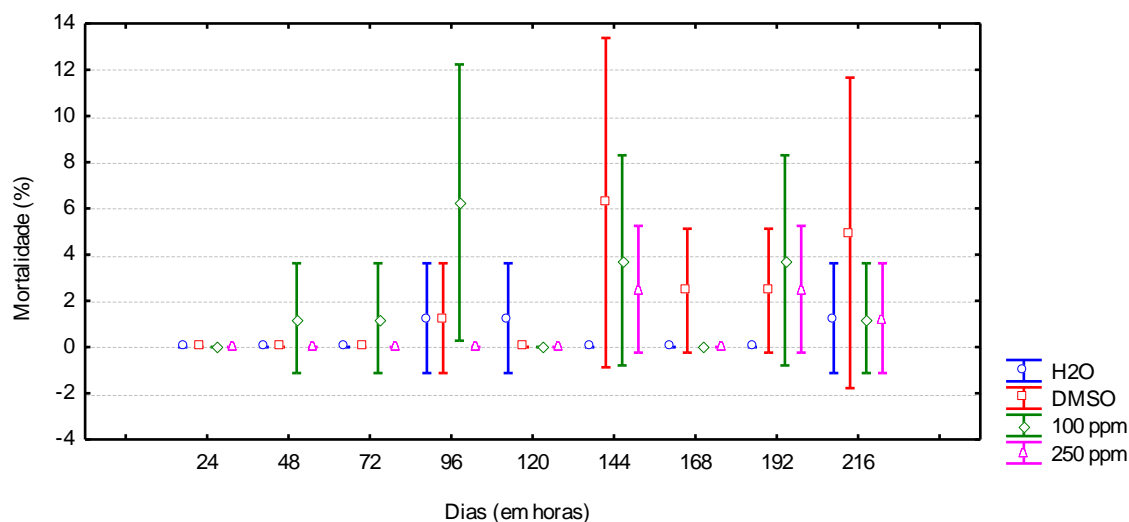
n = número total de larvas expostas.



**Figura 9.** Mortalidade larval não acumulada, por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato APCEH, a partir de 72 horas, quando ocorreu o primeiro registro de mortalidade do extrato em questão. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 7.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato APCEH. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	2,81055	0,007202*
	Concentração	3,05643	0,031480*
	Tempo X Concentração	1,12630	0,328732



**Figura 10.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato APCEH.

**Tabela 8.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato APCEM sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

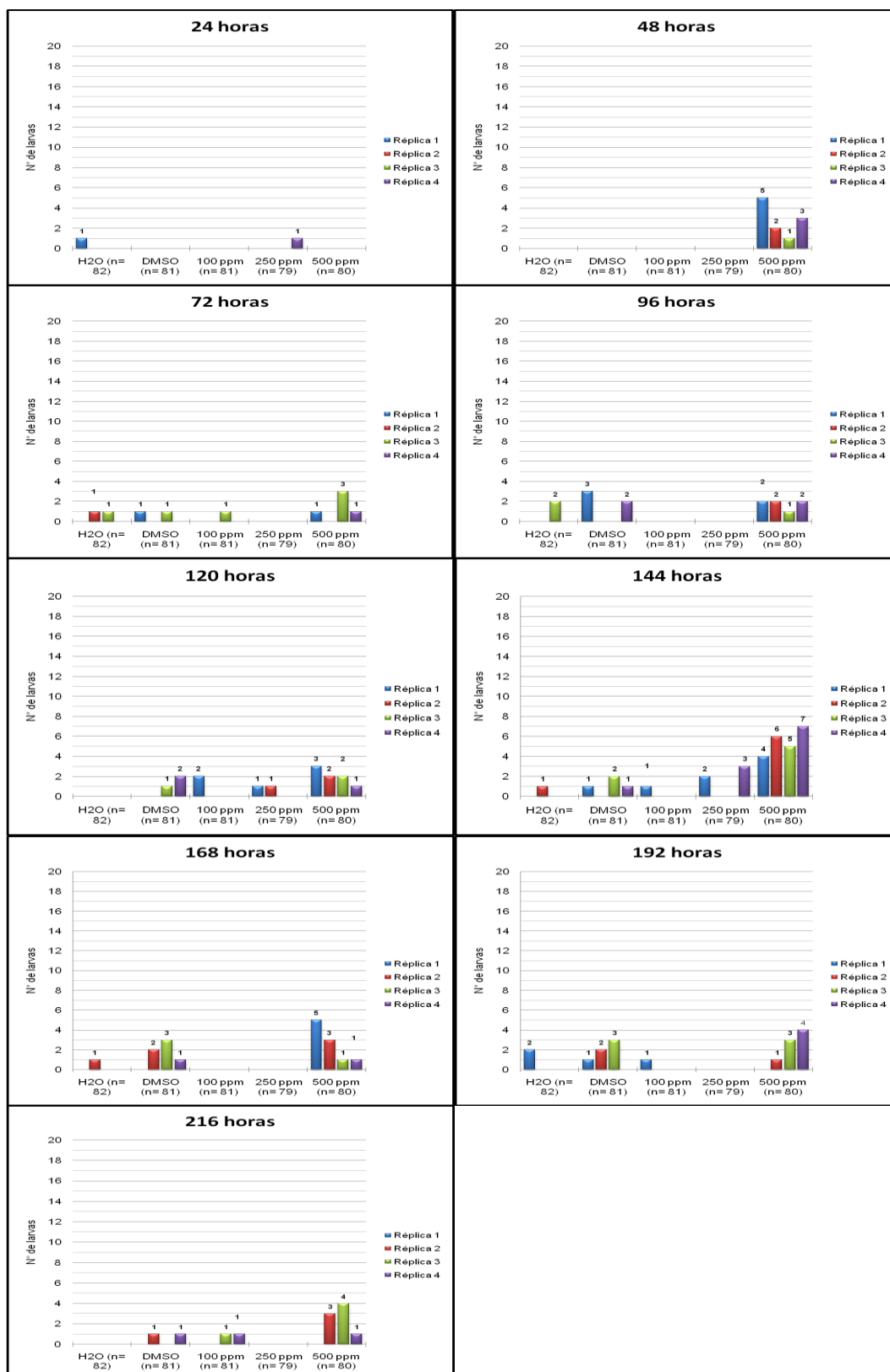
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 82)		CONTROLE DMSO (n= 81)		APCEM 100 ppm (n= 81)		APCEM 250 ppm (n = 79)		APCEM 500 ppm (n = 80)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0
42 h	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	13,8	0,0
72 h	3,7	0,0	2,5	0,0	1,2	0,0	1,3	0,0	20,0	0,0
96 h	6,1	24,4	8,6	24,7	1,2	16,0	1,3	2,5	28,8	0,0
120 h	6,1	54,9	12,3	53,1	3,7	35,8	3,8	17,7	38,8	0,0
144 h	7,3	65,9	17,3	60,5	4,9	59,3	10,1	29,1	66,3	0,0
168 h	8,5	72,0	24,7	61,7	4,9	70,4	10,1	38,0	78,8	0,0
192 h	11,0	74,4	32,1	61,7	6,2	85,2	10,1	63,3	88,8	0,0
216 h	11,0	89,0	34,6	65,4	8,6	90,1	10,1	73,4	98,8	0,0
<b>TOTAL</b>	<b>11,0</b>	<b>89,0</b>	<b>34,6</b>	<b>65,4</b>	<b>8,6</b>	<b>90,1</b>	<b>10,1</b>	<b>73,4</b>	<b>98,8</b>	<b>0,0</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 9.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato APCEM sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (216 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 82)	82,9	6,1	0,0
DMSO (n= 81)	61,7	3,7	0,0
100 ppm (n=81)	84,0	6,2	1,2
250 ppm (n= 79)	68,4	5,1	16,5
500 ppm (n= 80)	0,0	0,0	1,3

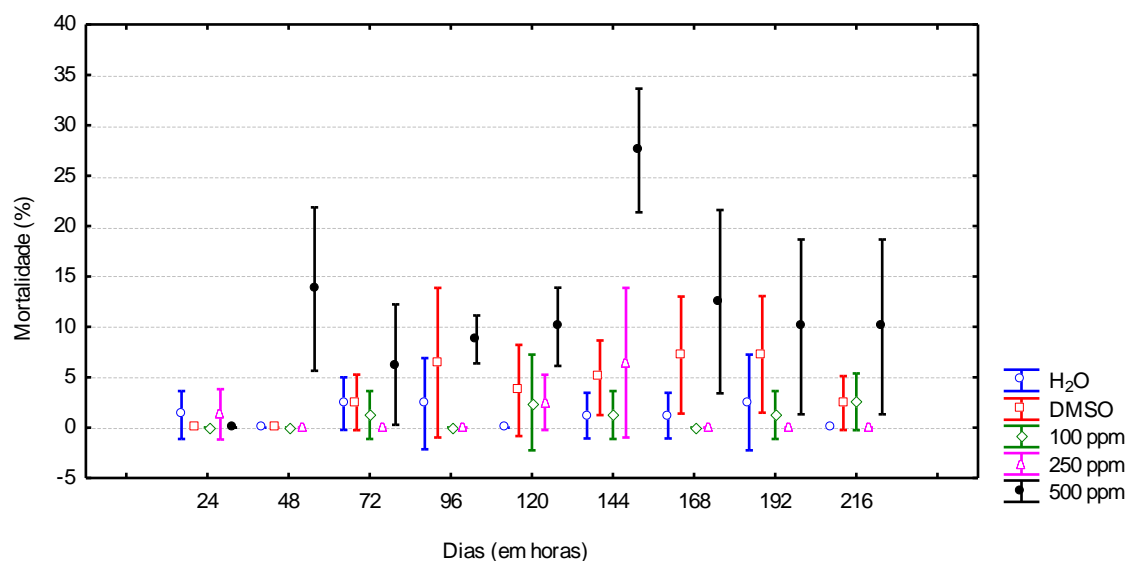
n = número total de larvas expostas.



**Figura 11.** Mortalidade larval não acumulada, por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato APCEM. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 10.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato APCEM. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	4,6763	0,000045*
	Concentração	35,7710	0,000000*
	Tempo X Concentração	2,5968	0,000075*



**Figura 12.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato APCEM.

**Tabela 11.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato APFEH sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 82)		CONTROLE DMSO (n= 81)		APFEH 100 ppm (n= 56)		APFEH 250 ppm (n= 76)		APFEH 500 ppm (n= 82)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	1,2	0,0	0,0	0,0	46,4	0,0	18,4	0,0	63,4	0,0
42 h	1,2	0,0	0,0	0,0	48,2	0,0	25,0	0,0	69,5	0,0
72 h	3,7	0,0	2,5	0,0	50,0	0,0	34,2	0,0	78,0	0,0
96 h	6,1	24,4	8,6	24,7	51,8	0,0	36,8	0,0	79,3	0,0
120 h	6,1	54,9	12,3	53,1	51,8	14,3	40,8	7,9	82,9	0,0
144 h	7,3	65,9	17,3	60,5	57,1	28,6	46,1	35,5	82,9	1,2
168 h	8,5	72,0	24,7	61,7	60,7	28,6	46,1	44,7	82,9	3,7
192 h	11,0	74,4	32,1	61,7	64,3	28,6	46,1	50,0	82,9	9,8
216 h	11,0	89,0	34,6	65,4	64,3	32,1	47,4	51,3	82,9	11,0
<b>TOTAL</b>	<b>11,0</b>	<b>89,0</b>	<b>34,6</b>	<b>65,4</b>	<b>64,3</b>	<b>32,1</b>	<b>47,4</b>	<b>51,3</b>	<b>82,9</b>	<b>11,0</b>

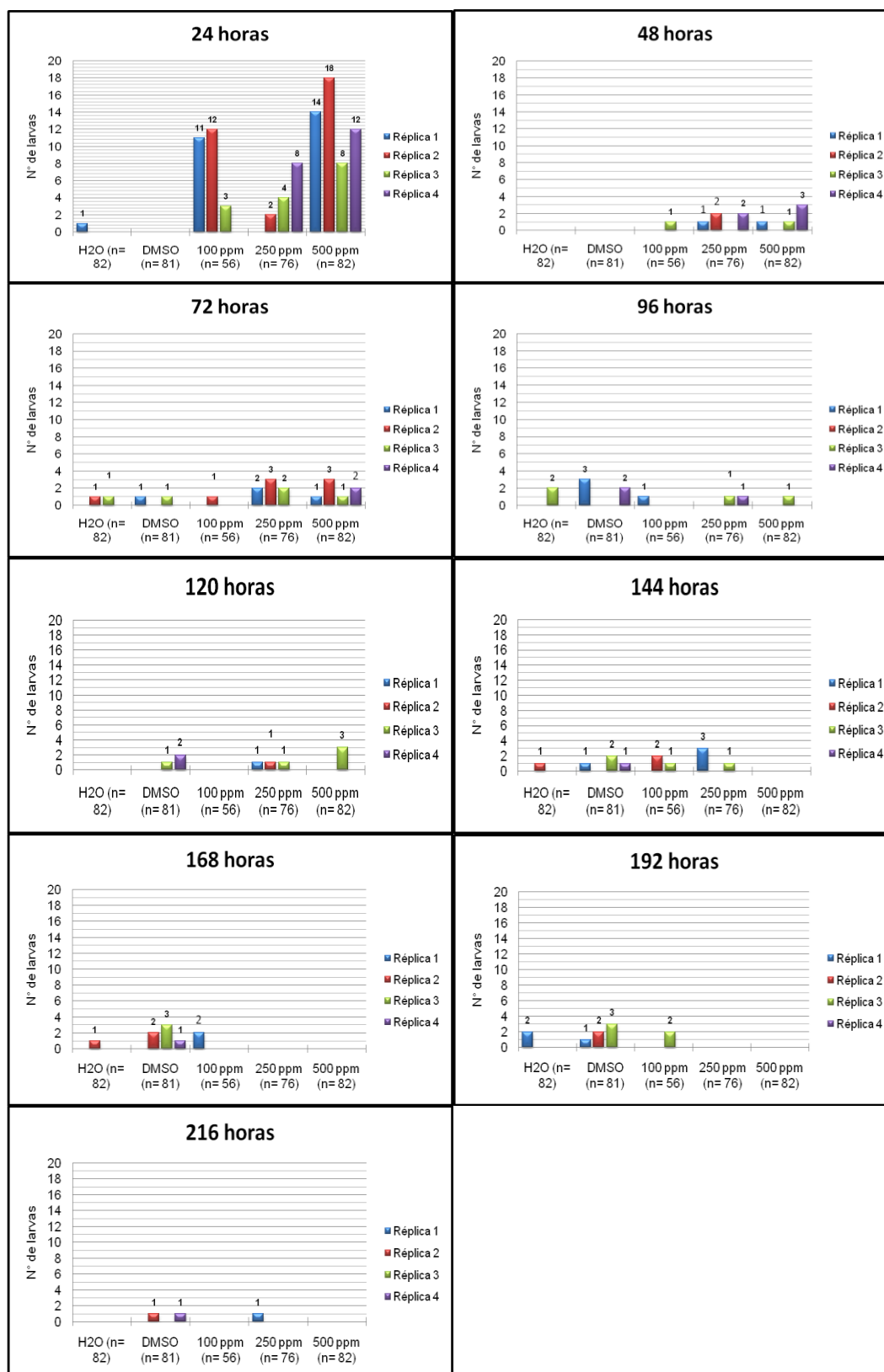
M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 12.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato APFEH sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (216 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 82)	82,9	6,1	0,0
DMSO (n= 81)	61,7	3,7	0,0
100 ppm (n= 56)	32,1	0,0	3,6
250 ppm (n= 76)	46,1	5,3	1,3
500 ppm (n= 82)	11,0	0,0	7,3

n = número total de larvas expostas.

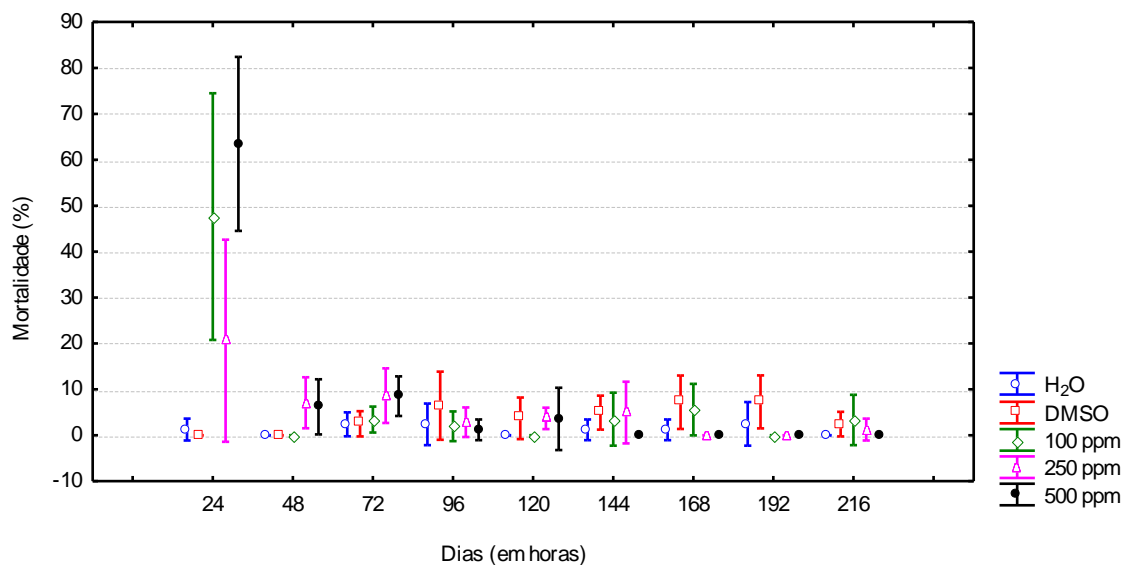




**Figura 13.** Mortalidade larval não acumulada, por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato APFEH. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 13.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato APFEH. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	24,32457	0,000000*
	Concentração	6,75394	0,000059*
	Tempo X Concentração	7,50157	0,000000*



**Figura 14.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato APFEH.

**Tabela 14.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato APFEM sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

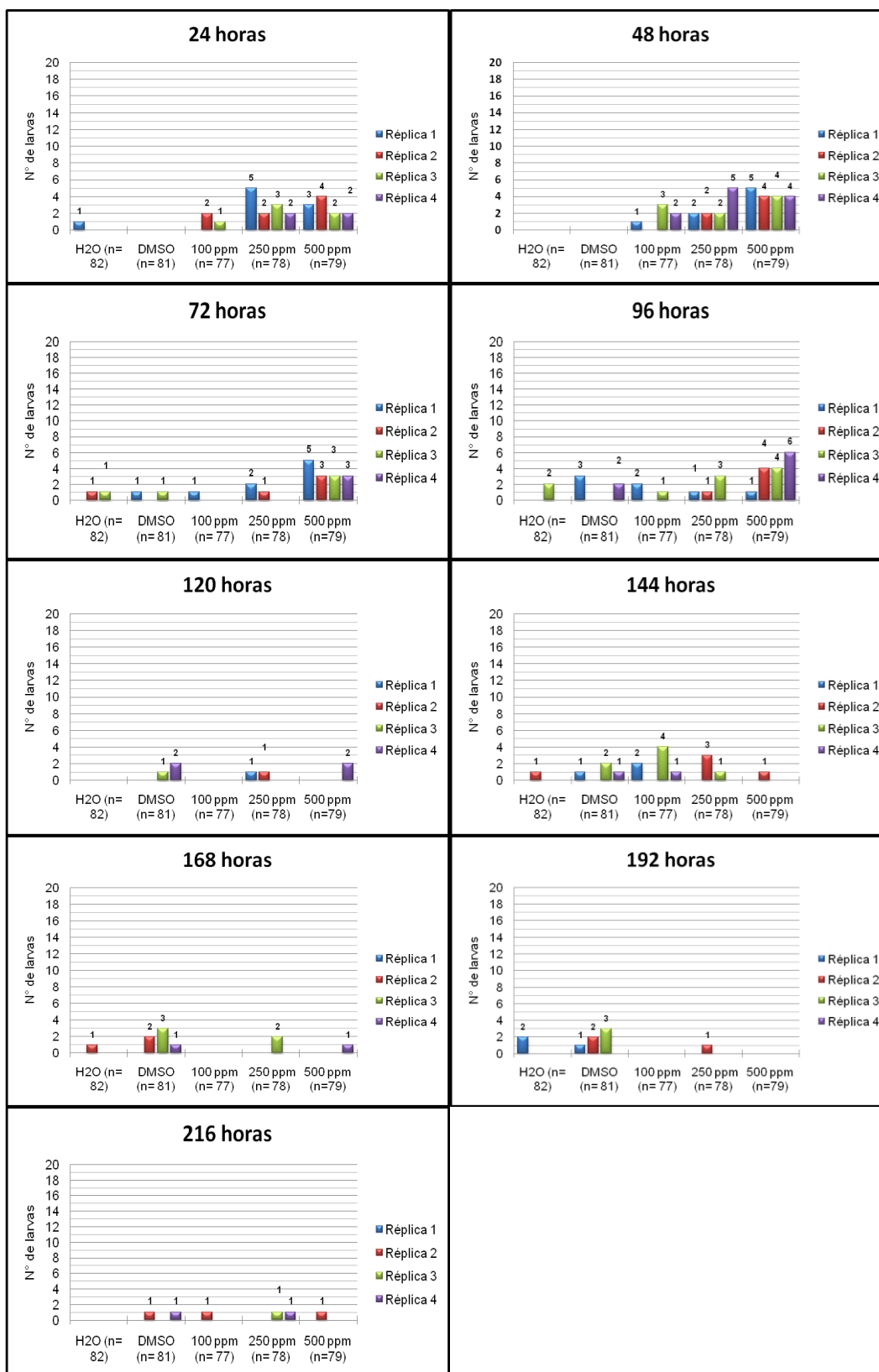
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 82)		CONTROLE DMSO (n= 81)		APFEM 100 ppm (n= 77)		APFEM 250 ppm (n= 78)		APFEM 500 ppm (n= 79)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	1,2	0,0	0,0	0,0	3,9	0,0	15,4	0,0	13,9	0,0
42 h	1,2	0,0	0,0	0,0	11,7	0,0	29,5	0,0	35,4	0,0
72 h	3,7	0,0	2,5	0,0	13,0	0,0	33,3	0,0	53,2	0,0
96 h	6,1	24,4	8,6	24,7	16,9	3,9	39,7	0,0	72,2	0,0
120 h	6,1	54,9	12,3	53,1	16,9	26,0	42,3	1,3	74,7	0,0
144 h	7,3	65,9	17,3	60,5	26,0	45,5	47,4	5,1	75,9	1,3
168 h	8,5	72,0	24,7	61,7	26,0	55,8	50,0	7,7	77,2	2,5
192 h	11,0	74,4	32,1	61,7	26,0	64,9	51,3	16,7	77,2	7,6
216 h	11,0	89,0	34,6	65,4	27,3	66,2	53,8	26,9	78,5	7,6
<b>TOTAL</b>	<b>11,0</b>	<b>89,0</b>	<b>34,6</b>	<b>65,4</b>	<b>27,3</b>	<b>66,2</b>	<b>53,8</b>	<b>26,9</b>	<b>78,5</b>	<b>7,6</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 15.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato APFEM sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (216 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 82)	82,9	6,1	0,0
DMSO (n= 81)	61,7	3,7	0,0
100 ppm (n= 77)	64,9	1,3	6,5
250 ppm (n= 78)	24,4	2,6	19,2
500 ppm (n= 79)	7,6	0,0	13,9

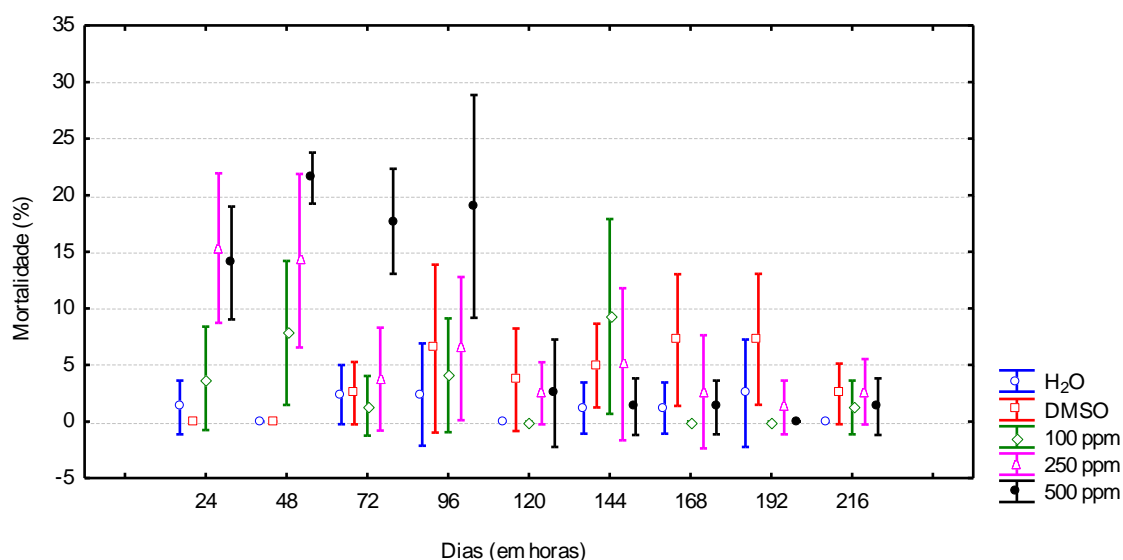
n = número total de larvas expostas.



**Figura 15.** Mortalidade larval não acumulada, por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato APFEM. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 16.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato APFEM. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	7,1886	0,000000*
	Concentração	14,2894	0,000000*
	Tempo X Concentração	4,4241	0,000000*



**Figura 16.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato APFEM.

O bioensaio preliminar realizado com o óleo essencial de *A. pickelii* durou 168 horas e mostrou atividade larvicida acima de 80% para as concentrações de 250 e 500 ppm sob condições controladas ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ , umidade  $70\% \pm 10$  e fotoperíodo 12:12) sobre populações de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, atingindo, assim, o critério estabelecido para a realização do bioensaio de efetividade. Apesar do resultado, observou-se a emergência de 5% de adultos para a concentração de 250 ppm do produto em questão (Tabelas 17 e 18 e Figuras 17).

A análise estatística dos dados obtidos a partir do bioensaio preliminar com OEAP mostrou que as variáveis tempo e concentração, assim como a interação entre elas, são estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação à variável porcentagem de mortalidade larval. A média do percentual de mortalidade observada no grupo referente à concentração de 500 ppm em 24 horas mostrou-se maior e diferente das médias dos grupos analisados, ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey. Pelo teste de Dunnet, os grupos referentes às

concentrações de 250 ppm em 24 e 48 horas, 500 ppm em 24 horas e DMSO em 144 horas diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle água. Não existiram diferenças para os demais grupos analisados (Tabela 19 e Figura 18).

**Tabela 17.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *A. pickelii* (OEAP) sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

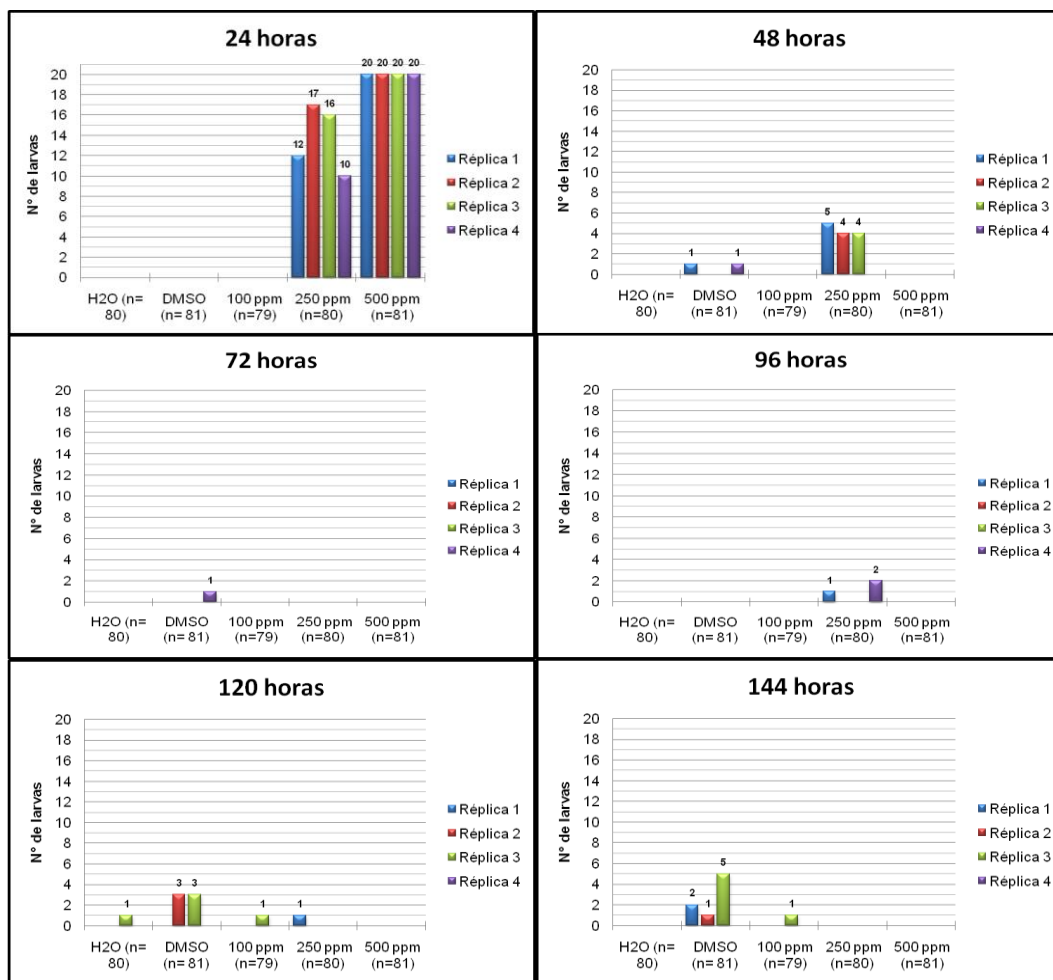
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 80)		CONTROLE DMSO (n= 81)		OEAP 100 ppm (n=79)		OEAP 250 ppm (n= 80)		OEAP 500 ppm (n= 81)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	68,8	0,0	98,8	0,0
42 h	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	85,0	6,3	98,8	0,0
72 h	0,0	0,0	3,7	0,0	0,0	0,0	85,0	6,3	98,8	0,0
96 h	0,0	42,5	3,7	18,5	0,0	27,8	88,8	6,3	98,8	0,0
120 h	1,3	86,3	11,1	65,4	1,3	74,7	88,8	11,3	98,8	0,0
144 h	1,3	95,0	21,0	71,6	2,5	86,1	88,8	11,3	98,8	0,0
168 h	1,3	98,8	21,0	74,1	2,5	96,2	88,8	11,3	98,8	0,0
<b>TOTAL</b>	<b>1,3</b>	<b>98,8</b>	<b>21,0</b>	<b>74,1</b>	<b>2,5</b>	<b>96,2</b>	<b>88,8</b>	<b>11,3</b>	<b>98,8</b>	<b>0,0</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 18.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *A. pickelii* (OEAP) sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (168 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 80)	83,8	15,0	0,0
DMSO (n= 81)	70,4	3,7	4,9
100 ppm (n= 79)	87,3	8,9	1,3
250 ppm (n= 80)	5,0	6,3	0,0
500 ppm (n= 81)	0,0	0,0	1,2

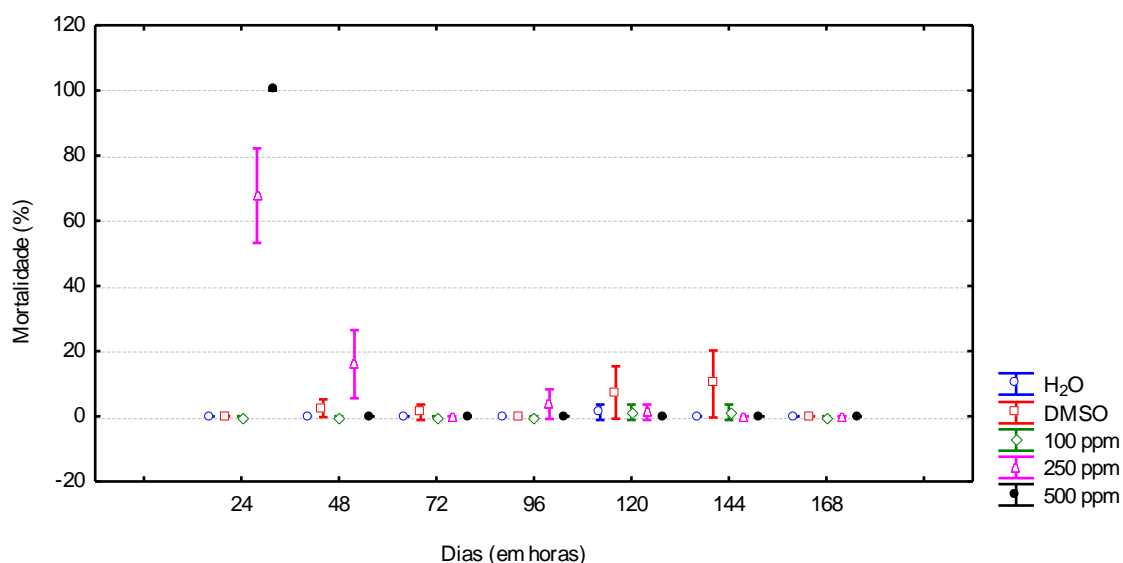
n = número total de larvas expostas.



**Figura 17.** Mortalidade larval não acumulada, por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio de efetividade realizado com o óleo essencial de *A. pickelii* (OEAP). (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 19.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o óleo essencial de *A. pickelii* (OEAP). Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	171,3396	0,00*
	Concentração	76,0452	0,00*
	Tempo X Concentração	76,7054	0,00*



**Figura 18.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o óleo essencial de *A. pickelii* (OEAP).

O bioensaio de efetividade com OEAP durou 240 horas e apresentou mortalidade acima de 80% nas concentrações de 200, 225 e 250 ppm sob condições controladas ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ , umidade  $70\% \pm 10$  e fotoperíodo 12:12) sobre populações de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller. Ainda sim, na concentração de 250 ppm observou-se a emergência de 8,3% de adultos (Tabelas 20 e 21 e Figuras 19).

A análise estatística dos dados obtidos a partir do bioensaio de efetividade com OEAP mostrou que as variáveis tempo e concentração, assim como a interação entre elas, são estatisticamente significativas em relação à variável porcentagem de mortalidade larval ( $p < 0,05$ ). A média do percentual de mortalidade observada no grupo referente à concentração de 250 ppm em 24 horas mostrou-se maior e diferente das médias dos grupos analisados, ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey. Pelo teste de Dunnet, os grupos referentes às concentrações 150, 200, 225 e 250 em 24 horas, 150 em 48 horas e DMSO e 125 ppm em 192 horas diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle água. Não existiram diferenças para os demais grupos analisados (Tabela 22 e Figura 20).



**Tabela 20.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *A. pickelii* (OEAP) sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 125 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 225 ppm e 250 ppm com duração total de 240 horas (dez dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 60)		CONTROLE DMSO (n= 59)		OEAP 125 ppm (n= 58)		OEAP 150 ppm (n= 60)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	0,0	0,0	5,2	0,0	13,3	0,0
48 h	0,0	1,7	0,0	0,0	10,3	0,0	26,7	0,0
72 h	0,0	3,3	3,4	5,1	12,1	3,4	28,3	0,0
96 h	3,3	40,0	3,4	37,3	12,1	22,4	33,3	23,3
120 h	5,0	60,0	3,4	62,7	12,1	44,8	33,3	36,7
144 h	5,0	65,0	3,4	66,1	12,1	51,7	35,0	41,7
168 h	5,0	70,0	3,4	66,1	22,4	53,4	40,0	50,0
192 h	6,7	71,7	15,3	67,8	39,7	53,4	45,0	50,0
216 h	8,3	85,0	16,9	78,0	39,7	56,9	48,3	50,0
240 h	8,3	91,7	16,9	79,7	39,7	56,9	48,3	50,0
<b>TOTAL</b>	<b>8,3</b>	<b>91,7</b>	<b>16,9</b>	<b>79,7</b>	<b>39,7</b>	<b>56,9</b>	<b>48,3</b>	<b>50,0</b>

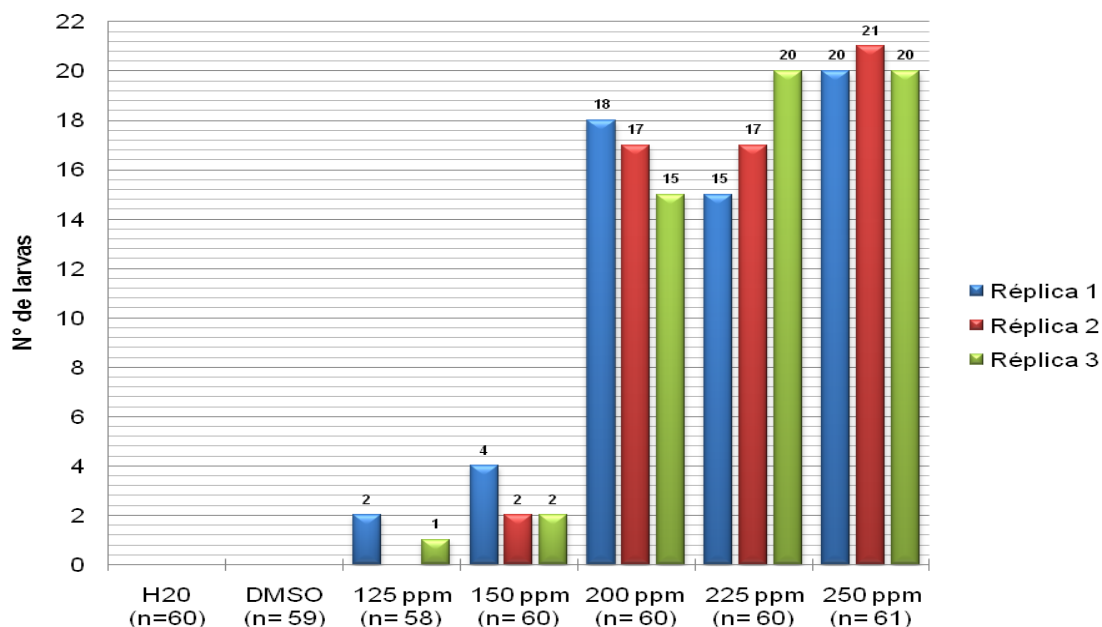
HORAS	OEAP 200 ppm (n= 60)		OEAP 225 ppm (n= 60)		OEAP 250 ppm (n= 61)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	83,3	0,0	86,7	0,0	100,0	0,0
48 h	93,3	0,0	88,3	0,0	100,0	0,0
72 h	95,0	0,0	88,3	0,0	100,0	0,0
96 h	96,7	0,0	90,0	1,7	100,0	0,0
120 h	96,7	0,0	90,0	6,7	100,0	0,0
144 h	96,7	0,0	91,7	8,3	100,0	0,0
168 h	98,3	0,0	91,7	8,3	100,0	0,0
192 h	100,0	0,0	91,7	8,3	100,0	0,0
216 h	100,0	0,0	91,7	8,3	100,0	0,0
240 h	100,0	0,0	91,7	8,3	100,0	0,0
<b>TOTAL</b>	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>	<b>91,7</b>	<b>8,3</b>	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 21.** Emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *A. pickelii* (OEAP) sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 125 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 225 ppm e 250 ppm com duração total de 240 horas (dez dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (240 horas)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 60)	86,7	5,0	0,0
DMSO (n= 59)	78,0	1,7	3,4
125 ppm (n= 58)	53,4	3,4	3,4
150 ppm (n= 60)	50,0	0,0	1,7
200 ppm (n= 60)	0,0	0,0	0,0
225 ppm (n= 60)	8,3	0,0	0,0
250 ppm (n= 60)	0,0	0,0	0,0

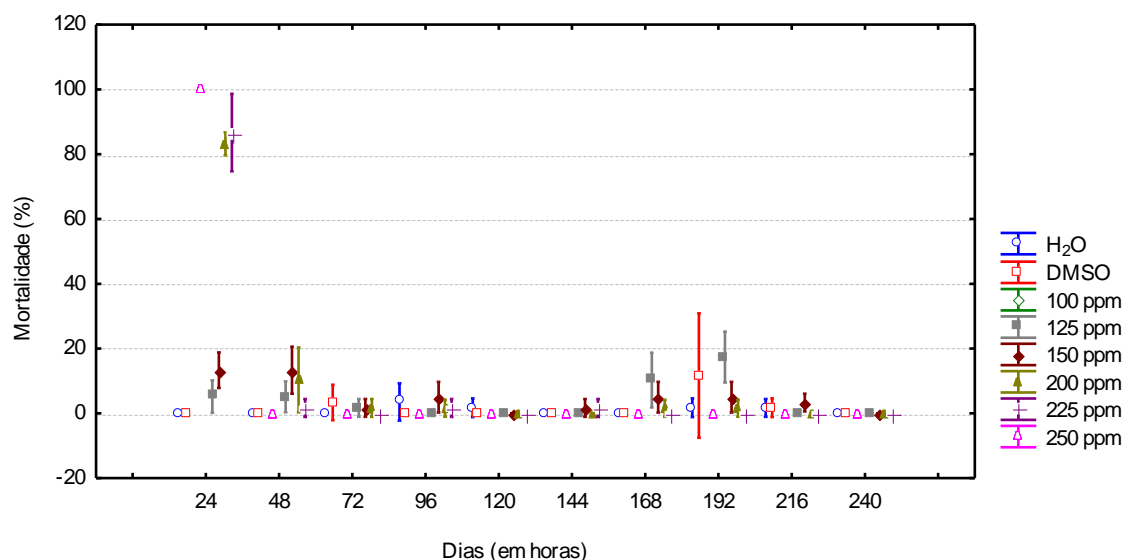
n = número total de larvas expostas.



**Figura 19.** Mortalidade larval não acumulada, por concentração e por réplica no horário em que ocorreu maior porcentagem de mortalidade larval (24 horas), referente ao bioensaio de efetividade realizado com o óleo essencial de *A. pickelii* (OEAP). (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 22.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o óleo essencial de *A. pickelii* (OEAP). Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	185,1243	0,00*
	Concentração	25,7555	0,00*
	Tempo X Concentração	38,5426	0,00*



**Figura 20.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o óleo essencial de *A. pickelii* (OEAP).

Os extratos metanólico e éter de petróleo da casca e folhas *A. vepretorum* mostraram atividade larvívora abaixo de 80% sob condições controladas ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ , umidade  $70\% \pm 10$  e fotoperíodo 12:12) sobre populações de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, a partir de bioensaios preliminares com duração de 168 horas. Todas as concentrações testadas permitiram a emergência de adultos (Tabelas 23, 24, 26, 27, 29, 30, 32 e 33 e Figuras 21, 23, 25 e 27).

Apesar dos resultados não satisfatórios para os extratos metanólico e éter de petróleo de casca e folhas *A. vepretorum*, as análises estatísticas para AVCEEP e AVFEPP mostraram que as variáveis tempo e concentração, assim como a interação entre elas, são estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação à variável porcentagem de mortalidade larval.

A média do percentual de mortalidade observada no grupo referente à AVCEEP na concentração de 500 ppm em 24 horas e AVFEPP na concentração de 250 ppm em 48 horas mostraram-se maiores e diferentes das médias dos demais grupos analisados nos bioensaios preliminares realizados com diferente

concentrações dos mesmos produtos, respectivamente, ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. Pelo teste de Dunnet, o grupo referente à AVCEEP na concentração de 500 ppm em 24 e 48 horas e AVFEEP na concentração de 250 ppm em 48 horas diferiram-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle água. Não existiram diferenças para os demais grupos analisados (Tabelas 25, 26, 31 e 34 e Figuras 22, 24, 26 e 28).

Os compostos AVCEEP e AVFEEP apresentaram característica muito oleosa, não sendo possível a sua diluição em água. Tais extratos aderiram-se à parede dos copos de plástico utilizados para a realização dos bioensaios, sendo que a morte das larvas se deu de forma mecânica, onde as mesmas encostavam na parede dos copos e ficavam aderidas aos produtos extremamente oleosos, debatendo-se até a morte. Em alguns casos, observou-se que a região onde fica localizado o sifão respiratório da larva era onde ocorria adesão ao extrato já aderido na parede do copo, impedindo-as de respirar.

**Tabela 23.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato AVCEEP sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

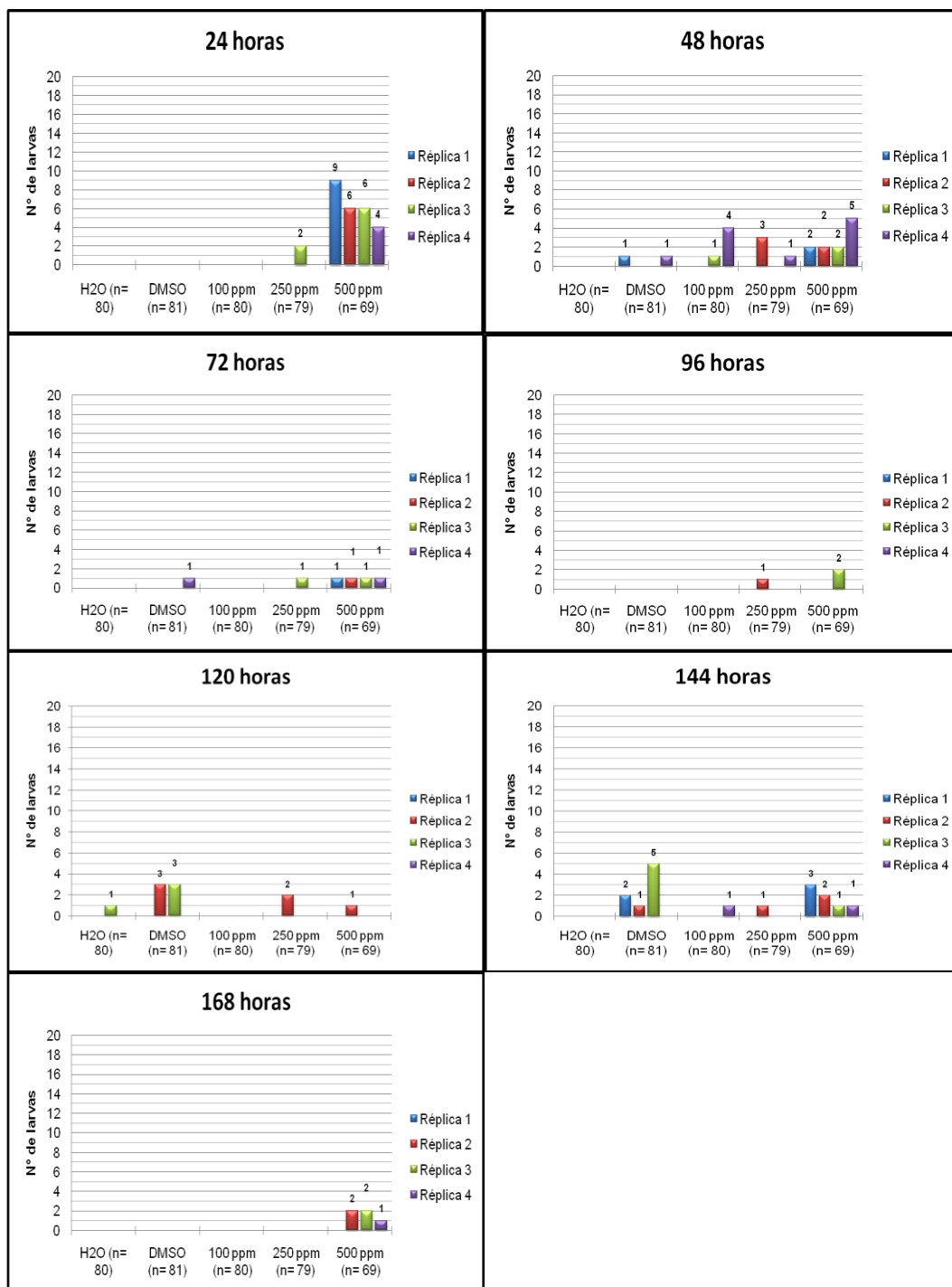
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 80)		CONTROLE DMSO (n= 81)		AVCEEP 100 ppm (n= 80)		AVCEEP 250 ppm (n= 79)		AVCEEP 500 ppm (n= 69)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	36,2	0,0
42 h	0,0	0,0	2,5	0,0	6,3	0,0	7,6	0,0	52,2	0,0
72 h	0,0	0,0	3,7	0,0	6,3	0,0	8,9	0,0	58,0	0,0
96 h	0,0	42,5	3,7	18,5	6,3	36,3	10,1	22,8	60,9	0,0
120 h	1,3	86,3	11,1	65,4	6,3	73,8	12,7	62,0	62,3	0,0
144 h	1,3	95,0	21,0	71,6	7,5	81,3	13,9	73,4	72,5	1,4
168 h	1,3	98,8	21,0	74,1	7,5	82,5	13,9	75,9	79,7	5,8
<b>TOTAL</b>	<b>1,3</b>	<b>98,8</b>	<b>21,0</b>	<b>74,1</b>	<b>7,5</b>	<b>82,5</b>	<b>13,9</b>	<b>75,9</b>	<b>79,7</b>	<b>5,8</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 24.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato AVCEEP sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (168 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 80)	83,8	15,0	0,0
DMSO (n= 81)	70,4	3,7	4,9
100 ppm (n= 80)	81,3	1,3	10,0
250 ppm (n= 79)	64,6	11,4	10,1
500 ppm (n= 69)	2,9	2,9	14,5

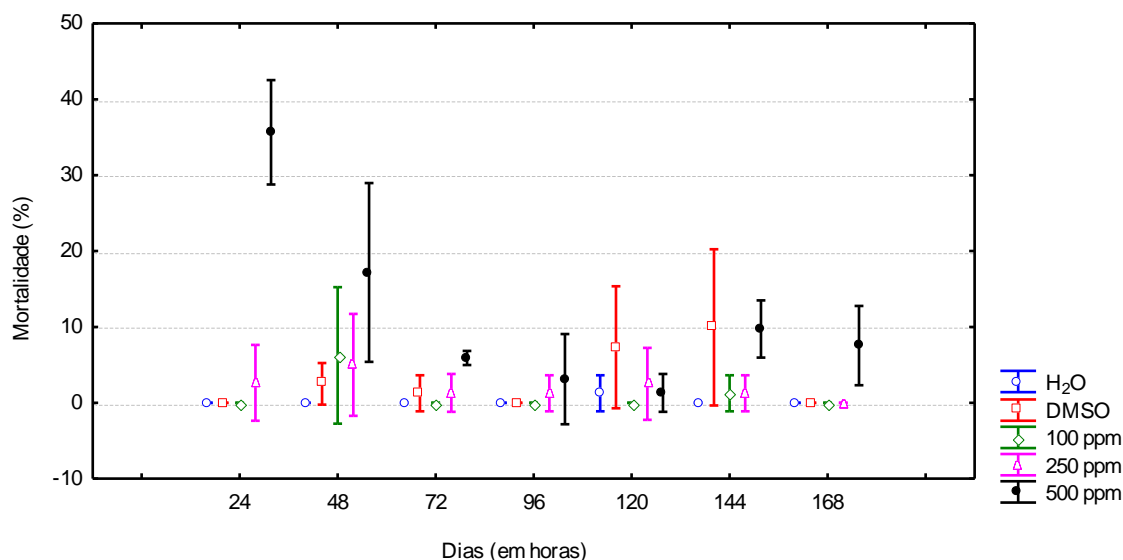
n = número total de larvas expostas.



**Figura 21.** Mortalidade larval não acumulada, por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato AVCEEP. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 25.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato AVCEEP. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	6,50454	0,000007*
	Concentração	28,10184	0,000000*
	Tempo X Concentração	6,28873	0,000000*



**Figura 22.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato AVCEEP.

**Tabela 26.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato AVCEM sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 78)		CONTROLE DMSO (n= 80)		AVCEM 100 ppm (n= 80)		AVCEM 250 ppm (n= 76)		AVCEM 500 ppm (n= 79)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	5,1	0	2,5	0,0	0,0	0,0	2,6	0,0	0,0	0,0
42 h	5,1	0	2,5	0,0	1,3	0,0	2,6	0,0	13,9	0,0
72 h	7,7	3,8	5,0	6,3	1,3	2,5	6,6	0,0	15,2	0,0
96 h	11,5	42,3	23,8	27,5	8,8	42,5	10,5	13,2	30,4	2,5
120 h	17,9	60,3	42,5	48,8	8,8	70,0	21,1	46,1	41,8	13,9
144 h	20,5	67,9	48,8	50,0	8,8	82,5	26,3	64,5	43,0	32,9
168 h	25,6	74,4	50,0	50,0	8,8	82,5	28,9	67,1	43,0	46,8
<b>TOTAL</b>	<b>25,6</b>	<b>74,4</b>	<b>50,0</b>	<b>50</b>	<b>8,8</b>	<b>82,5</b>	<b>28,9</b>	<b>67,1</b>	<b>43,0</b>	<b>46,8</b>

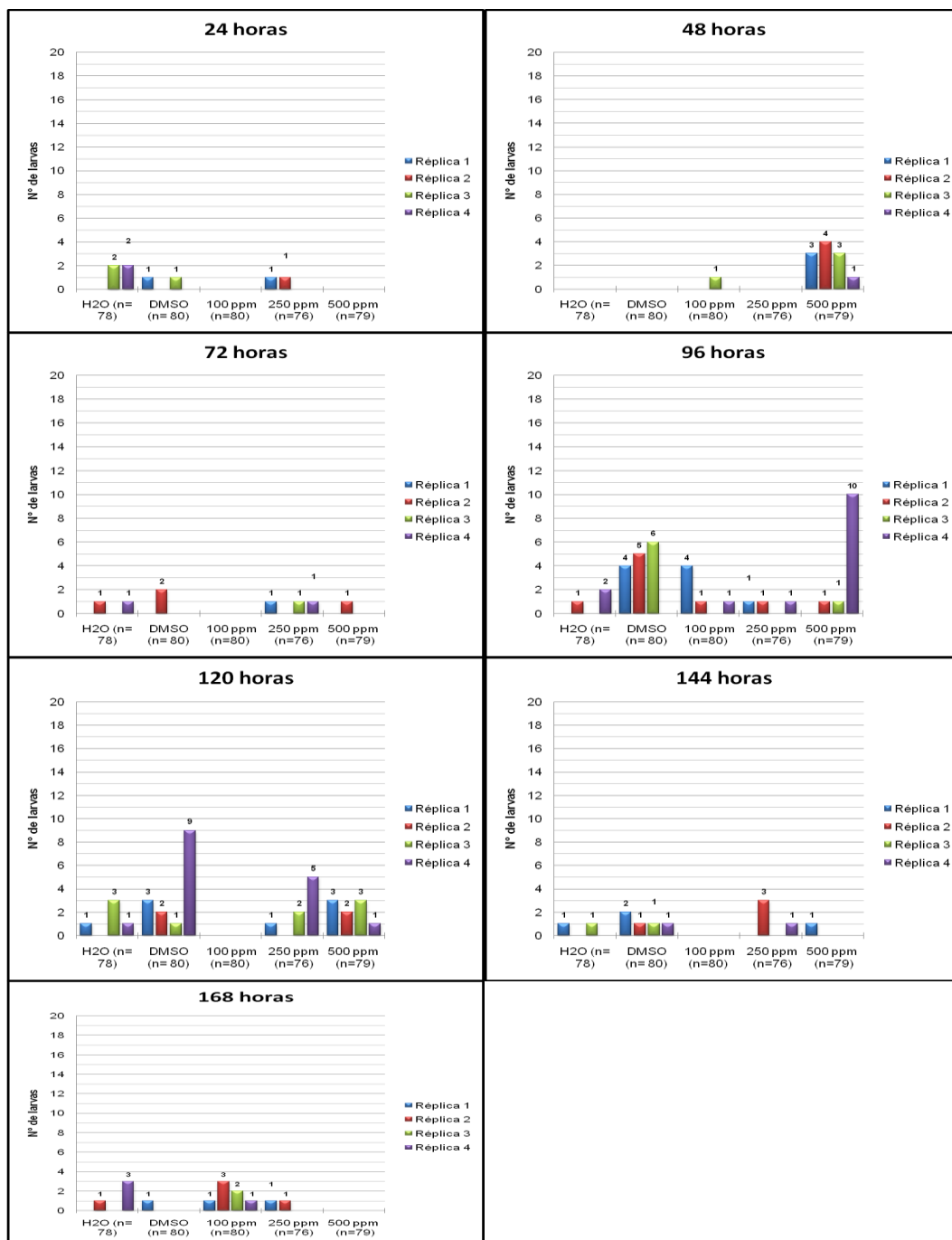
M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 27.** Emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato AVCEM sobre imaturos de *Aedes aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (168 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 78)	59,0	15,4	11,5
DMSO (n= 80)	36,3	13,8	1,3
100 ppm (n= 80)	81,3	1,3	0,0
250 ppm (n= 76)	63,2	3,9	2,6
500 ppm (n=79)	29,1	17,7	10,1

n = número total de larvas expostas.

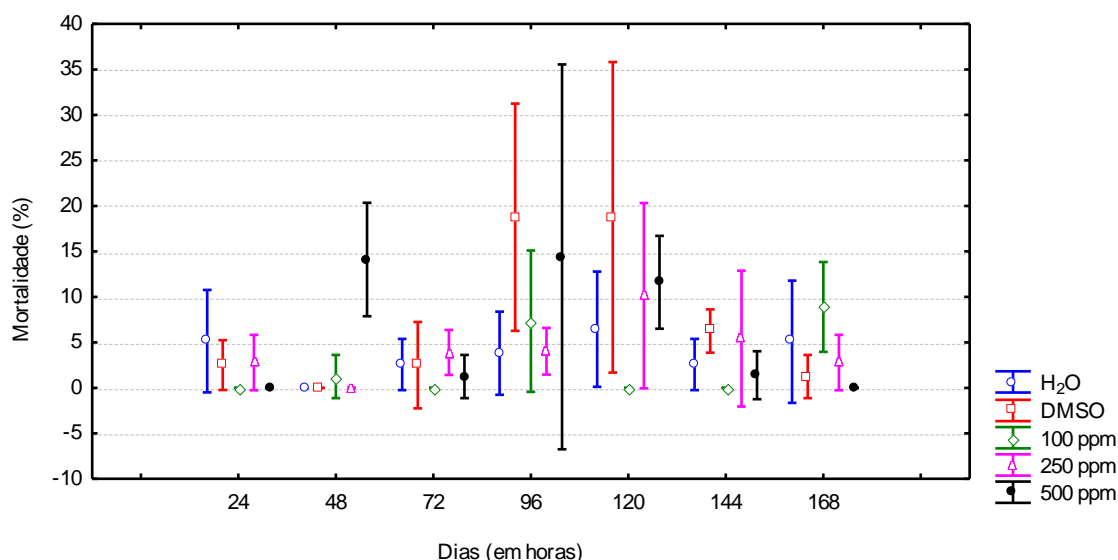




**Figura 23.** Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato AVCEM. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 28.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato AVCEM. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	4,86329	0,000202*
	Concentração	2,16849	0,077577
	Tempo X Concentração	1,90790	0,013625*



**Figura 24.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato AVCEM.

**Tabela 29.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato AVFEEP sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

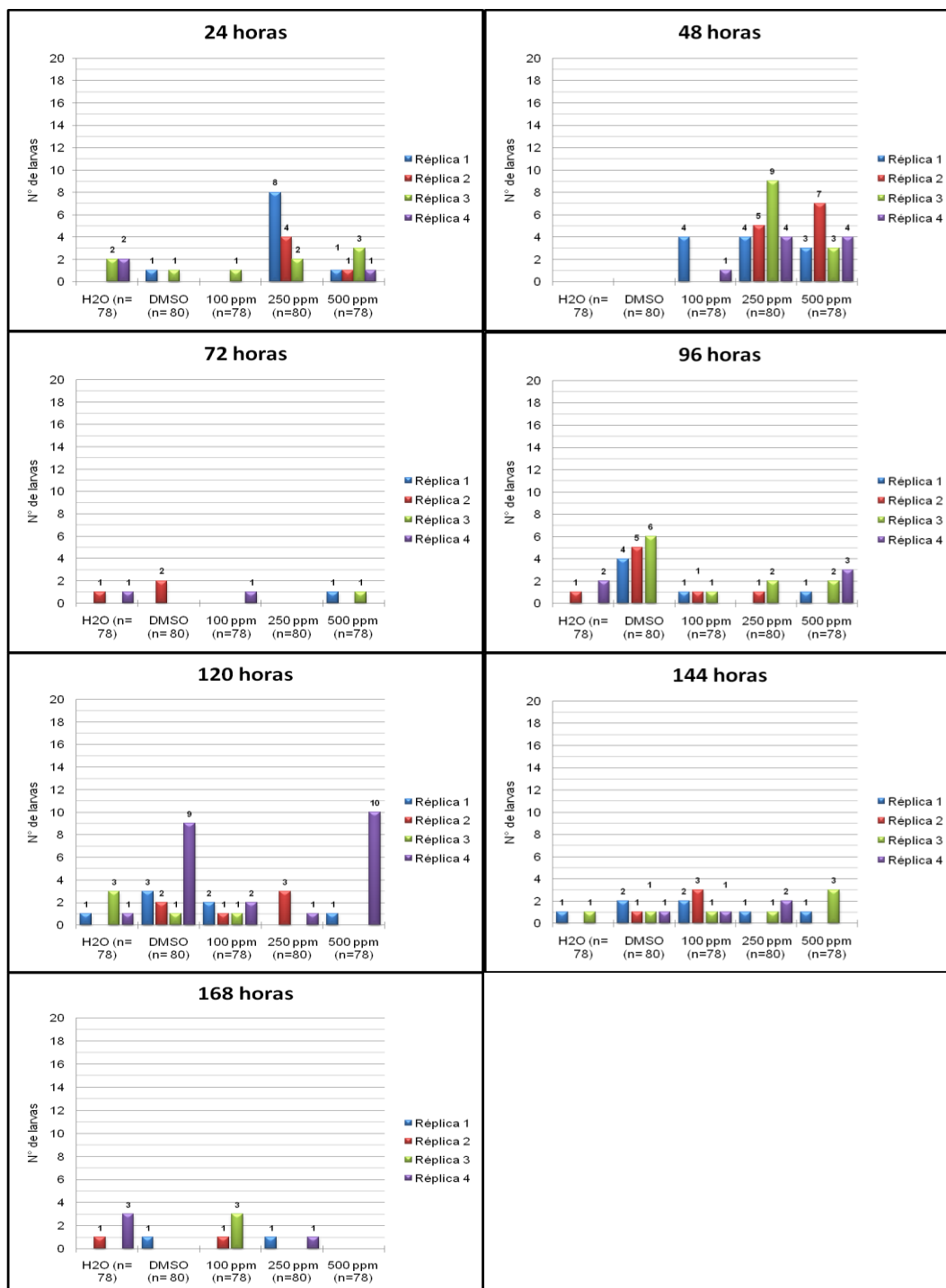
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 78)		CONTROLE DMSO (n= 80)		AVFEEP 100 ppm (n= 78)		AVFEEP 250 ppm (n= 80)		AVFEEP 500 ppm (n=78)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	5,1	0,0	2,5	0,0	1,3	0,0	17,5	0,0	7,7	0,0
42 h	5,1	0,0	2,5	0,0	7,7	0,0	45,0	0,0	29,5	0,0
72 h	7,7	3,8	5,0	6,3	9,0	2,6	45,0	0,0	32,1	1,3
96 h	11,5	42,3	23,8	27,5	12,8	23,1	48,8	0,0	39,7	11,5
120 h	17,9	60,3	42,5	48,8	20,5	51,3	53,8	15,0	53,8	29,5
144 h	20,5	67,9	48,8	50,0	29,5	59,0	58,8	33,8	59,0	37,2
168 h	25,6	74,4	50,0	50,0	34,6	61,5	61,3	36,3	59,0	39,7
<b>TOTAL</b>	<b>25,6</b>	<b>74,4</b>	<b>50,0</b>	<b>50</b>	<b>34,6</b>	<b>62,0</b>	<b>61,3</b>	<b>36,3</b>	<b>59,0</b>	<b>39,7</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 30.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato AVFEEP sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (168 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 78)	59,0	15,4	0,0
DMSO (n= 80)	36,3	13,8	0,0
100 ppm (n= 78)	37,2	24,4	3,8
250 ppm (n= 80)	36,3	0,0	2,5
500 ppm (n= 78)	35,9	3,8	1,3

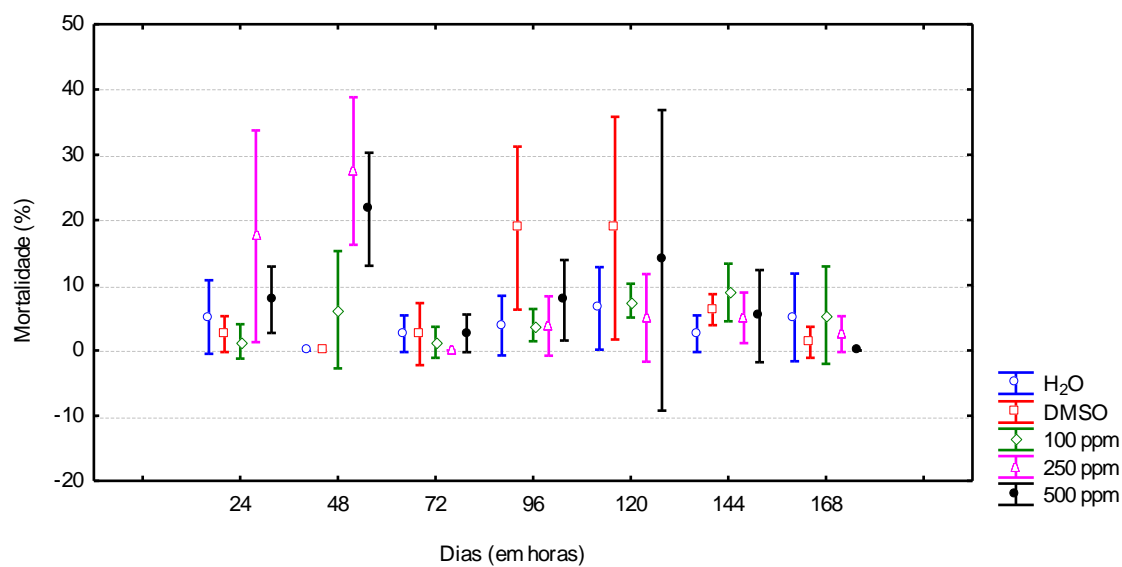
n = número total de larvas expostas.



**Figura 25.** Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato AVFEEP. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 31.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato AVFEED. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	3,79597	0,001837*
	Concentração	2,12437	0,082902
	Tempo X Concentração	2,66634	0,000323*



**Figura 26.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato AVFEED.

**Tabela 32.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato AVFEM sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

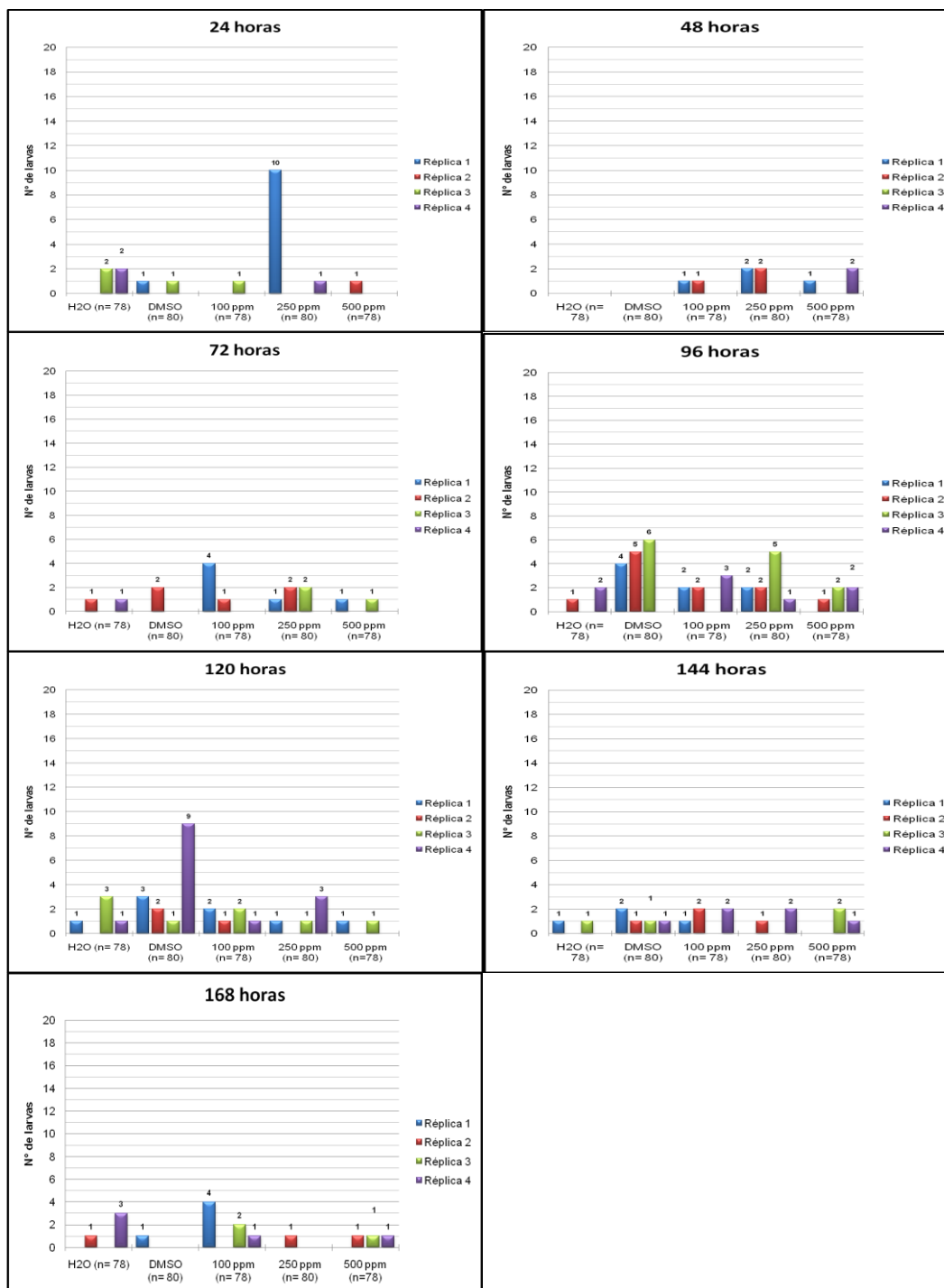
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 78)		CONTROLE DMSO (n= 80)		AVFEM 100 ppm (n= 78)		AVFEM 250 ppm (n= 80)		AVFEM 500 ppm (n= 78)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	5,1	0,0	2,5	0,0	1,3	0,0	13,8	0,0	1,3	0,0
42 h	5,1	0,0	2,5	0,0	3,8	0,0	18,8	0,0	5,1	0,0
72 h	7,7	3,8	5,0	6,3	10,3	2,6	25,0	0,0	7,7	0,0
96 h	11,5	42,3	23,8	27,5	19,2	23,1	37,5	0,0	14,1	20,5
120 h	17,9	60,3	42,5	48,8	26,9	46,2	43,8	18,8	16,7	65,4
144 h	20,5	67,9	48,8	50,0	33,3	52,6	47,5	43,8	20,5	74,4
168 h	25,6	74,4	50,0	50,0	42,3	53,8	48,8	47,5	24,4	75,6
<b>TOTAL</b>	<b>25,6</b>	<b>74,4</b>	<b>50,0</b>	<b>50,0</b>	<b>42,3</b>	<b>53,8</b>	<b>48,8</b>	<b>47,5</b>	<b>24,4</b>	<b>75,6</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 33.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato AVFEM sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (168 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 78)	59,0	15,4	0,0
DMSO (n= 80)	36,3	13,8	0,0
100 ppm (n= 78)	46,2	7,7	3,8
250 ppm (n= 80)	46,3	1,3	3,8
500 ppm (n= 78)	70,5	5,1	0,0

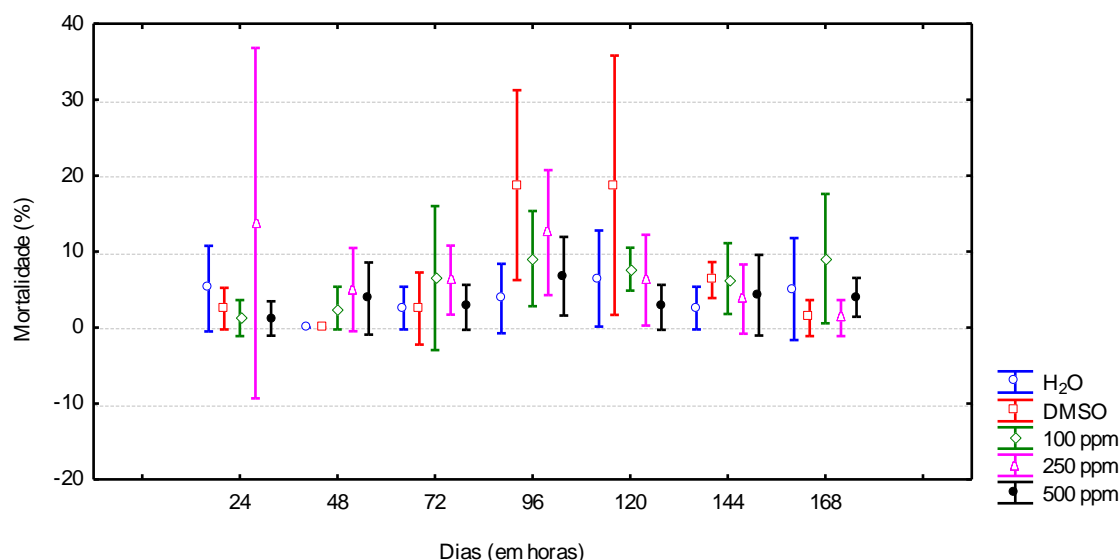
n = número total de larvas expostas.



**Figura 27.** Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato AVFEM. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 34.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato AVFEM. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	2,81361	0,014041*
	Concentração	1,57172	0,187271
	Tempo X Concentração	1,22835	0,235628



**Figura 28.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato AVFEM.

Já o bioensaio preliminar realizado com o óleo essencial de *A. vepretorum* durou 168 horas e mostrou atividade larvicida acima de 100% para as concentrações de 250 e 500 ppm sob condições controladas ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ , umidade  $70\% \pm 10$  e fotoperíodo 12:12) sobre populações de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, atingindo, assim, o critério estabelecido para a realização do bioensaio de efetividade (Tabelas 35 e 36 e Figura 29).

A análise estatística realizada a partir dos dados obtidos no bioensaio preliminar com o composto OEAV mostrou que as variáveis tempo e concentração, assim como a interação entre elas, são estatisticamente significativas em relação à variável porcentagem de mortalidade larval ( $p < 0,05$ ). As médias do percentual de mortalidade observada nos grupos referentes às concentrações de 250 e 500 ppm em 24 horas mostraram-se maiores e diferentes das médias dos demais grupos analisado, ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. Pelo teste de Dunnet, os grupos referentes às concentrações de 250 e 500 ppm em 24 horas, DMSO em 120 e 144 horas e 100



ppm em 168 horas diferiram-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle água. Não existiram diferenças para os demais grupos analisados (Tabela 37 e Figura 30).

**Tabela 35.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *A. vepretorum* (OEAV) sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

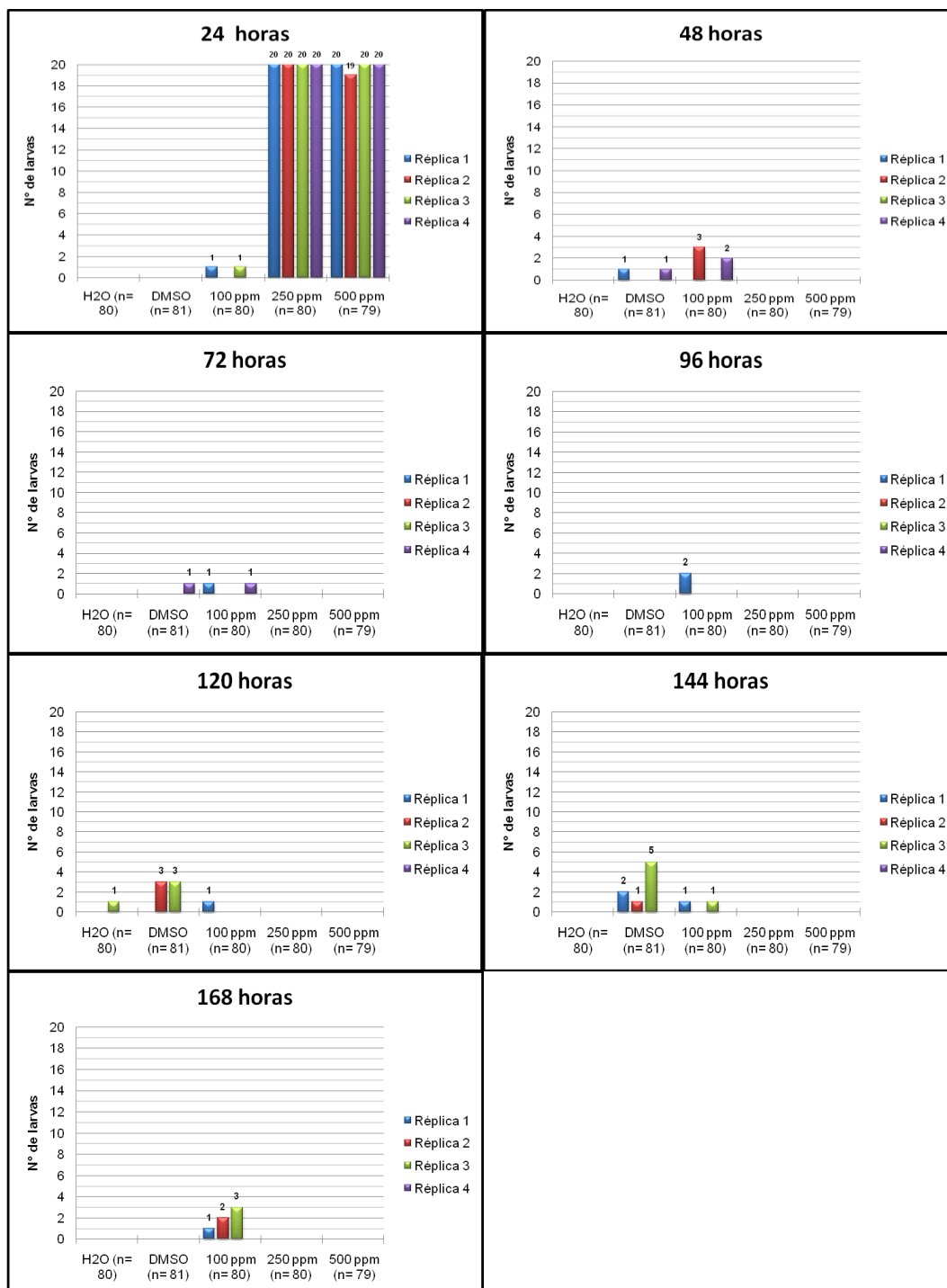
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 80)		CONTROLE DMSO (n= 81)		OEAV 100 ppm (n= 80)		OEAV 250 ppm (n= 80)		OEAV 500 ppm (n= 79)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
42 h	0,0	0,0	2,5	0,0	8,8	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
72 h	0,0	0,0	3,7	0,0	11,3	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
96 h	0,0	42,5	3,7	18,5	13,8	16,3	100,0	0,0	100,0	0,0
120 h	1,3	86,3	11,1	65,4	15,0	47,5	100,0	0,0	100,0	0,0
144 h	1,3	95,0	21,0	71,6	17,5	57,5	100,0	0,0	100,0	0,0
168 h	1,3	98,8	21,0	74,1	25,0	63,8	100,0	0,0	100,0	0,0
<b>TOTAL</b>	<b>1,3</b>	<b>98,8</b>	<b>21,0</b>	<b>74,1</b>	<b>25,0</b>	<b>63,8</b>	<b>100,0</b>	<b>0</b>	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 36.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *A. vepretorum* (OEAV) sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (168 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 80)	83,8	15,0	0,0
DMSO (n= 81)	70,4	3,7	4,9
100 ppm (n= 80)	53,8	10,0	11,3
250 ppm (n= 80)	0,0	0,0	0,0
500 ppm (n= 79)	0,0	0,0	0,0

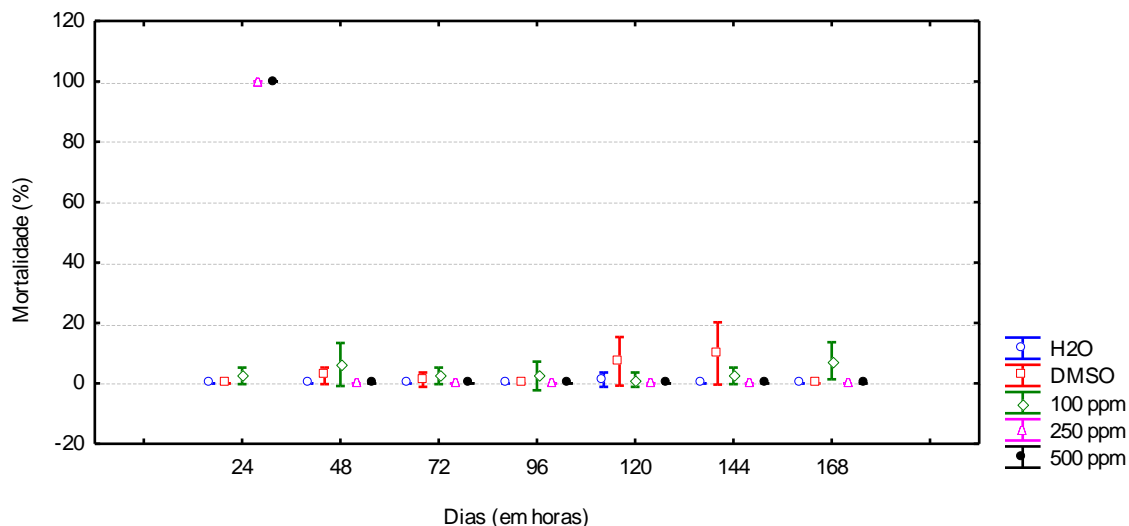
n = número total de larvas expostas.



**Figura 29.** Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o óleo essencial de *A. vepretorum* (OEAV). (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 37.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o óleo essencial de *A. vepretorum* (OEAV). Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	418,8947	0,00*
	Concentração	121,4235	0,00*
	Tempo X Concentração	172,0791	0,00*



**Figura 30.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o óleo essencial de *A. vepretorum* (OEAV).

Por fim, o bioensaio de efetividade com óleo essencial de *A. vepretorum* durou 288 horas e apresentou mortalidade acima de 80% nas concentrações de 175, 200, 225, 250, 275 e 300 ppm sob condições controladas ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ , umidade  $70\% \pm 10$  e fotoperíodo 12:12) sobre populações de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller. Ainda sim, nas concentrações 175, 200, 225 e 250 ppm observou-se a emergência de adultos (Tabelas 38 e 39 e Figura 31).

A análise estatística dos dados obtidos através de bioensaio de efetividade com o composto OEAV mostrou que as variáveis tempo e concentração, assim como a interação entre elas, também são estatisticamente significativas em relação à variável porcentagem de mortalidade larval ( $p < 0,05$ ). As médias do percentual de mortalidade observada nos grupos referentes às concentrações de 225, 250, 275 e 300 ppm em 24 horas mostraram-se maiores e diferentes das médias dos demais grupos analisado, ao nível de significância de 5% pelo teste

de Tukey. Não existiram diferenças para os demais grupos analisados (Tabela 40 e Figura 32).

**Tabela 38.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *A. vepretorum* (OEAV) sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 e 300 ppm, com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

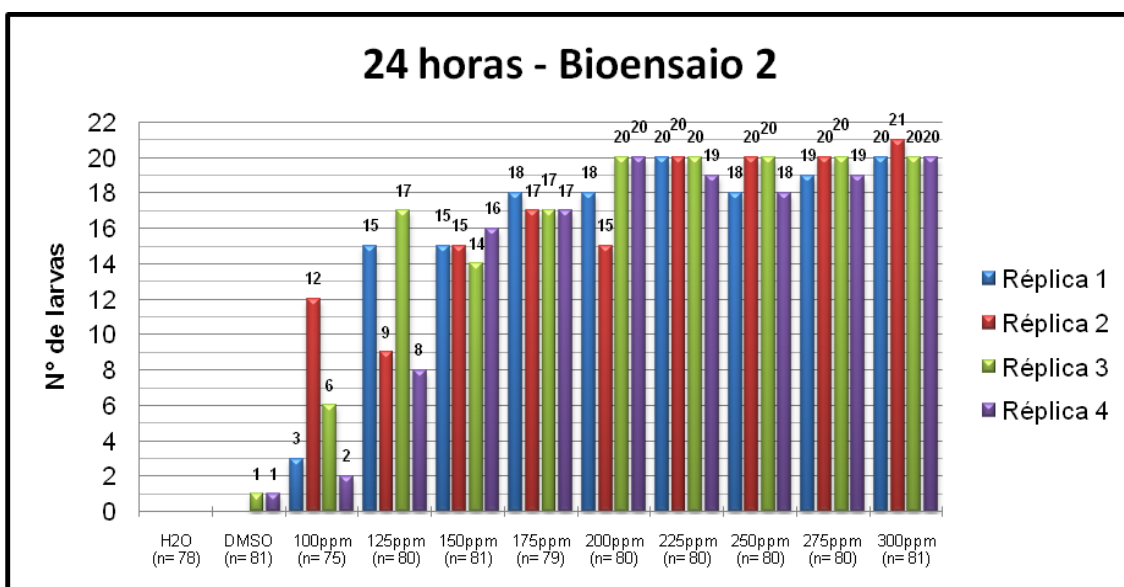
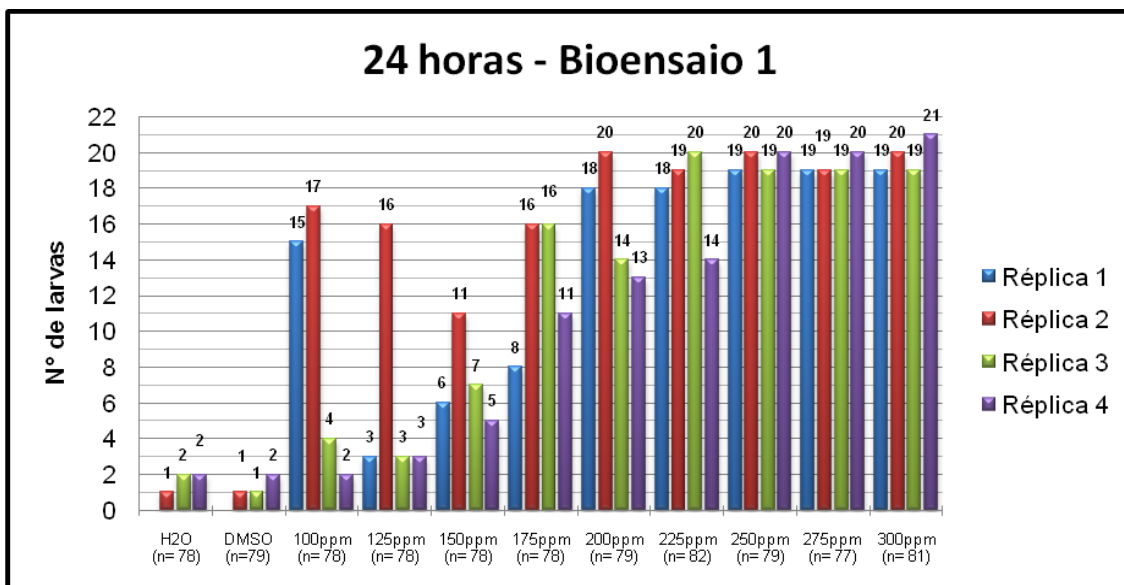
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 156)		CONTROLE DMSO (n= 160)		OEAV 100 ppm (n= 153)		OEAV 125 ppm (n= 158)		OEAV 150 ppm (n = 159)		OEAV 175 ppm (n= 157)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	3,2	0,0	3,8	0,0	39,9	0,0	46,8	0,0	56,0	0,0	76,4	0,0
48 h	11,5	10,3	8,8	10,0	47,1	7,8	53,2	5,7	65,4	5,0	83,4	2,5
72 h	14,1	23,7	10,0	22,5	49,7	17,0	56,3	10,8	65,4	8,8	84,1	3,8
96 h	17,3	62,2	12,5	64,4	51,0	32,7	57,6	20,3	68,6	14,5	88,5	9,6
120 h	20,5	73,7	13,8	81,9	52,9	41,8	58,9	30,4	68,6	19,5	88,5	9,6
144 h	20,5	76,9	13,8	81,9	54,2	43,8	60,1	34,8	69,2	25,8	88,5	11,5
168 h	20,5	77,6	14,4	81,9	54,2	44,4	61,4	36,7	69,8	28,3	88,5	11,5
192 h	21,2	77,6	14,4	82,5	54,2	44,4	62,0	36,7	69,8	28,3	88,5	11,5
216 h	21,2	77,6	15,6	82,5	54,2	44,4	62,0	36,7	69,8	28,3	88,5	11,5
240 h	21,2	77,6	15,6	82,5	54,2	44,4	62,0	36,7	71,1	28,3	88,5	11,5
264 h	21,2	77,6	15,6	82,5	54,9	44,4	62,0	36,7	71,1	28,3	88,5	11,5
288 h	22,4	77,6	15,6	82,5	54,9	44,4	62,0	37,3	71,1	28,3	88,5	11,5
<b>TOTAL</b>	<b>22,4</b>	<b>77,6</b>	<b>15,6</b>	<b>82,5</b>	<b>54,9</b>	<b>44,4</b>	<b>62,0</b>	<b>37,3</b>	<b>71,1</b>	<b>28,3</b>	<b>88,5</b>	<b>11,5</b>

HORAS	OEAV 200 ppm (n=159)		OEAV 225 ppm (n=162)		OEAV 250 ppm (n= 159)		OEAV 275 ppm (n= 157)		OEAV 300 ppm (n= 162)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	86,8	0,0	92,6	0,0	96,9	0,0	98,7	0,0	98,8	0,0
48 h	91,8	1,3	96,9	0,0	98,1	1,3	100,0	0,0	98,8	0,0
72 h	96,2	1,3	97,5	0,0	98,1	1,9	100,0	0,0	99,4	0,0
96 h	96,2	3,1	98,1	0,0	98,1	1,9	100,0	0,0	99,4	0,0
120 h	96,2	3,1	98,1	1,2	98,1	1,9	100,0	0,0	100,0	0,0
144 h	96,2	3,8	98,1	1,9	98,1	1,9	100,0	0,0	100,0	0,0
168 h	96,2	3,8	98,1	1,9	98,1	1,9	100,0	0,0	100,0	0,0
192 h	96,2	3,8	98,1	1,9	98,1	1,9	100,0	0,0	100,0	0,0
216 h	96,2	3,8	98,1	1,9	98,1	1,9	100,0	0,0	100,0	0,0
240 h	96,2	3,8	98,1	1,9	98,1	1,9	100,0	0,0	100,0	0,0
264 h	96,2	3,8	98,1	1,9	98,1	1,9	100,0	0,0	100,0	0,0
288 h	96,2	3,8	98,1	1,9	98,1	1,9	100,0	0,0	100,0	0,0
<b>TOTAL</b>	<b>96,2</b>	<b>3,8</b>	<b>98,1</b>	<b>1,9</b>	<b>98,1</b>	<b>1,9</b>	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 39.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *A. vepretorum* (OEAV) sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 e 300 ppm, com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

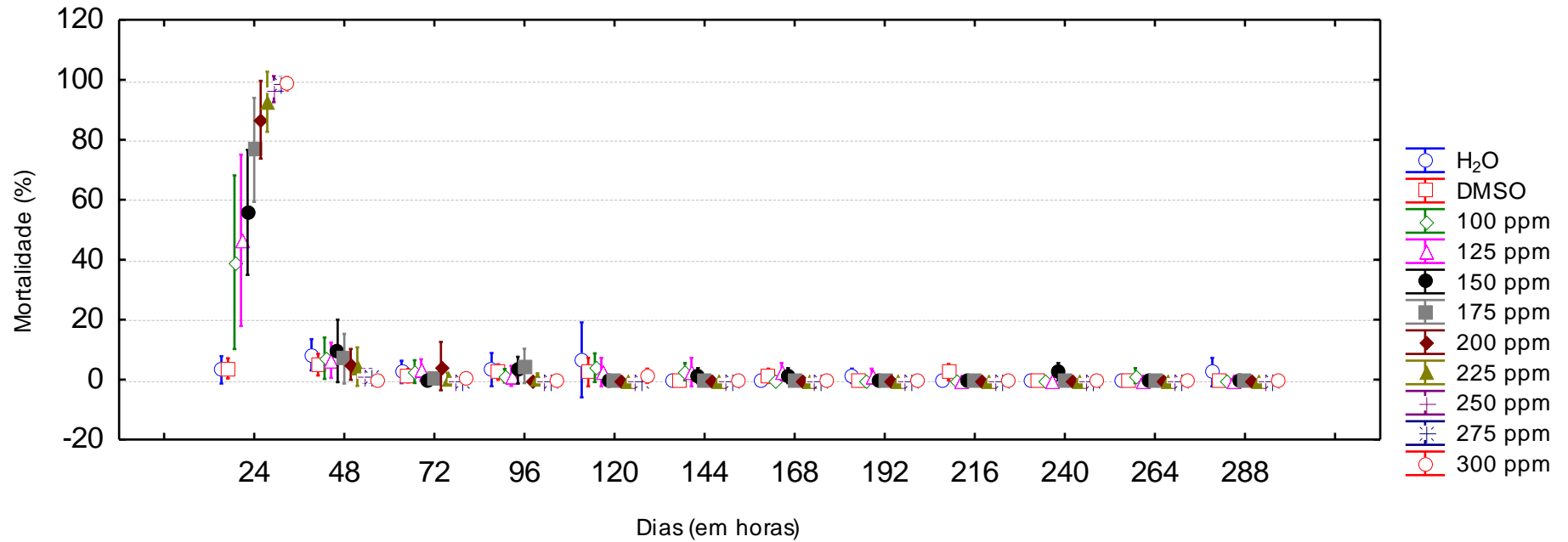
COMPOSTO	Término de bioensaio (288 horas)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 156)	73,1	4,5	0,0
DMSO (n= 160)	75,0	7,5	1,9
100ppm (n= 153)	40,5	3,9	0,7
125ppm (n= 158)	32,3	5,1	0,6
150ppm (n= 159)	26,4	1,9	0,6
175ppm (n= 157)	10,8	0,6	0,0
200ppm (n= 159)	3,8	0,0	0,0
225ppm (n= 162)	1,9	0,0	0,0
250ppm (n= 159)	1,9	0,0	0,0
275ppm (n= 157)	0,0	0,0	0,0
300ppm (n= 162)	0,0	0,0	0,0



**Figura 31.** Porcentagem de mortalidade larval por concentração, por réplica e por bioensaio, em 24 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente ao bioensaio de efetividade realizado com o óleo essencial de *A. vepretorum* (OEA). (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 40.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio de efetividade com o óleo essencial de *A. vepretorum* (OEA). Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	576,351	0,00*
	Concentração	20,845	0,00*
	Tempo X Concentração	18,933	0,00*



**Figura 32.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio de efetividade realizado com o óleo essencial de *A. vepretorum* (OEAV).

Os extratos metanólico, hexânico e óleos essenciais da casca e folhas de *X. laevigata* analisados mostraram atividade larvicida abaixo de 80% sob condições controladas ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ , umidade  $70\% \pm 10$  e fotoperíodo 12:12) sobre populações de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller a partir de bioensaios preliminares com duração de 216 horas para XLFEH, XLFEM e XLCEM, e 288 horas para XLCEH, com exceção de XLCEH na concentrações de 500 ppm, onde a mortalidade larval foi de 84% e XLFEH, onde a mortalidade larval foi de 95% para concentração de 250 ppm e 100% para concentração de 500 ppm. (Tabelas 41, 42, 44, 45, 47, 48, 50 e 51 e Figuras 33a, 33b, 35, 37 e 39)

A análise estatística para os compostos XLCEH e XLFEH mostrou que as variáveis tempo e concentração, assim como a interação entre elas, são estatisticamente significativas em relação a variável porcentagem de mortalidade larval ( $p < 0,05$ ). A média do percentual de mortalidade observada no grupo referente à XLCEH na concentração de 500 ppm em 24 horas e XLFEH na concentração de 500 ppm em 24 horas mostrou-se maior e diferente das médias dos demais grupos analisado, ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. Pelo teste de Dunnet, os grupos referentes à XLCEH nas concentrações de 500 ppm em 24 e 48 horas e 250 ppm em 48 e 120 horas e XLFEH nas concentrações de 500 ppm em 24 e 48 horas, 250 ppm em 24 e 48 horas e 100 ppm em 144 horas diferiram-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle água. Não existiram diferenças para os demais grupos analisados (Tabelas 43 e 49 e Figuras 34 e 38).

A análise estatística para o composto XLCEM e XLFEM mostrou que a interação entre as variáveis tempo e concentração não é estatisticamente significativa em relação à variável porcentagem de mortalidade larval, ao nível de significância de 5% (Tabelas 46 e 52 e Figuras 36 e 40).



**Tabela 41.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato XLCEH sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

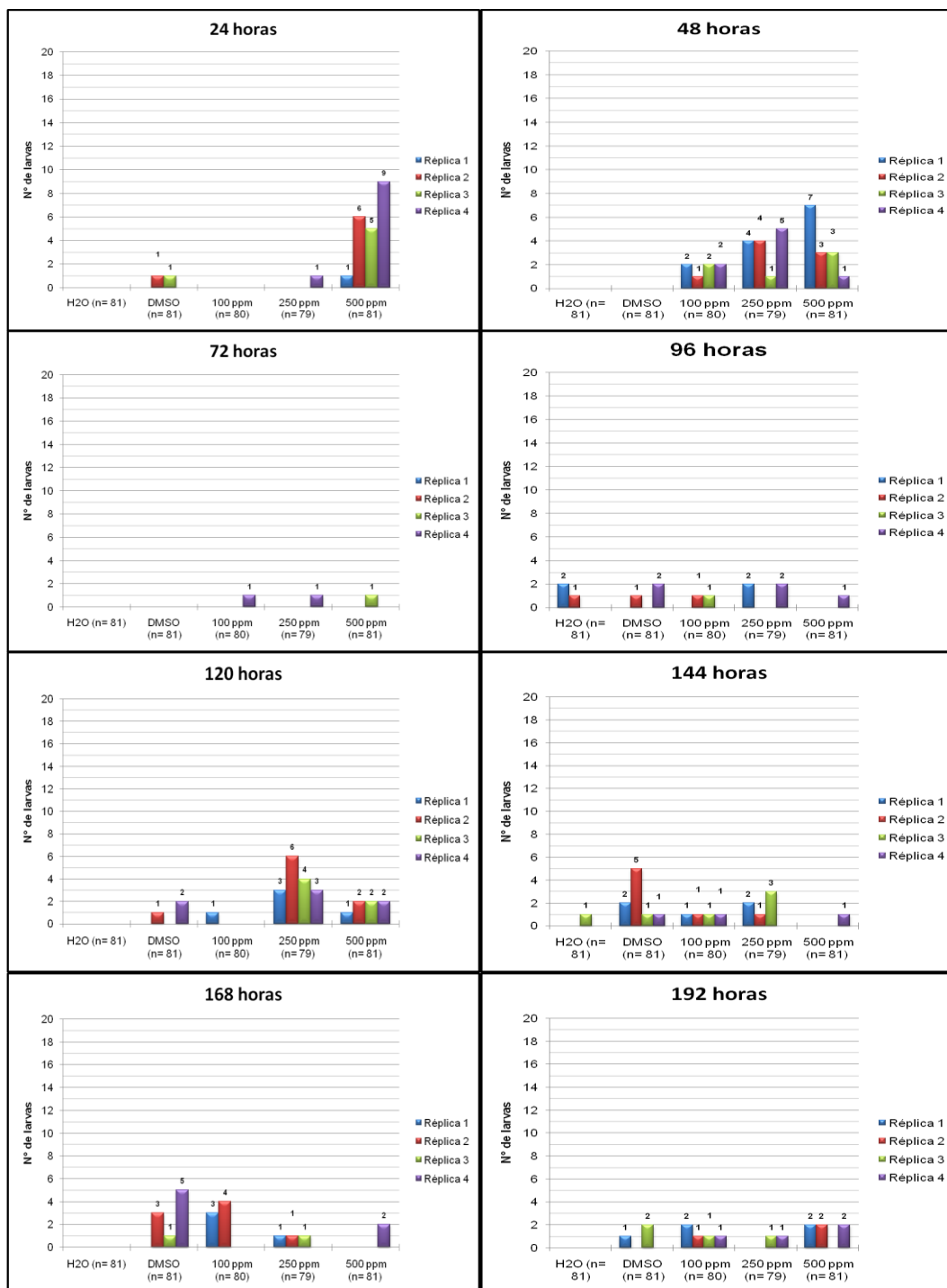
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 81)		CONTROLE DMSO (n= 81)		XLCEH 100 ppm (n= 80)		XLCEH 250 ppm (n= 79)		XLCEH 500 ppm (n=81)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0	2,5	0	0,0	0,0	1,3	0,0	25,9	0,0
42 h	0,0	0,0	2,5	0,0	8,8	0,0	19,0	0,0	43,2	0,0
72 h	0,0	0,0	2,5	0,0	10,0	0,0	20,3	0,0	44,4	0,0
96 h	3,7	0,0	6,2	0,0	12,5	0,0	25,3	0,0	45,7	0,0
120 h	3,7	6,2	9,9	9,9	13,8	10,0	45,6	2,5	54,3	0,0
144 h	4,9	19,8	21,0	19,8	18,8	20,0	53,2	7,6	55,6	0,0
168 h	4,9	33,3	32,1	23,5	27,5	33,8	58,2	12,7	58,0	0,0
192 h	4,9	53,1	35,8	25,9	33,8	37,5	60,8	21,5	65,4	0,0
216 h	8,6	61,7	44,4	27,2	38,8	45,0	65,8	24,1	69,1	0,0
240 h	11,1	70,4	49,4	32,1	41,3	50,0	68,4	24,1	71,6	0,0
264 h	13,6	76,5	53,1	33,3	42,5	51,3	73,4	24,1	74,1	0,0
288 h	16,0	84,0	56,8	33,3	43,8	52,5	75,9	24,1	84,0	0,0
<b>TOTAL</b>	<b>16,0</b>	<b>84</b>	<b>56,8</b>	<b>33,3</b>	<b>43,8</b>	<b>52,5</b>	<b>75,9</b>	<b>24,1</b>	<b>84,0</b>	<b>0,0</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 42.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato XLCEH sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (288 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 81)	77,8	6,2	0,0
DMSO (n= 81)	21,0	12,3	9,9
100 ppm (n= 80)	48,8	3,8	3,8
250 ppm (n= 79)	19,0	5,1	0,0
500 ppm (n= 81)	0,0	0,0	16,0

n = número total de larvas expostas.



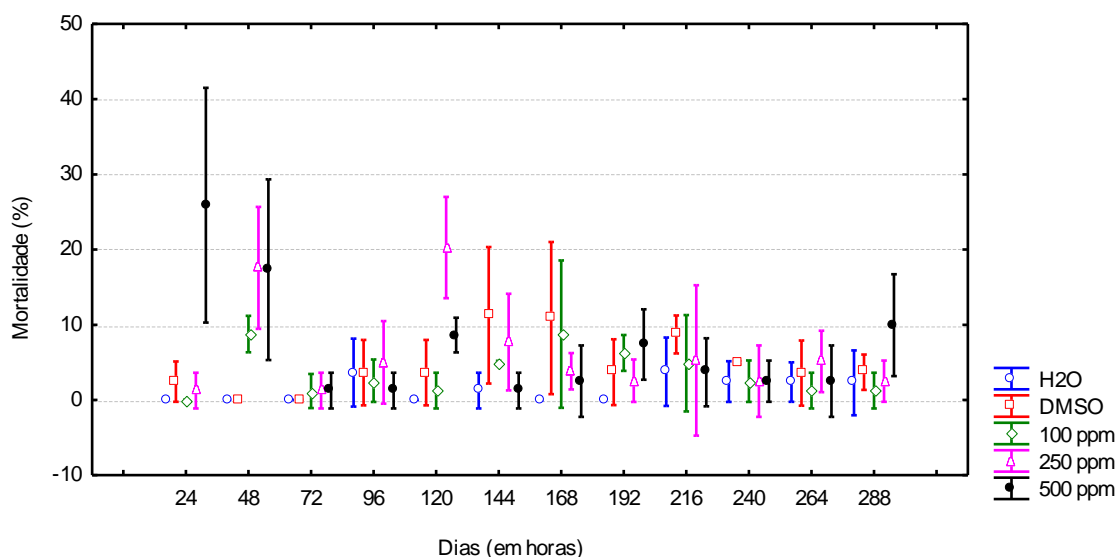
**Figura 33a.** Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato XLCEH. (n) = número total de larvas expostas por produto.



**Figura 33b.** Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato XLCEH. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 43.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato XLCEH. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	3,2340	0,000478*
	Concentração	9,0563	0,000001*
	Tempo X Concentração	3,7828	0,000000*



**Figura 34.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato XLCEH.

**Tabela 44.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato XLCEM sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

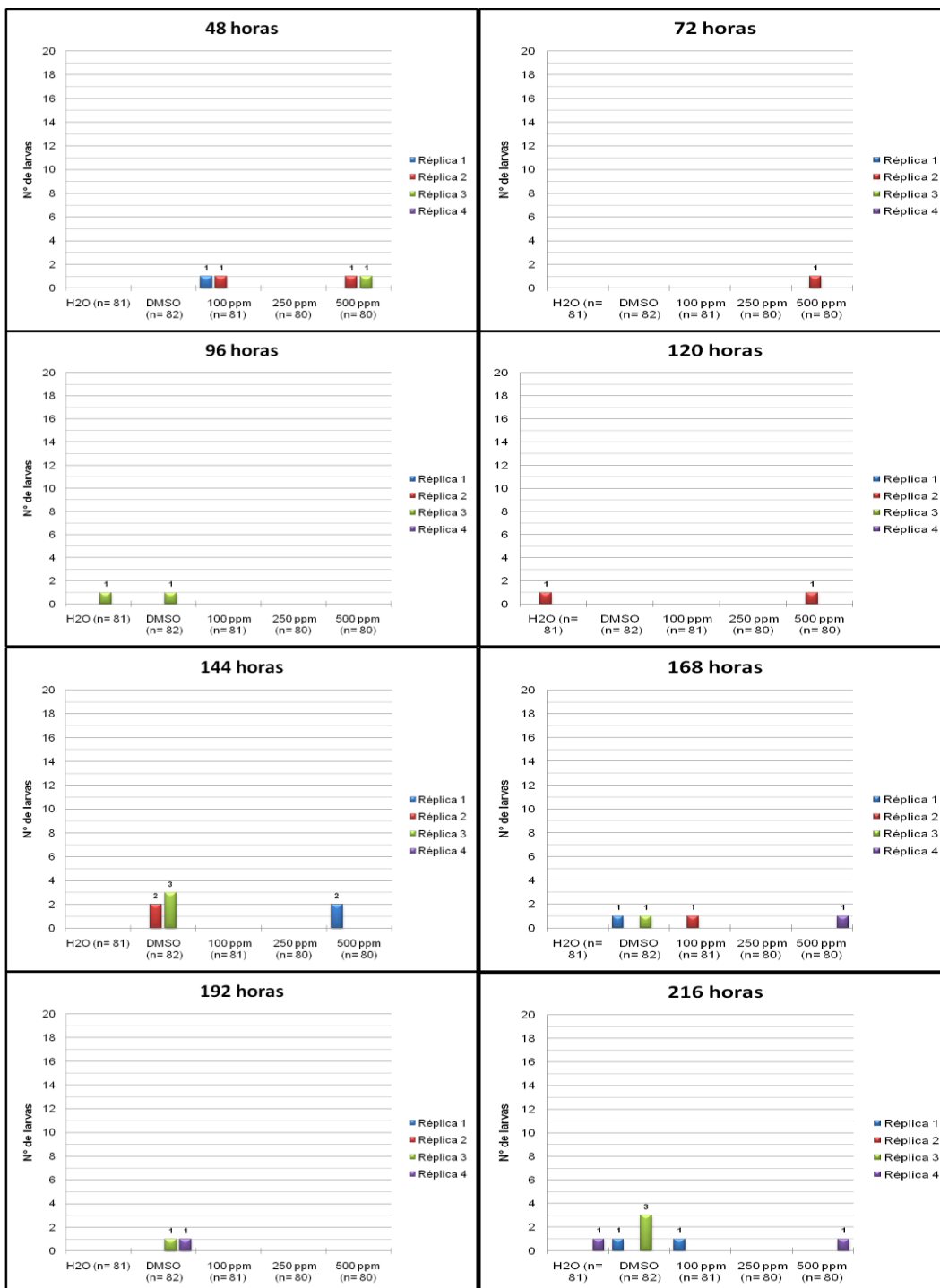
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 81)		CONTROLE DMSO (n= 82)		XLCEM 100 ppm (n= 81)		XLCEM 250 ppm (n= 80)		XLCEM 500 ppm (n= 80)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
42 h	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0
72 h	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	3,8	0,0
96 h	1,2	11,1	1,2	8,5	2,5	27,2	0,0	28,8	3,8	0,0
120 h	2,5	42,0	1,2	26,8	2,5	69,1	0,0	77,5	5,0	5,0
144 h	2,5	64,2	7,3	54,9	2,5	80,2	0,0	91,3	7,5	22,5
168 h	2,5	66,7	9,8	67,1	3,7	85,2	0,0	97,5	8,8	61,3
192 h	2,5	75,3	12,2	72,0	3,7	87,7	0,0	98,8	8,8	77,5
216 h	3,7	96,3	17,1	73,2	4,9	93,8	0,0	100,0	10,0	82,5
<b>TOTAL</b>	<b>3,7</b>	<b>96,3</b>	<b>17,1</b>	<b>73,2</b>	<b>4,9</b>	<b>93,8</b>	<b>0,0</b>	<b>100,0</b>	<b>10,0</b>	<b>82,5</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 45.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato XLCEM sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (216 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 81)	82,7	13,6	0,0
DMSO (n= 82)	68,3	4,9	9,8
100 ppm (n= 81)	88,9	4,9	1,2
250 ppm (n= 80)	97,5	2,5	0,0
500 ppm (n= 80)	80,0	2,5	7,5

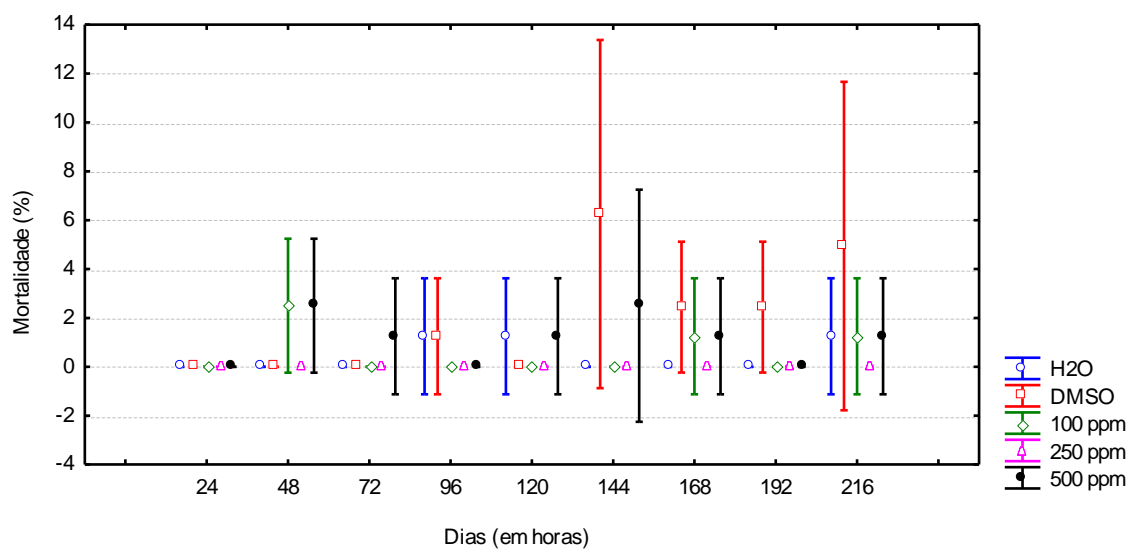
n = número total de larvas expostas.



**Figura 35.** Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato XLCEM a partir de 48 horas, quando ocorreu o primeiro registro de mortalidade do composto em questão. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 46.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato XLCEM. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	1,52977	0,152469
	Concentração	3,95138	0,004587*
	Tempo X Concentração	1,13282	0,305093



**Figura 36.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato XLCEM.

**Tabela 47.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato XLFEH sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 82)		CONTROLE DMSO (n=81)		XLFEH 100 ppm (n= 81)		XLFEH 250 ppm (n= 80)		XLFEH 500 ppm (n= 79)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	1,2	0,0	0,0	0,0	3,7	0,0	50,0	0,0	70,9	0,0
42 h	1,2	0,0	0,0	0,0	42,0	0,0	73,8	0,0	94,9	0,0
72 h	3,7	0,0	2,5	0,0	44,4	0,0	81,3	0,0	100,0	0,0
96 h	6,1	24,4	8,6	24,7	45,7	0,0	88,8	0,0	100,0	0,0
120 h	6,1	54,9	12,3	53,1	49,4	0,0	90,0	0,0	100,0	0,0
144 h	7,3	65,9	17,3	60,5	63,0	11,1	92,5	0,0	100,0	0,0
168 h	8,5	72,0	24,7	61,7	64,2	14,8	95,0	0,0	100,0	0,0
192 h	11,0	74,4	32,1	61,7	69,1	16,0	95,0	0,0	100,0	0,0
216 h	11,0	89,0	34,6	65,4	74,1	19,8	95,0	0,0	100,0	0,0
<b>TOTAL</b>	<b>11,0</b>	<b>89,0</b>	<b>34,6</b>	<b>65,4</b>	<b>74,1</b>	<b>19,8</b>	<b>95,0</b>	<b>0,0</b>	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>

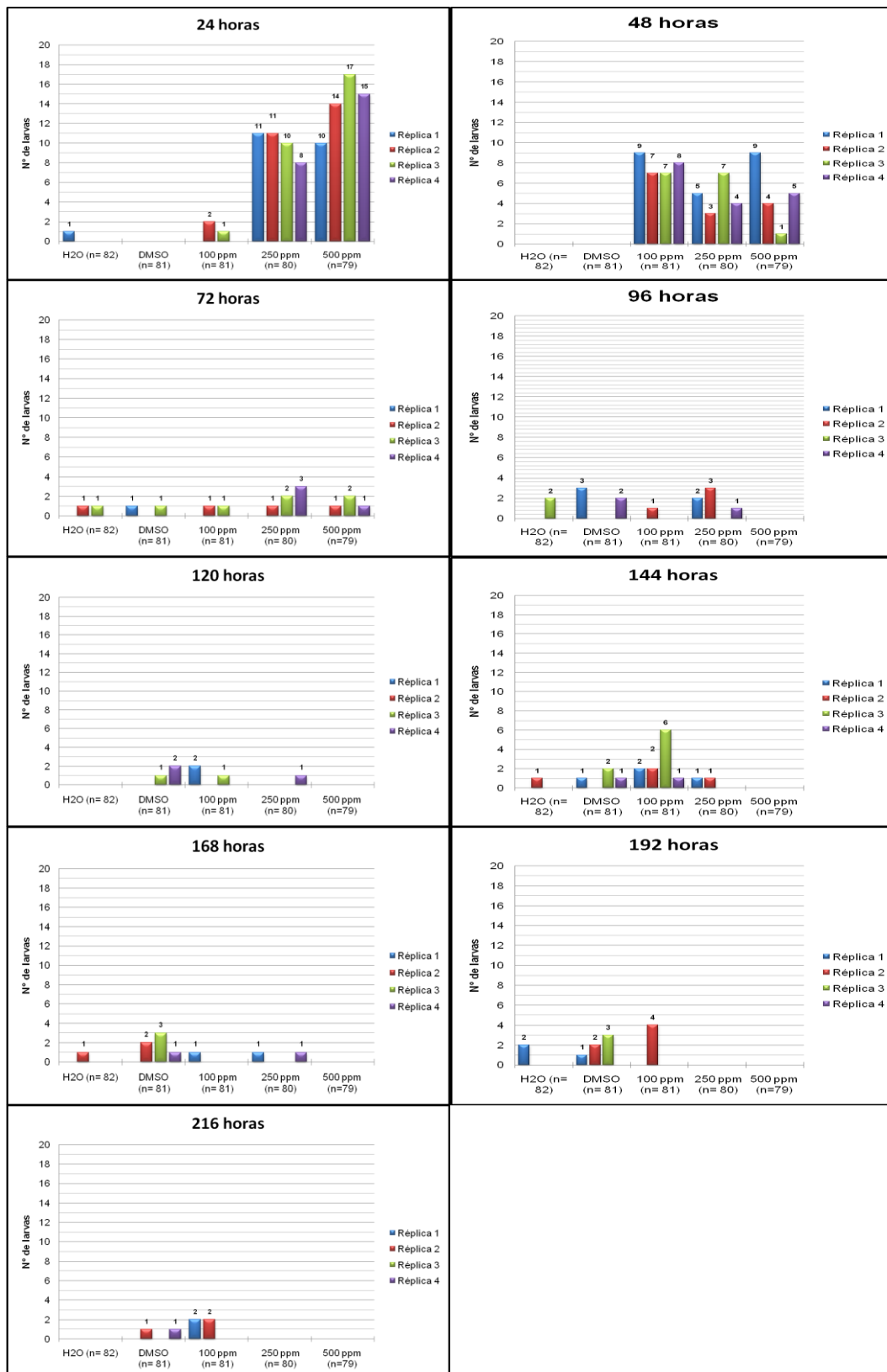
M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 48.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato XLFEH sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (216 h)		
	Adultos emergidos(%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n=82)	82,9	6,1	0,0
DMSO (n= 81)	61,7	3,7	0,0
100 ppm (n= 81)	19,8	0,0	6,2
250 ppm (n= 80)	0,0	0,0	5,0
500 ppm (n= 79)	0,0	0,0	0,0

n = número total de larvas expostas.

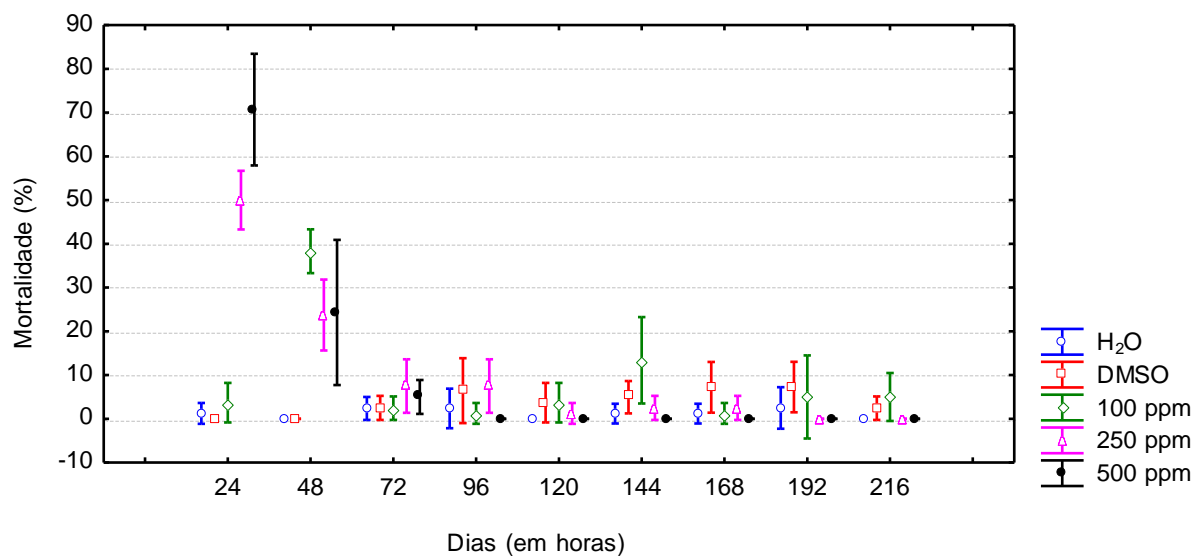




**Figura 37.** Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato XLFEH. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 49.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato XLFEH. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	47,2194	0,000000*
	Concentração	22,7372	0,000000*
	Tempo X Concentração	21,5891	0,000000*



**Figura 38.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato XLFEH.

**Tabela 50.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato XLFEM sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

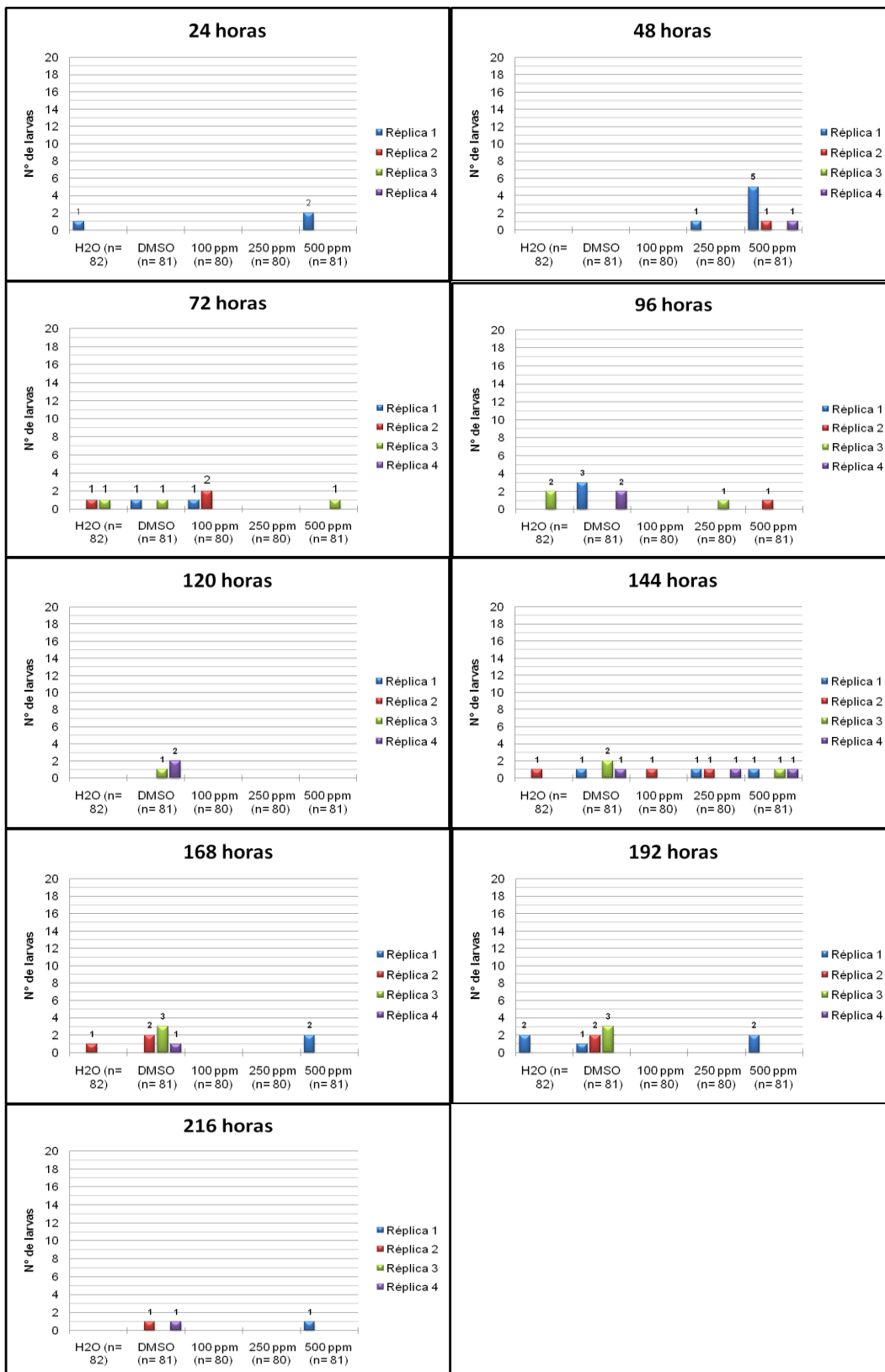
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 82)		CONTROLE DMSO (n= 81)		XLFEM 100 ppm (n= 80)		XLFEM 250 ppm (n= 80)		XLFEM 500 ppm (n= 81)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0
42 h	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	11,1	0,0
72 h	3,7	0,0	2,5	0,0	3,8	0,0	1,3	0,0	12,3	0,0
96 h	6,1	24,4	8,6	24,7	3,8	1,3	2,5	0,0	13,6	0,0
120 h	6,1	54,9	12,3	53,1	3,8	28,8	2,5	15,0	13,6	7,4
144 h	7,3	65,9	17,3	60,5	5,0	61,3	6,3	42,5	17,3	35,8
168 h	8,5	72,0	24,7	61,7	5,0	78,8	6,3	73,8	19,8	48,1
192 h	11,0	74,4	32,1	61,7	5,0	82,5	6,3	90,0	22,2	64,2
216 h	11,0	89,0	34,6	65,4	5,0	85,0	6,3	92,5	23,5	66,7
<b>TOTAL</b>	<b>11,0</b>	<b>89,0</b>	<b>34,6</b>	<b>65,4</b>	<b>5,0</b>	<b>85,0</b>	<b>6,3</b>	<b>92,5</b>	<b>23,5</b>	<b>66,7</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 51.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do extrato XLFEM sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (216 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 82)	82,9	6,1	0,0
DMSO (n= 81)	61,7	3,7	0,0
100 ppm (n= 80)	83,8	1,3	10,0
250 ppm (n= 80)	87,5	5,0	1,3
500 ppm (n= 81)	65,4	1,2	9,9

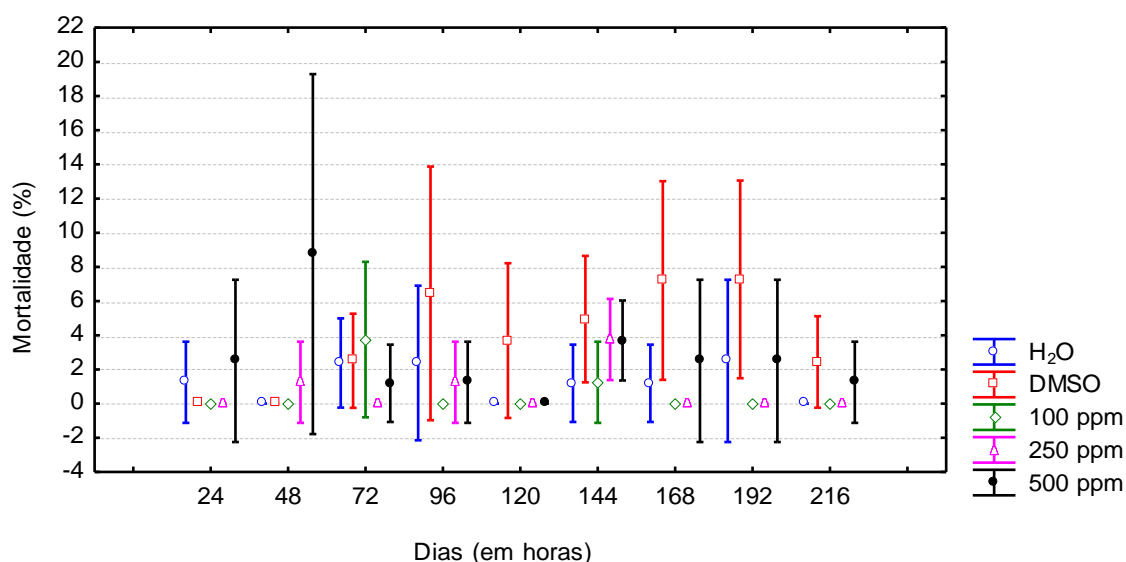
n = número total de larvas expostas.



**Figura 39.** Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato XLFEM. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 52.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o extrato XLFEM. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	1,17613	0,317993
	Concentração	6,03270	0,000170*
	Tempo X Concentração	1,29268	0,158394



**Figura 40.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o extrato XLFEM.

Já o bioensaio preliminar realizado com o óleo essencial de *X. laevigata* durou 168 horas e mostrou atividade larvicida acima de 80% para as concentrações de 250 e 500 ppm sob condições controladas ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ , umidade  $70\% \pm 10$  e fotoperíodo 12:12) sobre populações de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, atingindo, assim, o critério estabelecido para a realização do bioensaio de efetividade. Apesar do resultado, observou-se a emergência de 1,3% de adultos para a concentração de 250 ppm do produto em questão (Tabelas 53 e 54 e Figura 41).

A análise estatística para o OEXL mostrou que as variáveis tempo e concentração, assim como a interação entre elas, são estatisticamente significativas em relação à variável porcentagem de mortalidade larval ( $p < 0,05$ ). A média do percentual de mortalidade observada no grupo referente à concentração de 500 ppm em 24 horas mostrou-se maior e diferente das médias dos demais grupos analisado, ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. Pelo teste de Dunnett, os grupos referentes às concentrações de 250 e

500 ppm em 24 horas e 100 ppm em 72 horas diferiram-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle água. Não existiram diferenças para os demais grupos analisados (Tabela 55 e Figura 42).

**Tabela 53.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *X. laevigata* (OEXL) sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

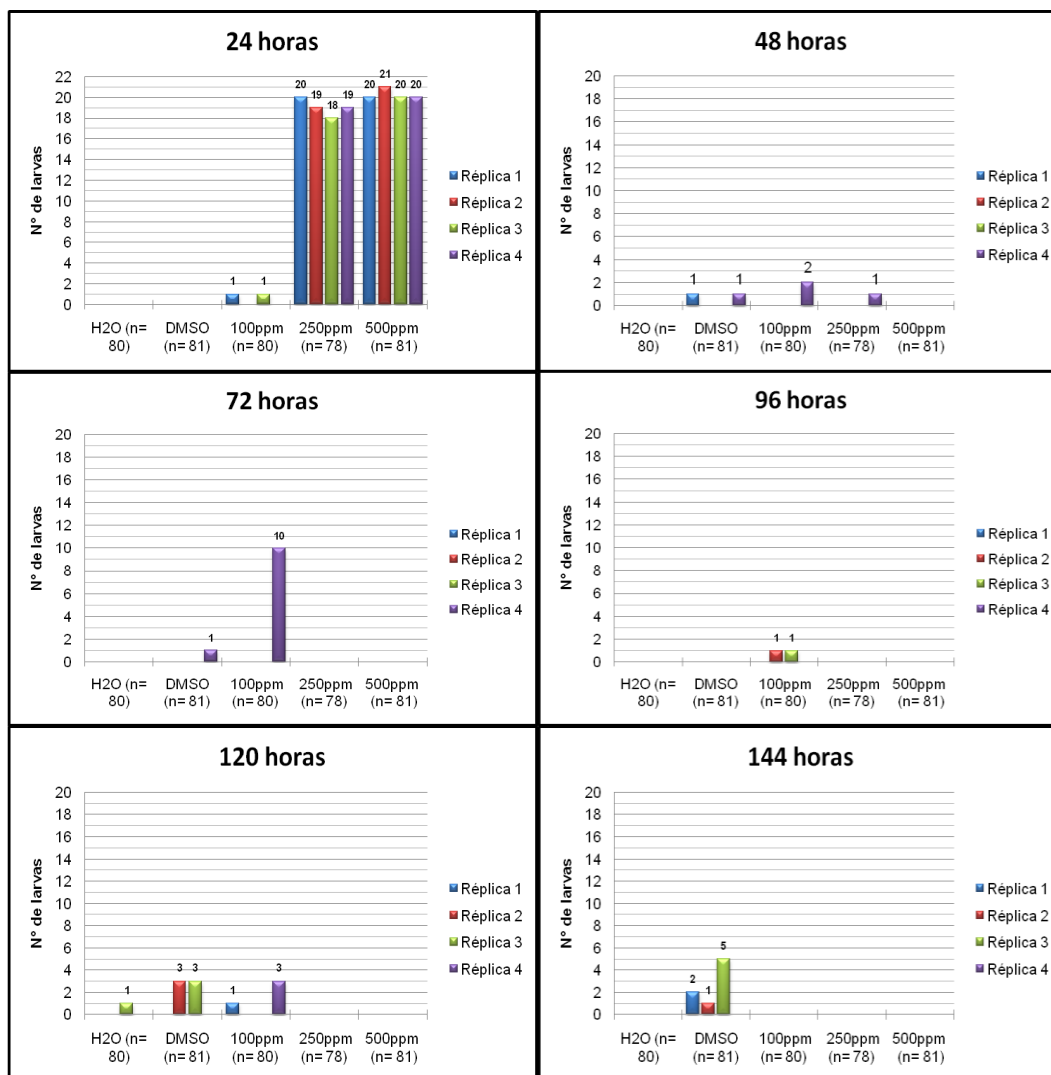
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 80)		CONTROLE DMSO (n=81)		OEXL 100 ppm (n= 80)		OEXL 250 ppm(n= 78)		OEXL 500 ppm (n= 81)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	97,4	0,0	100,0	0,0
42 h	0,0	0,0	2,5	0,0	5,0	0,0	98,7	0,0	100,0	0,0
72 h	0,0	0,0	3,7	0,0	17,5	1,3	98,7	0,0	100,0	0,0
96 h	0,0	42,5	3,7	18,5	20,0	8,8	98,7	0,0	100,0	0,0
120 h	1,3	86,3	11,1	65,4	25,0	53,8	98,7	0,0	100,0	0,0
144 h	1,3	95,0	21,0	71,6	25,0	70,0	98,7	1,3	100,0	0,0
168 h	1,3	98,8	21,0	74,1	25,0	73,8	98,7	1,3	100,0	0,0
<b>TOTAL</b>	<b>1,3</b>	<b>98,8</b>	<b>21,0</b>	<b>74,1</b>	<b>25,0</b>	<b>73,8</b>	<b>98,7</b>	<b>1,3</b>	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 54.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *X. laevigata* (OEXL) sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, nas concentrações de 100 ppm, 250 ppm e 500 ppm, com duração de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (168 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 80)	83,8	15,0	0,0
DMSO (n= 81)	70,4	3,7	4,9
100 ppm (n= 80)	68,8	5,0	1,3
250 ppm (n=78)	1,3	0,0	0,0
500 ppm (n= 81)	0,0	0,0	0,0

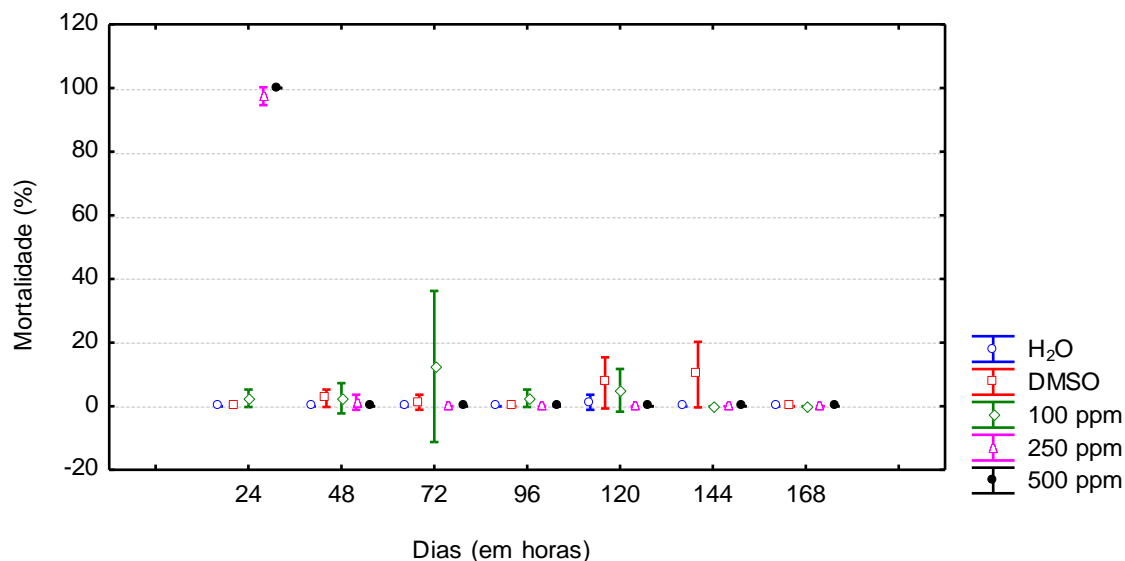
n = número total de larvas expostas.



**Figura 41.** Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) até 144 horas, quando ocorreu o último registro de mortalidade do composto em questão, referente ao bioensaio preliminar realizado com o óleo essencial de *X. laevigata* (OEXL). (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 55.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com o óleo essencial de *X. laevigata* (OEXL). Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	157,8555	0,00*
	Concentração	46,2458	0,00*
	Tempo X Concentração	65,1405	0,00*



**Figura 42.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com o óleo essencial de *X. laevigata* (OEXL).

Por fim, o bioensaio de efetividade durou 240 horas e apresentou mortalidade acima de 80% nas concentrações de 200, 225 e 250 ppm sob condições controladas ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ , umidade  $70\% \pm 10$  e fotoperíodo 12:12) sobre populações de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller. Ainda sim, na concentração de 250 ppm observou-se a emergência de 8,3% de adultos (Tabelas 56 e 57 e Figura 43).

A análise estatística para o OEXL mostrou que as variáveis tempo e concentração, assim como a interação entre elas, são estatisticamente significativas em relação à variável porcentagem de mortalidade larval ( $p < 0,05$ ). A média do percentual de mortalidade observada no grupo referente à concentração de 275 ppm em 24 horas mostrou-se maior e diferente das médias dos demais grupos analisado, ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. Pelo teste de Dunnett, os grupos referentes às concentrações de 150, 175, 200, 225, 275, 350, 400, 450 e 500 em 24 horas e 250 ppm em 72 horas diferiram-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle água. Não existiram diferenças para os demais grupos analisados (Tabela 58 e Figura 44).



**Tabela 56.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *X. laevigata* (OEXL) sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 125 ppm, 150 ppm, 175 ppm, 200 ppm, 225 ppm, 250 ppm, 275 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm e 500 ppm, com duração total de 120 horas (cinco dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 79)		CONTROLE DMSO (n= 79)		OEXL 100 ppm (n= 80)		OEXL 125 ppm (n= 77)		OEXL 150 ppm (n= 80)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	14,3	0,0	40,0	0,0
42 h	1,3	20,3	0,0	26,6	2,5	13,8	15,6	9,1	41,3	3,8
72 h	1,3	57,0	6,3	58,2	2,5	42,5	24,7	26,0	65,0	18,8
96 h	3,8	93,7	7,6	91,1	8,8	85,0	27,3	64,9	66,3	32,5
120 h	5,1	94,9	7,6	92,4	8,8	87,5	27,3	70,1	66,3	33,8
<b>TOTAL</b>	<b>5,1</b>	<b>94,9</b>	<b>7,6</b>	<b>92,4</b>	<b>8,8</b>	<b>87,5</b>	<b>27,3</b>	<b>70,1</b>	<b>66,3</b>	<b>33,8</b>

HORAS	OEXL 175 ppm (n= 81)		OEXL 200 ppm (n= 80)		OEXL 225 ppm (n= 79)		OEXL 250 ppm (n= 80)		OEXL 275 ppm (n= 80)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	48,1	0,0	11,3	0,0	45,6	0,0	20,0	0,0	92,5	0,0
42 h	49,4	4,9	16,3	2,5	48,1	11,4	22,5	2,5	93,8	3,8
72 h	56,8	16,0	35,0	13,8	50,6	29,1	55,0	8,8	93,8	3,8
96 h	63,0	35,8	42,5	46,3	55,7	41,8	55,0	28,8	95,0	3,8
120 h	63,0	37,0	45,0	52,5	55,7	43,0	56,3	35,0	95,0	5,0
<b>TOTAL</b>	<b>63,0</b>	<b>37,0</b>	<b>45,0</b>	<b>52,5</b>	<b>55,7</b>	<b>43,0</b>	<b>56,3</b>	<b>35,0</b>	<b>95,0</b>	<b>5,0</b>

HORAS	OEXL 300 ppm (n= 80)		OEXL 350 ppm (n= 80)		OEXL 400 ppm (n= 79)		OEXL 450 ppm (n= 81)		OEXL 500 ppm (n= 80)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	12,5	0,0	30,0	0,0	34,2	0,0	34,6	0,0	70,0	0,0
42 h	13,8	3,8	31,3	0,0	40,5	2,5	39,5	1,2	75,0	2,5
72 h	27,5	20,0	35,0	8,8	51,9	16,5	45,7	9,9	90,0	3,8
96 h	43,8	42,5	35,0	45,0	54,4	38,0	48,1	29,6	95,0	5,0
120 h	50,0	47,5	41,3	55,0	57,0	40,5	49,4	44,4	95,0	5,0
<b>TOTAL</b>	<b>50,0</b>	<b>47,5</b>	<b>41,3</b>	<b>55,0</b>	<b>57,0</b>	<b>40,5</b>	<b>49,4</b>	<b>44,4</b>	<b>95,0</b>	<b>5,0</b>

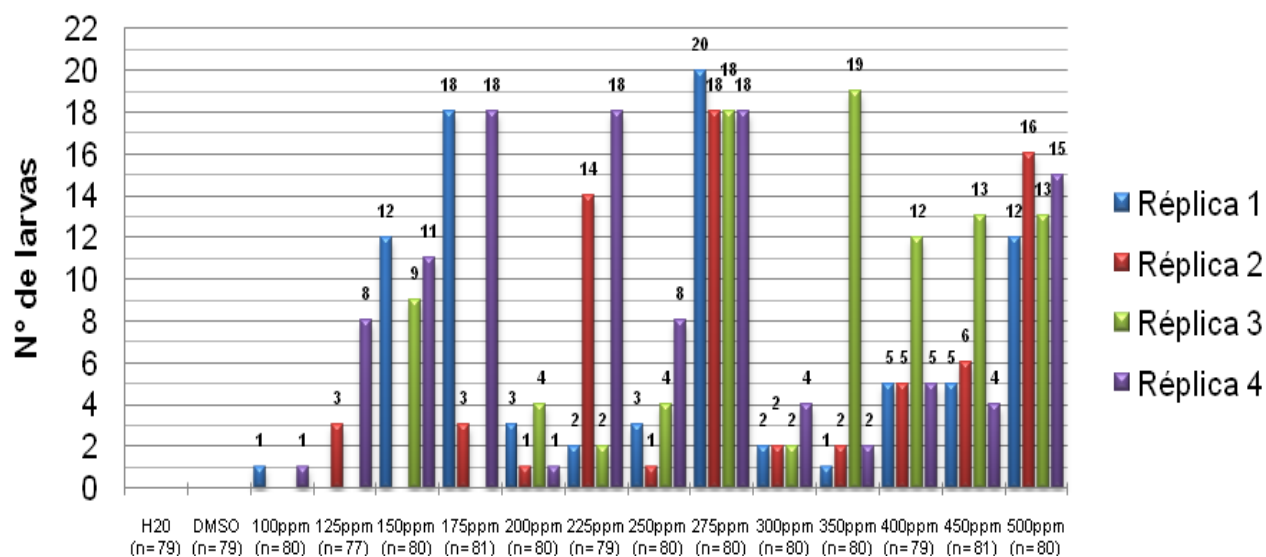
M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 57.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *X. laevigata* (OEXL) sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm, 125 ppm, 150 ppm, 175 ppm, 200 ppm, 225 ppm, 250 ppm, 275 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm e 500 ppm, com duração total de 120 horas (cinco dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (120 horas)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 79)	89,9	5,1	0,0
DMSO (n= 79)	88,6	3,8	0,0
100ppm (n= 80)	85,0	2,5	3,8
125ppm (n= 77)	67,5	2,6	2,6
150ppm (n= 80)	31,3	2,5	0,0
175ppm (n= 81)	37,0	0,0	0,0
200ppm (n= 80)	52,5	0,0	2,5
225ppm (n= 79)	41,8	1,3	1,3
250ppm (n= 80)	33,8	1,3	8,8
275ppm (n= 80)	5,0	0,0	0,0
300ppm (n= 80)	43,8	3,8	2,5
350ppm (n= 80)	50,0	5,0	3,8
400ppm (n= 79)	38,0	2,5	2,5
450ppm (n= 81)	40,7	3,7	6,2
500ppm (n= 80)	3,8	1,3	0,0

n = número total de larvas expostas.

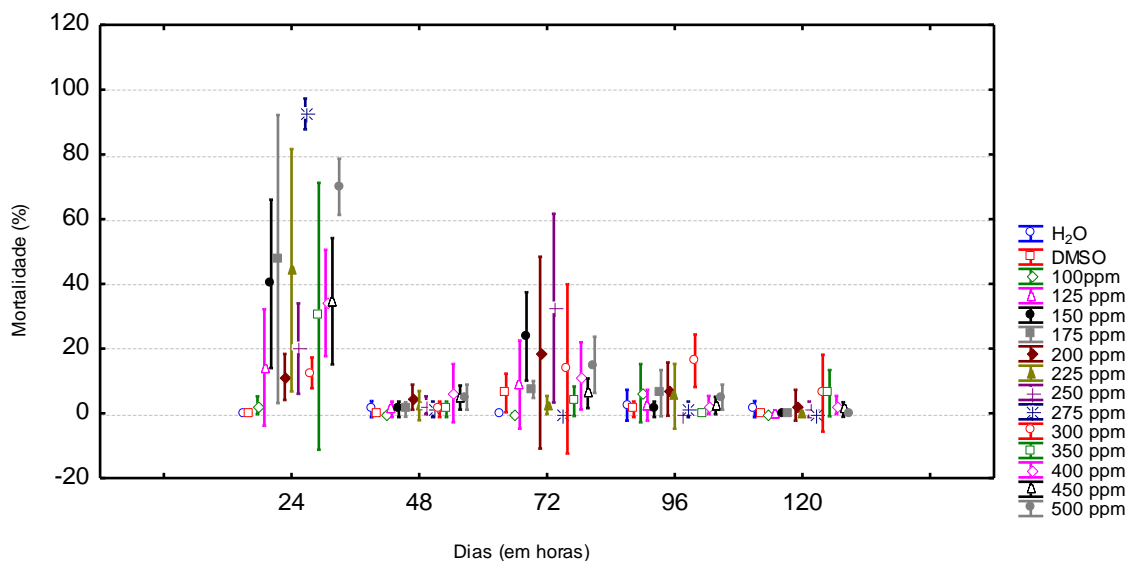
## 24 horas



**Figura 43.** Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica, em 24 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente ao bioensaio de efetividade realizado com o óleo essencial de *X. laevigata* (OEXL). (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 58.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio de efetividade com o óleo essencial de *X. laevigata* (OEXL). Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	53,0212	0,000000*
	Concentração	3,7367	0,000012*
	Tempo X Concentração	4,0214	0,000000*



**Figura 44.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio de efetividade realizado com o óleo essencial de *X. laevigata* (OEXL).

As substâncias puras (*E*)-cariofileno,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno mostraram atividade larvicida abaixo de 80% para todas as concentrações avaliadas sob condições controladas ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ , umidade  $70\% \pm 10$  e fotoperíodo 12:12) sobre populações de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, a partir de bioensaios de efetividade. Todas as concentrações testadas permitiram a emergência de adultos (Tabelas 59, 60, 62, 63, 65 e 66 e Figuras 45, 47 e 49).

De maneira diferente, mas sob as mesmas condições, a substância pura óxido de cariofileno apresentou mortalidade 82,3% para concentração de 100 ppm, 95% para concentração de 250 ppm e 49,4% para concentração de 300 ppm sobre populações de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, a partir de bioensaios preliminares (Tabelas 68 e 69 e Figuras 51, 52a e 52b).

As análises estatísticas para (*E*)-cariofileno,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno e óxido de cariofileno mostraram que as variáveis tempo e concentração, assim como a interação entre elas, são estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação à variável porcentagem de mortalidade larval. As médias do percentual de mortalidade observadas nos grupos referentes ao óxido de cariofileno na concentração de 250 ppm em 24 horas do primeiro bioensaio preliminar, óxido de cariofileno na concentração de 300 ppm em 48 horas do segundo bioensaio preliminar, (*E*)-cariofileno,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno na concentração de 350 ppm em

24 horas mostraram-se maiores e diferentes das médias dos demais grupos analisado nos bioensaios de efetividade realizados com diferentes concentrações dos mesmos produtos, respectivamente, ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. Pelo teste de Dunnett, apenas os grupos referentes ao óxido de cariofileno nas concentrações de 100 e 250 ppm em 24 e 48 horas e 300 ppm em 48 horas diferiram-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle água. Não existiram diferenças estatísticas para os demais grupos analisados (Tabelas 61, 64, 67, 70 e 71 e Figuras 46, 48, 50, 53 e 54).

**Tabela 59.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante o primeiro bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida da substância pura (E)- cariofileno, sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm e 500 ppm com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

HORAS	continua									
	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 239)		CONTROLE DMSO (n= 241)		(E)- Cariof. 150 ppm (n= 237)		(E)- Cariof. 200 ppm (n= 238)		(E)- Cariof. 250 ppm (n= 234)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,4	0,0	0,8	0,0	24,1	0,0	29,4	0,0	38,5	0,0
42 h	0,8	6,7	1,7	9,1	27,4	1,7	33,6	2,5	39,3	3,0
72 h	1,7	20,1	1,7	25,3	28,7	7,2	34,5	9,7	40,2	9,8
96 h	3,8	49,0	2,5	58,1	31,6	45,1	36,1	41,6	42,3	41,0
120 h	4,6	61,1	2,9	72,6	32,1	59,9	37,0	52,9	43,2	50,9
144 h	5,0	64,9	2,9	75,9	32,5	61,6	37,4	53,8	43,2	53,0
168 h	5,4	66,1	2,9	80,1	34,6	61,6	38,2	55,9	43,2	53,8
192 h	6,3	74,9	2,9	85,1	35,4	61,6	38,2	59,2	43,2	54,7
216 h	8,8	78,7	2,9	86,7	35,4	62,0	38,2	59,7	43,2	55,6
240 h	10,5	86,6	9,5	87,6	35,4	63,7	38,2	60,9	43,2	56,8
264 h	11,3	88,3	9,5	88,0	35,4	63,7	38,2	60,9	43,2	56,8
288 h	11,3	88,7	9,5	88,0	35,4	63,7	38,2	61,3	43,2	56,8
<b>TOTAL</b>	<b>11,3</b>	<b>88,7</b>	<b>9,5</b>	<b>88,0</b>	<b>35,4</b>	<b>63,7</b>	<b>38,2</b>	<b>61,3</b>	<b>43,2</b>	<b>56,8</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 59.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante o primeiro bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida da substância pura (*E*)- cariofileno, sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm e 500 ppm com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

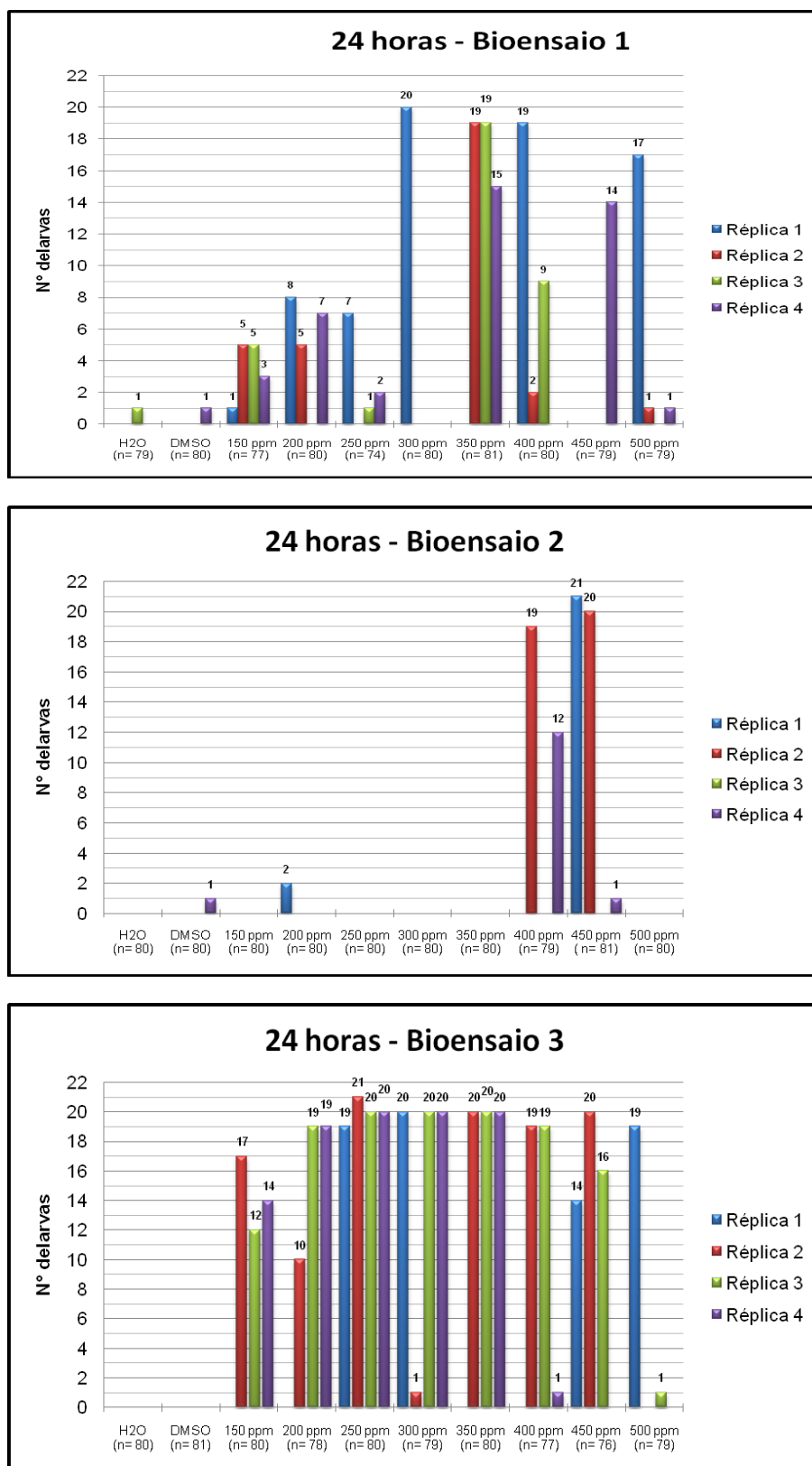
HORAS	conclusão									
	(E)- Cariof. 300 ppm (n= 239)		(E)- Cariof. 350 ppm (n= 241)		(E)- Cariof. 400 ppm (n= 236)		(E)- Cariof. 450 ppm (n= 236)		(E)- Cariof. 500 ppm (n= 238)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	33,9	0,0	46,9	0,0	42,4	0,0	44,9	0,0	16,4	0,0
42 h	34,7	2,1	47,7	4,1	43,6	1,3	48,3	2,5	17,6	3,8
72 h	35,1	10,9	49,0	7,9	44,5	8,1	48,7	8,1	19,7	11,8
96 h	36,8	44,8	49,0	30,7	48,3	24,6	50,8	22,0	21,4	31,5
120 h	37,2	55,2	49,4	42,7	48,7	40,3	53,0	33,5	22,7	48,7
144 h	37,2	56,1	49,4	44,0	50,0	41,1	53,8	35,2	23,9	53,4
168 h	37,7	56,9	49,8	44,0	52,1	41,1	53,8	36,4	24,4	53,8
192 h	38,5	59,4	49,8	47,7	52,1	42,8	54,2	39,0	25,6	59,2
216 h	40,2	59,4	50,2	48,5	52,5	44,5	55,1	41,1	28,2	63,4
240 h	40,2	59,4	50,2	49,8	52,5	46,2	55,1	43,6	28,2	67,2
264 h	40,6	59,4	50,2	49,8	52,5	46,2	55,1	43,6	28,2	67,2
288 h	40,6	59,4	50,2	49,8	53,0	46,2	55,1	43,6	28,2	67,2
<b>TOTAL</b>	<b>40,6</b>	<b>59,4</b>	<b>50,2</b>	<b>49,8</b>	<b>53,0</b>	<b>46,2</b>	<b>55,1</b>	<b>43,6</b>	<b>28,2</b>	<b>67,2</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 60.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida da substância pura (*E*)- cariofileno, sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm e 500 ppm com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (288 horas)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 239)	79,9	8,8	0,0
DMSO (n= 241)	80,1	7,9	2,5
150 ppm (n= 237)	55,3	8,4	0,8
200 ppm (n= 238)	58,0	3,4	0,4
250 ppm (n= 234)	52,6	4,3	0,0
300 ppm (n= 239)	54,8	5,0	0,0
350 ppm (n= 241)	48,1	1,7	0,0
400 ppm (n= 236)	43,2	3,0	0,8
450 ppm (n= 236)	40,7	3,0	1,3
500 ppm (n= 238)	63,0	4,2	4,6

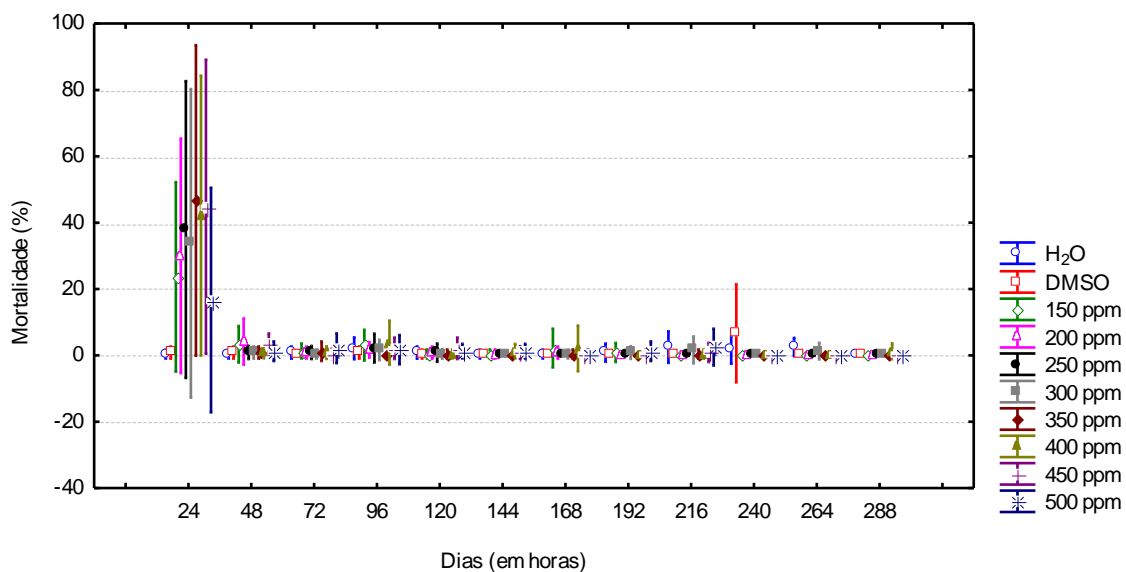
n = número total de larvas expostas.



**Figura 45.** Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica, em 24 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente ao bioensaio de efetividade realizado com a substância pura (*E*)- cariofileno. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 61.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio de efetividade com a substância pura (*E*)- cariofileno. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	47,9821	0,000000*
	Concentração	1,9159	0,046148*
	Tempo X Concentração	2,0367	0,000000*



**Figura 46.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio de efetividade realizado com a substância pura (*E*)- cariofileno.



**Tabela 62.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante o primeiro bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida da substância pura  $\alpha$ -pineno, sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm e 500 ppm com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 239)		CONTROLE DMSO (n= 241)		$\alpha$ -pineno 150 ppm (n= 238)		$\alpha$ -pineno 200 ppm (n= 235)		$\alpha$ -pineno 250 ppm (n= 235)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,4	0,0	0,8	0,0	9,7	0,0	20,4	0,0	38,3	0,0
42 h	0,8	6,7	1,7	9,1	11,3	6,3	23,0	6,0	40,9	0,9
72 h	1,7	20,1	1,7	25,3	12,6	17,6	25,1	13,2	43,0	6,8
96 h	3,8	49,0	2,5	58,1	15,5	39,9	26,0	31,1	46,4	17,4
120 h	4,6	61,1	2,9	72,6	16,0	52,9	26,4	41,3	46,8	25,1
144 h	5,0	64,9	2,9	75,9	17,2	55,5	28,1	41,7	48,9	28,1
168 h	5,4	66,1	2,9	80,1	18,5	56,3	29,8	43,8	48,9	30,2
192 h	6,3	74,9	2,9	85,1	18,9	65,5	30,6	56,6	50,6	41,7
216 h	8,8	78,7	2,9	86,7	19,3	73,1	31,1	62,1	51,1	45,5
240 h	10,5	86,6	9,5	87,6	19,3	74,4	31,1	64,7	51,5	46,4
264 h	11,3	88,3	9,5	88,0	19,3	75,2	31,5	64,7	51,5	46,4
288 h	11,3	88,7	9,5	88,0	19,3	75,2	31,5	64,7	51,5	46,4
<b>TOTAL</b>	<b>11,3</b>	<b>88,7</b>	<b>9,5</b>	<b>88,0</b>	<b>19,3</b>	<b>75,2</b>	<b>31,5</b>	<b>64,7</b>	<b>51,5</b>	<b>46,4</b>

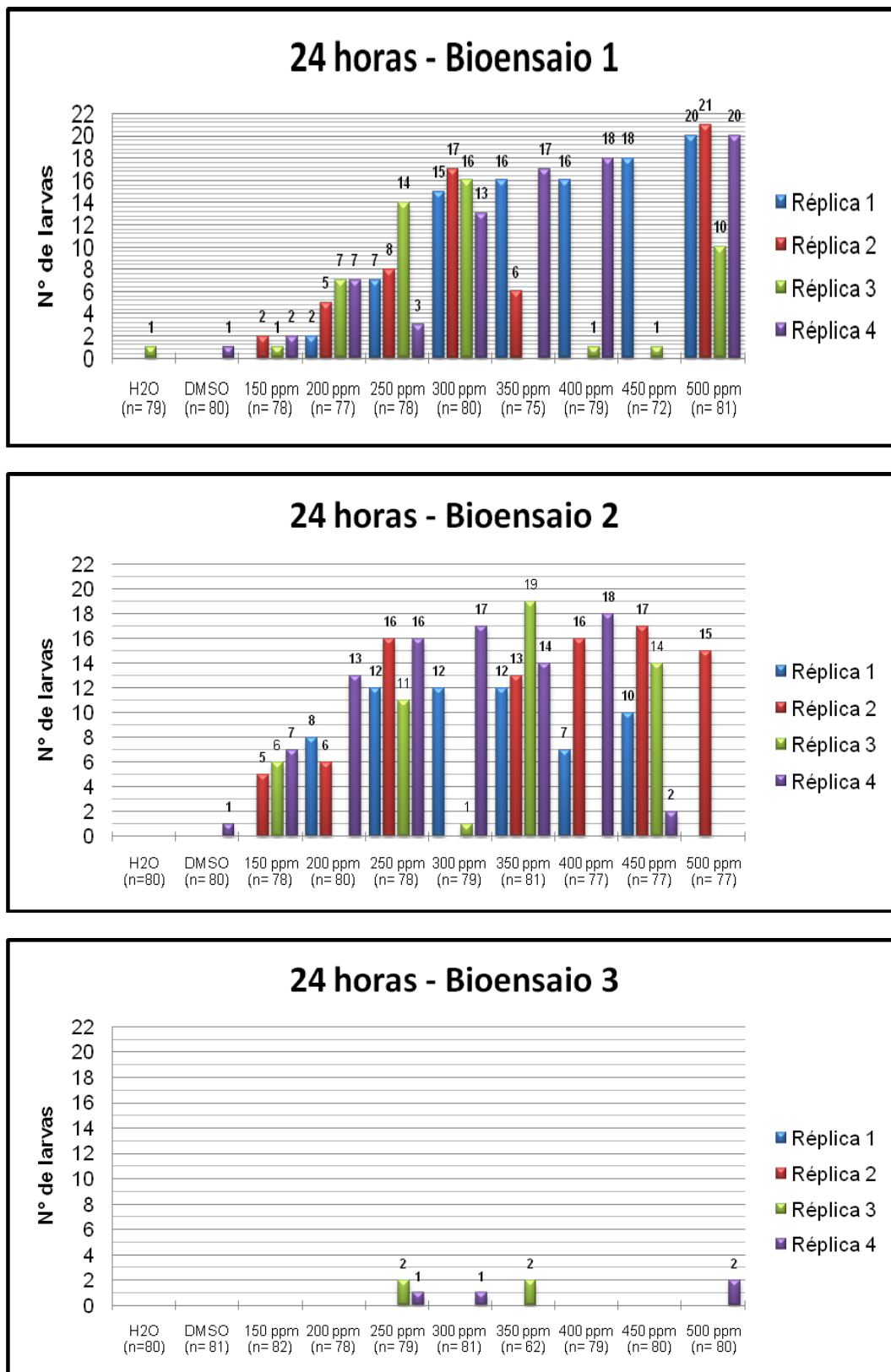
HORAS	$\alpha$ -pineno 300 ppm (n= 240)		$\alpha$ -pineno 350 ppm (n= 218)		$\alpha$ -pineno 400 ppm (n= 235)		$\alpha$ -pineno 450 ppm (n= 229)		$\alpha$ -pineno 500 ppm (n= 238)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	38,3	0,0	45,4	0,0	32,3	0,0	27,1	0,0	37,0	0,0
42 h	41,3	2,9	50,0	0,9	34,9	1,7	28,8	3,9	37,8	2,5
72 h	42,5	6,3	50,5	5,5	35,7	6,0	29,7	11,4	38,2	15,1
96 h	43,3	19,2	51,8	18,3	38,3	20,9	31,9	33,6	39,1	42,9
120 h	44,2	28,3	51,8	23,9	39,1	34,0	32,3	45,4	39,5	49,6
144 h	45,0	29,6	52,3	26,1	39,1	39,6	32,3	47,6	39,5	50,8
168 h	46,7	32,1	53,7	28,4	39,6	41,3	32,8	50,2	39,9	52,9
192 h	47,1	40,0	55,0	33,9	42,1	51,1	33,2	59,4	40,8	58,0
216 h	47,5	42,5	55,5	39,9	42,1	54,0	33,6	62,0	41,2	58,4
240 h	47,5	44,2	56,0	42,2	42,6	55,3	34,1	64,2	41,2	58,4
264 h	47,5	44,2	56,0	42,2	42,6	55,3	34,1	64,2	41,2	58,4
288 h	47,5	44,2	56,4	42,2	42,6	55,3	34,1	64,2	41,2	58,4
<b>TOTAL</b>	<b>47,5</b>	<b>44,2</b>	<b>56,4</b>	<b>42,2</b>	<b>42,6</b>	<b>55,3</b>	<b>34,1</b>	<b>64,2</b>	<b>41,2</b>	<b>58,4</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 63.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida da substância pura  $\alpha$ -pineno, sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm e 500 ppm com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (288 horas)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 239)	79,9	8,8	0,0
DMSO (n= 241)	80,1	7,9	2,5
150 ppm (n= 238)	65,1	10,1	5,5
200 ppm (n= 235)	59,6	5,1	3,8
250 ppm (n= 235)	45,1	1,3	2,1
300 ppm (n= 240)	43,8	0,4	8,3
350 ppm (n= 218)	34,9	7,3	1,4
400 ppm (n= 235)	53,2	2,1	2,1
450 ppm (n= 229)	60,3	3,9	1,7
500 ppm (n= 238)	56,3	2,1	0,4

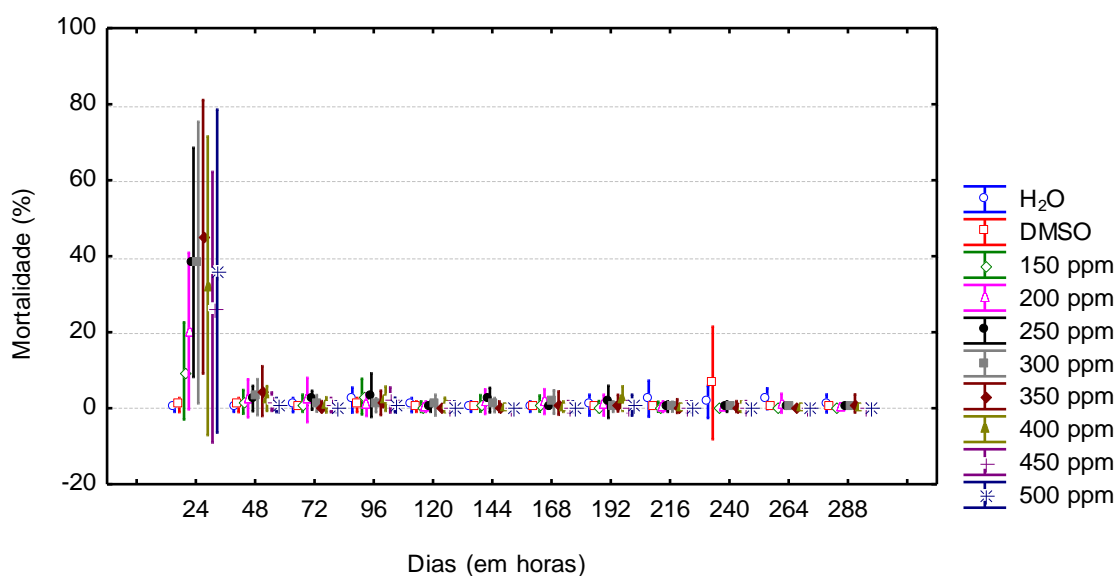
n = número total de larvas expostas.



**Figura 47.** Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica, em 24 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente ao bioensaio de efetividade realizado com a substância pura  $\alpha$ -pineno. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 64.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio de efetividade com a substância pura  $\alpha$ -pineno. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	55,2189	0,000000*
	Concentração	2,9409	0,001861*
	Tempo X Concentração	2,6841	0,000000*



**Figura 48.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio de efetividade realizado com a substância pura  $\alpha$ -pineno.

**Tabela 65.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante o primeiro bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida da substância pura  $\beta$ -pineno, sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm e 500 ppm com duração total de 240 horas (dez dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 239)		CONTROLE DMSO (n= 241)		$\beta$ -pineno 150 ppm (n= 232)		$\beta$ -pineno 200 ppm (n= 236)		$\beta$ -pineno 250 ppm (n= 236)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,4	0,0	0,8	0,0	15,5	0,0	33,1	0,0	41,9	0,0
42 h	0,8	6,7	1,7	9,1	20,7	7,3	36,4	2,5	47,9	0,8
72 h	1,7	20,1	1,7	25,3	23,3	13,8	38,1	7,2	48,7	5,5
96 h	3,8	49,0	2,5	58,1	25,9	37,9	40,3	25,0	50,0	18,6
120 h	4,6	61,1	2,9	72,6	26,7	53,4	41,1	36,4	50,8	32,2
144 h	5,0	64,9	2,9	75,9	27,6	56,5	41,9	41,9	51,7	34,7
168 h	5,4	66,1	2,9	80,1	32,3	59,5	42,8	44,1	52,1	36,4
192 h	6,3	74,9	2,9	85,1	33,2	64,7	44,9	50,4	54,2	43,6
216 h	6,7	78,2	2,9	86,7	34,1	65,1	45,3	53,0	54,2	44,1
240 h	7,9	83,7	6,2	87,1	34,1	65,1	45,3	53,0	54,7	44,5
<b>TOTAL</b>	<b>7,9</b>	<b>83,7</b>	<b>6,2</b>	<b>87,1</b>	<b>34,1</b>	<b>65,1</b>	<b>45,3</b>	<b>53,0</b>	<b>54,7</b>	<b>44,5</b>

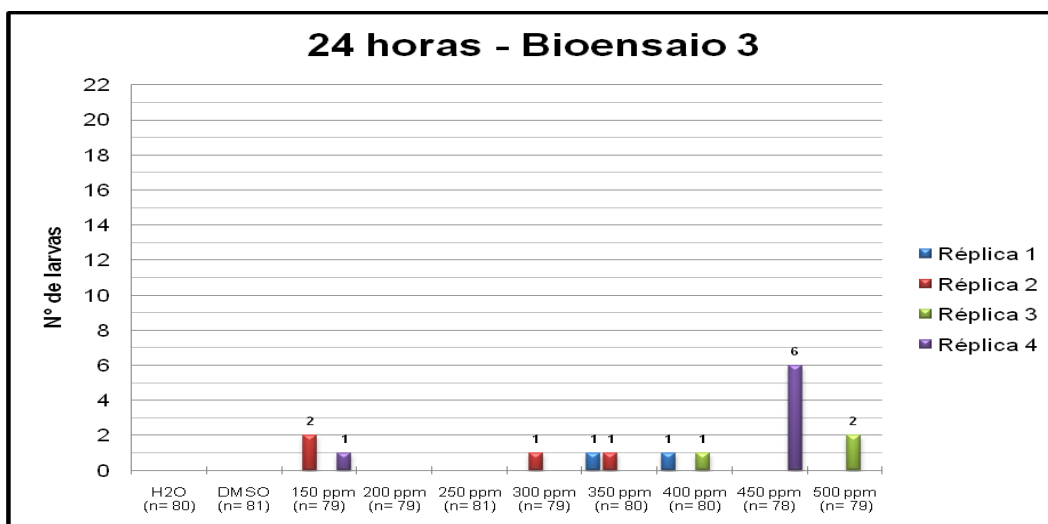
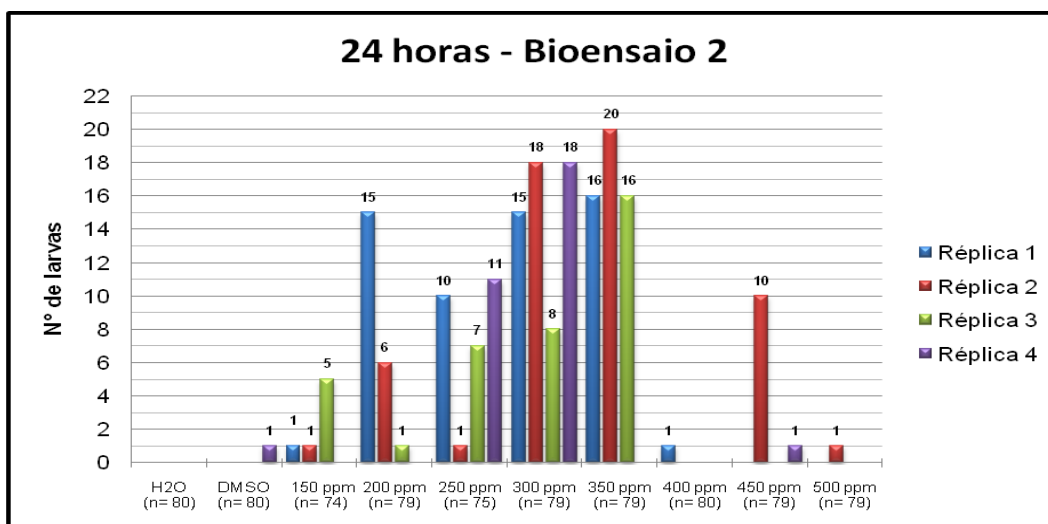
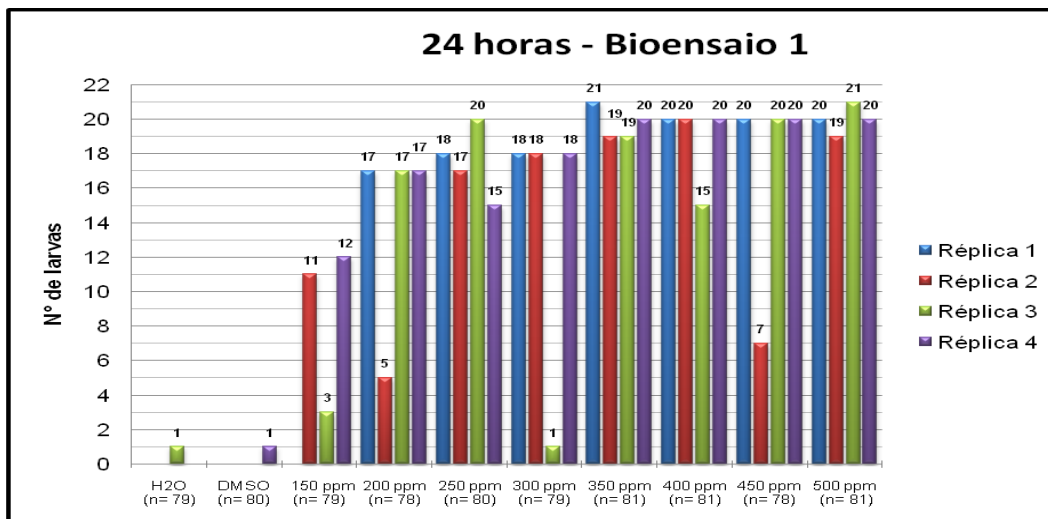
HORAS	$\beta$ -pineno 300 ppm (n= 237)		$\beta$ -pineno 350 ppm (n=240)		$\beta$ -pineno 400 ppm (n= 241)		$\beta$ -pineno 450 ppm (n= 235)		$\beta$ -pineno 500 ppm (n= 239)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	48,5	0,0	55,4	0,0	32,4	0,0	35,7	0,0	34,7	0,0
42 h	54,0	0,0	57,1	2,5	32,8	0,0	37,0	0,4	35,6	0,4
72 h	56,1	2,5	57,5	4,2	33,2	1,7	37,9	3,4	36,0	0,8
96 h	56,1	19,0	57,9	12,1	33,6	29,9	38,7	31,5	38,9	32,2
120 h	56,5	30,8	58,3	25,0	34,4	40,2	40,0	44,3	40,2	41,8
144 h	58,2	32,9	58,3	28,8	34,4	43,2	41,3	45,1	40,6	44,8
168 h	60,3	33,8	59,2	29,6	34,4	45,6	42,1	46,4	42,3	46,9
192 h	60,8	38,0	59,2	38,3	34,9	53,1	43,0	53,6	44,8	50,2
216 h	60,8	38,8	59,2	40,4	34,9	57,3	43,4	55,7	44,8	51,5
240 h	60,8	38,8	59,2	40,4	35,3	62,7	43,4	56,6	44,8	54,0
<b>TOTAL</b>	<b>60,8</b>	<b>38,8</b>	<b>59,2</b>	<b>40,4</b>	<b>35,3</b>	<b>62,7</b>	<b>43,4</b>	<b>56,6</b>	<b>44,8</b>	<b>54,0</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 66.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida da substância pura  $\beta$ -pineno, sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm e 500 ppm com duração total de 240 horas (dez dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (240 horas)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 239)	74,5	9,2	0,0
DMSO (n= 241)	79,3	7,9	2,1
150 ppm (n= 232)	61,6	3,4	0,9
200 ppm (n= 236)	50,0	2,5	1,7
250 ppm (n= 236)	44,1	0,4	0,8
300 ppm (n= 237)	35,9	3,0	0,4
350 ppm (n= 240)	37,9	2,5	0,4
400 ppm (n= 241)	59,3	3,3	2,1
450 ppm (n= 235)	53,6	3,0	0,0
500 ppm (n= 239)	51,5	2,5	1,3

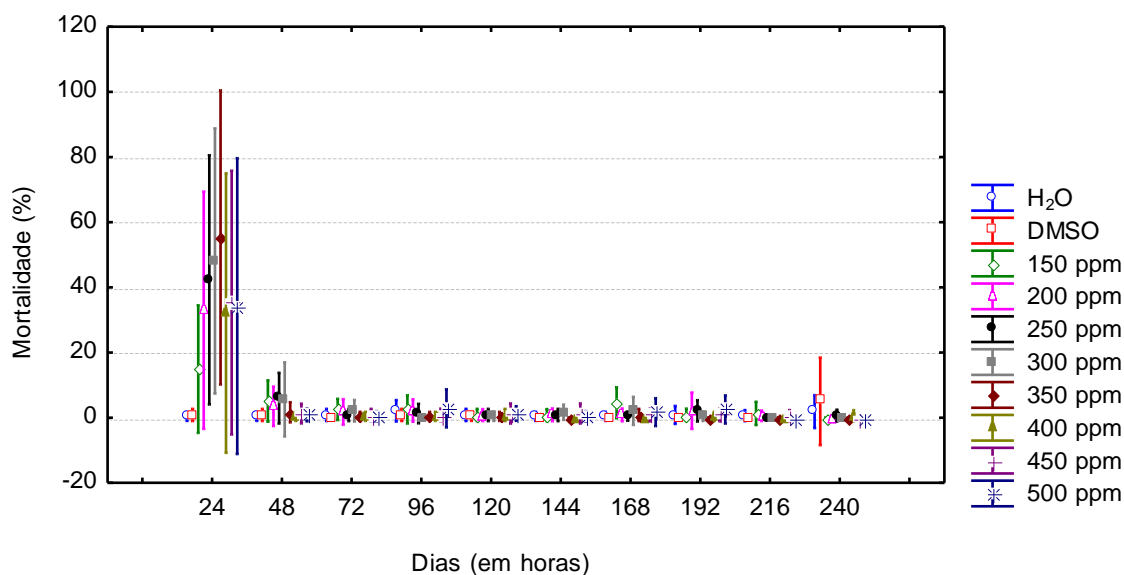
n = número total de larvas expostas.



**Figura 49.** Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica, em 24 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente ao bioensaio de efetividade realizado com a substância pura  $\beta$ -pineno. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 67.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio de efetividade com a substância pura  $\beta$ -pineno. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	61,6858	0,00000*
	Concentração	2,9868	0,001614*
	Tempo X Concentração	2,7093	0,00000*



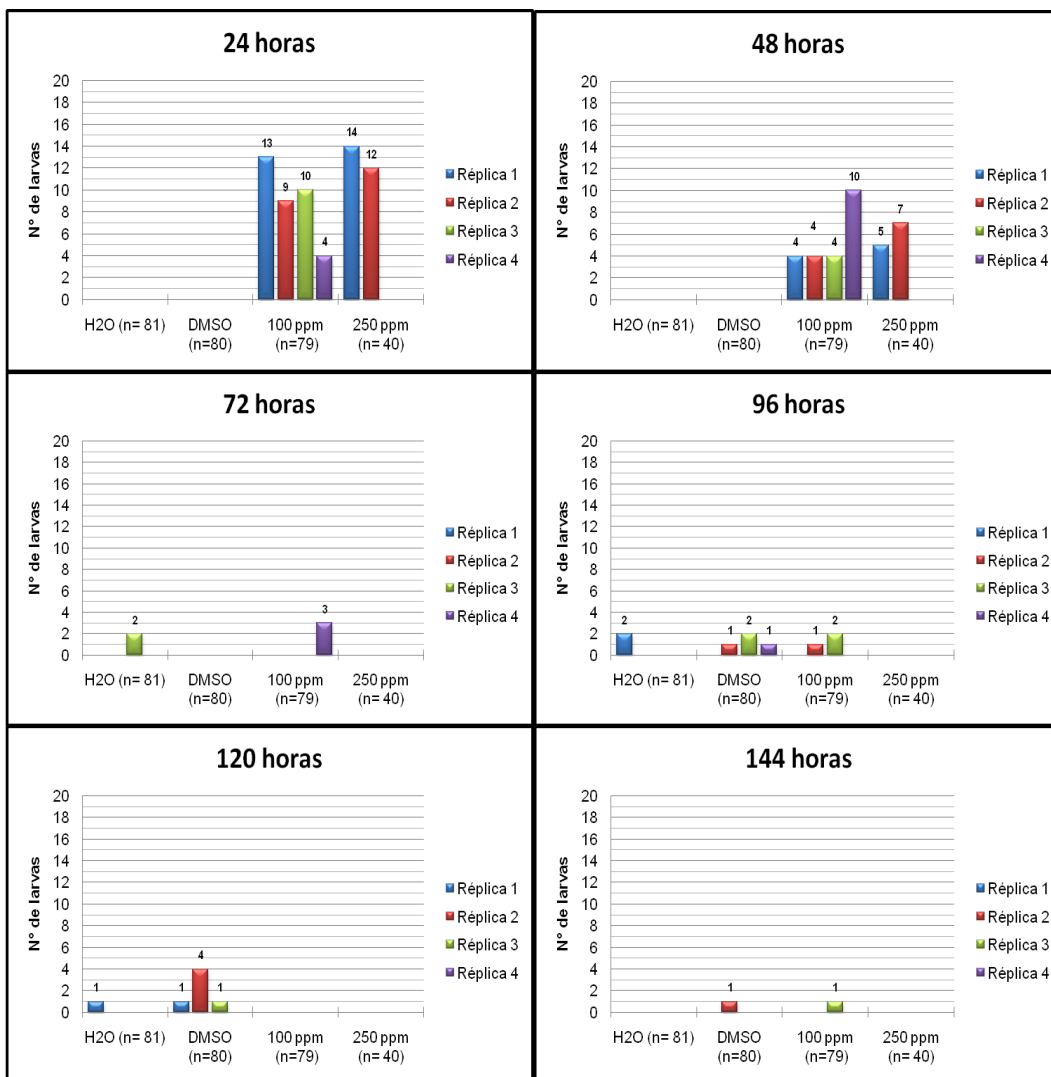
**Figura 50.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio de efetividade realizado com a substância pura  $\beta$ -pineno.

**Tabela 68.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante o primeiro bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida da substância pura óxido de cariofileno, sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 100 ppm e 250 ppm, com duração de 144 horas (seis dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 81)		CONTROLE DMSO (n= 80)		Óxido de Cariofileno 100 pp m (n= 79)		Óxido de Cariofileno 250 ppm (n= 40)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	0,0	0,0	45,6	0,0	65,0	0,0
42 h	0,0	0,0	0,0	0,0	73,4	0,0	95,0	0,0
72 h	2,5	2,5	0,0	2,5	77,2	0,0	95,0	0,0
96 h	4,9	40,7	5,0	26,3	81,0	2,5	95,0	0,0
120 h	6,2	72,8	12,5	63,8	81,0	10,1	95,0	0,0
144 h	6,2	93,8	13,8	83,8	82,3	15,2	95,0	2,5
<b>TOTAL</b>	<b>6,2</b>	<b>93,8</b>	<b>13,8</b>	<b>83,8</b>	<b>82,3</b>	<b>15,2</b>	<b>95,0</b>	<b>2,5</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.



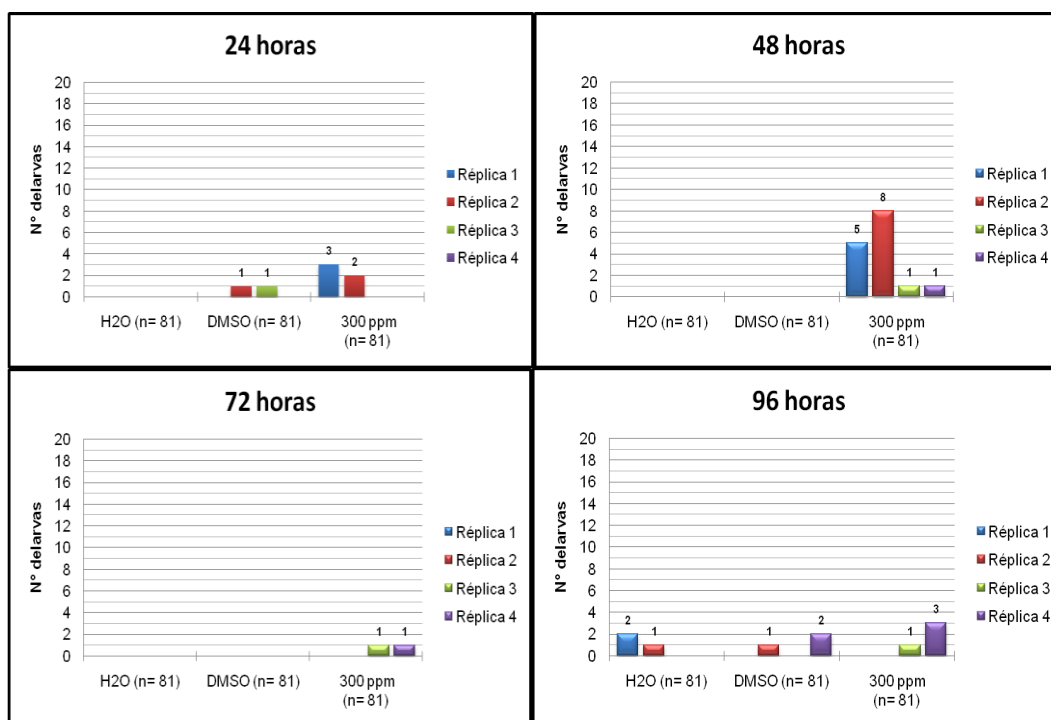


**Figura 51.** Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com a substância pura óxido de cariofileno nas concentrações de 100 e 250 ppm. (n) = número total de larvas expostas por produto.

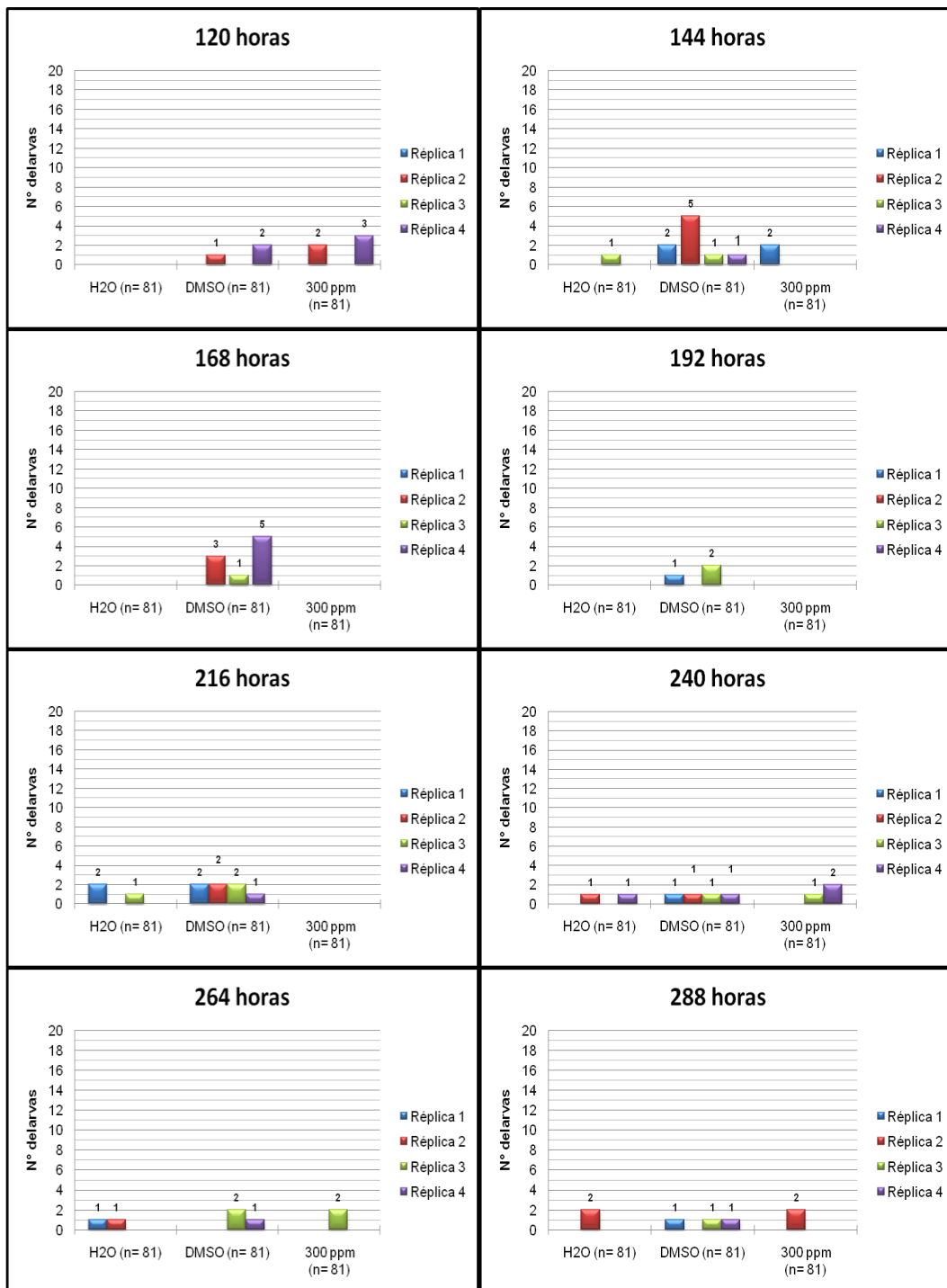
**Tabela 69.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante o segundo bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida da substância pura óxido de cariofileno, na concentração de 300 ppm, sobre imaturos de *Ae. aegypti*, nas concentrações de 300 ppm, com duração de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 81)		CONTROLE DMSO (n= 81)		Oxido de Cariofileno 300 ppm (n= 81)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	2,5	0,0	6,2	0,0
42 h	0,0	0,0	2,5	0,0	24,7	0,0
72 h	0,0	0,0	2,5	0,0	27,2	0,0
96 h	3,7	0,0	6,2	0,0	32,1	0,0
120 h	3,7	6,2	9,9	9,9	38,3	0,0
144 h	4,9	19,8	21,0	19,8	40,7	1,2
168 h	4,9	33,3	32,1	23,5	40,7	1,2
192 h	4,9	53,1	35,8	25,9	40,7	4,9
216 h	8,6	61,7	44,4	27,2	40,7	21,0
240 h	11,1	70,4	49,4	32,1	44,4	29,6
264 h	13,6	76,5	53,1	33,3	46,9	39,5
288 h	16,0	84,0	56,8	33,3	49,4	43,2
<b>TOTAL</b>	<b>16,0</b>	<b>84,0</b>	<b>56,8</b>	<b>33,3</b>	<b>49,4</b>	<b>43,2</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas.



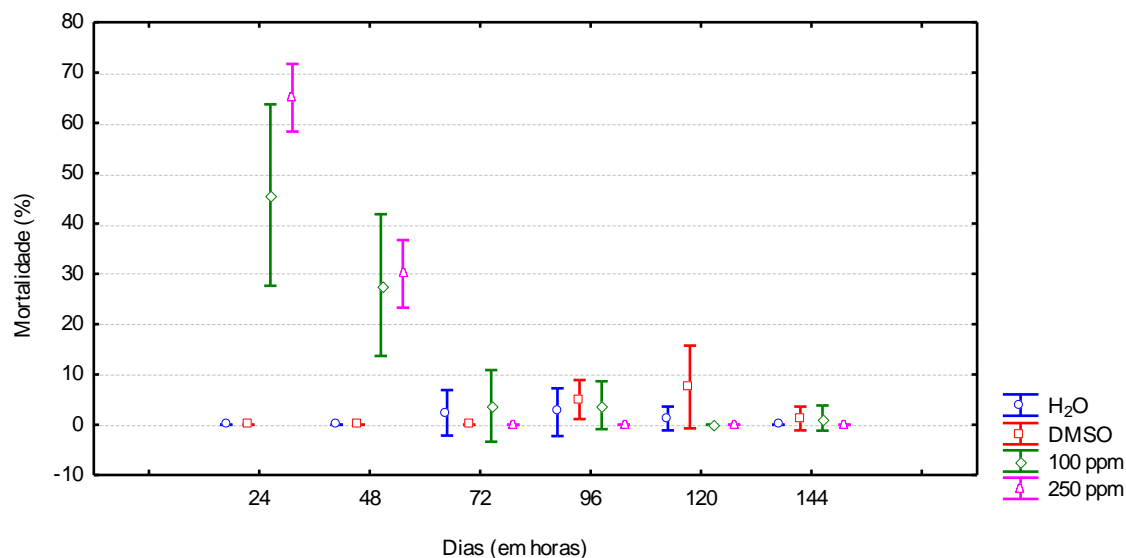
**Figura 52a.** Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com a substância pura óxido de cariofileno na concentração de 300 ppm. (n) = número total de larvas expostas por produto.



**Figura 52b.** Mortalidade larval não acumulada por concentração, por réplica e por dia (em horas) referente ao bioensaio preliminar realizado com a substância pura óxido de cariofileno na concentração de 300 ppm. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 70.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com substância pura óxido de cariofileno nas concentrações de 100 e 250 ppm. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

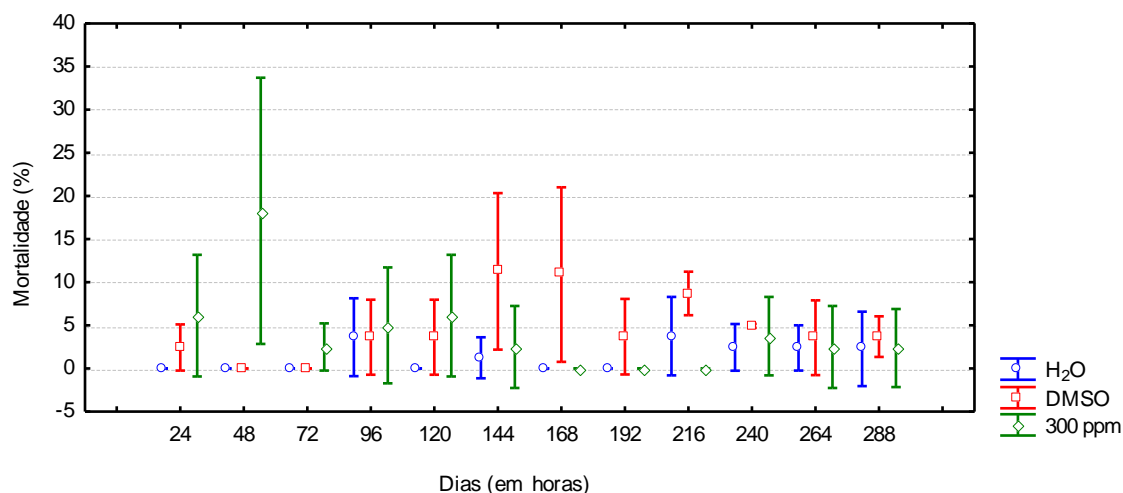
Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	23,8201	0,000000*
	Concentração	26,6267	0,000000*
	Tempo X Concentração	14,6940	0,000000*



**Figura 53.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com substância pura óxido de cariofileno nas concentrações de 100 e 250 ppm.

**Tabela 71.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar com substância pura óxido de cariofileno na concentração de 300 ppm. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	0,98942	0,460685
	Concentração	6,11213	0,003057*
	Tempo X Concentração	2,67729	0,000412*



**Figura 54.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com substância pura óxido de cariofileno nas concentrações de 100 e 250 ppm.

Os valores das concentrações letais CL50, CL95 e CL99 estimadas através do teste de  $\chi^2$  para os extratos vegetais e óleos essenciais da família Annonaceae e substâncias puras óxido de cariofileno, (*E*)-cariofileno,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno estão apresentadas na Tabela 72.

**Tabela 72.** Análise da atividade larvicida dos extratos vegetais e óleos essenciais da família Annonaceae e substâncias puras óxido de cariofileno, (*E*)-cariofileno,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno sobre imaturos de *Ae. aegypti*, com suas respectivas concentrações letais (CL), intervalos de confiança, qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e coeficiente angular (*Slope*) após leitura de 24 e ao término dos bioensaios.

COMPOSTO	HORAS	CL 50 (ppm)	CL95 (ppm)	CL99 (ppm)	Slope	$\chi^2$
APCEH	24	-	-	-	-	-
	216	-	-	-	-	-
APCEM	24	-	-	-	-	-
	216	-	-	-	-	-
APFEH	24	-	-	-	-	>10
	216	-	-	-	-	>10
	24	6.017,68 (1.278,36 - O.F.)	344.868,60 (10.378,72- O.F.)	1.845.215 (24.492,57 - O.F.)	0,93±0,46	2,91
APFEM	24	253,79 (204,14 - 311,71)	1.310,25 (848,96 - 3.007,68)	2.586,31 (1.428,86 - 8.248,77)	2,31±0,39	7,52
	216	183,57 (87,97 - 369,88)	231,15 (73,64 - 849,08)	251,31 (53,69 - 1.526,48)	16,43±4,91	7,0
OEAP	24	149,89 (137,79 - 161,39)	256,66 (223,70 - 331,17)	320,72 (265,89 - 458,71)	7,04±1,17	1,61
	168	-	-	-	-	-
AVCEEP	24	-	-	-	-	-
	168	-	-	-	-	>10
AVCEM	24	-	-	-	-	-
	168	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-
AVFEEM	24	-	-	-	-	-
	168	469,88 (I. C.)	9.301,76 (I. C)	19.537,87 (I. C)	1,27±1,00	4,72
AVFEM	24	-	-	-	-	-
	168	-	-	-	-	-

continua

**Tabela 72.** Análise da atividade larvívora dos extratos vegetais e óleos essenciais da família Annonaceae e substâncias puras óxido de cariofileno, (*E*)-cariofileno,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno sobre imaturos de *Ae. aegypti*, com suas respectivas concentrações letais (CL), intervalos de confiança, qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e coeficiente angular (*Slope*) após leitura de 24 e ao término dos bioensaios

COMPOSTO	HORAS	CL 50 (ppm)	CL95 (ppm)	CL99 (ppm)	conclusão	
					Slope	$\chi^2$
OEAV	24	123,80 (117,11 - 129,89)	246,15 (232,76 - 263,09)	327,24 (302,15 - 360,86)	5,51±0,32	9,28
	288	115,89 (108,02 - 122,71)	212,93 (199,60 - 231,11)	273,97 (249,86 - 309,48)	6,23±0,49	5,47
XLCEH	24	-	-	-	-	-
	288	153,67 (105,71 - 196,42)	1.112,57 (690,52 - 2.994,26)	2.526,34 (1.273,97 - 10.916,87)	1,91±0,36	1,33
XLCEM	24	-	-	-	-	-
	168	-	-	-	-	-
XLFEH	24	300,99 (17,39 - 5.799,73)	993,14 (0,29 - 22.060.040)	1.628,54 (0,03 - 1.329.326.000)	3,17±0,97	5,92
	168	-	-	-	-	-
XLFEM	24	-	-	-	-	-
	168	-	-	-	-	-
OEXL	24	632,36 (516,80 - 916,03)	2.977,52 (1.693,23 - 8.964,63)	5.657,4 (2.752,81 - 23.194,23)	2,44 ± 0,41	5,49
	120	430,80 (329,24 - 896,32)	13.942,50 (3.184,42 - 5.471.767)	58.874,57 (7.838,87 - 210.620.200)	1,09±0,34	5,81
Óxido de Cariofileno	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ - pineno	24	913,15 (406,85 - 2.383,73)	11.543,56 (849,50 - 266.839,70)	33.021,04 (1.133,81 - 1.915.064)	1,49±0,35	8,51
	216	2.271,42 (I. C)	557.746 (I. C)	5.452.789 (I. C)	0,69±0,35	5,16
(E) - Cariofileno	24	531,40 (443,10 - 736,56)	11.204,53 (4.539,20 - 65.640,93)	39.617,27 (11.792,03 - 425.610,70)	1,24±0,20	7,34
	216	490,22 (410,65 - 684,86)	9.143,42 (3.626,81 - 65.935,60)	30.728,42 (8.834,98 - 442.683,10)	1,29±0,24	3,80
$\beta$ - pineno	24	947,90 (712,90 - 1.665,18)	18.485,87 (6.527,92 - 164.694,40)	63.283,68 (16.200,17 - 1.114.140)	1,27±0,23	0,55
	216	2.066,39 (857,59 - 871.005.500)	2.742.475 (41.030,95 - O.F.)	53.939.160 (200.720,20 - O.F.)	0,53±0,24	4,00

(I.C.) = impossível de calcular o intervalo de confiança; (O. F.) = overflow; \* É importante ressaltar que, para a análise pelo probit foi necessário eliminar alguns pontos (concentrações) das análises, pois os valores do  $\chi^2$  estavam maiores do que 10 quando incluso todas as concentrações. Portanto, para o composto OEAP em 24 horas foi eliminada a concentração de 125 ppm; para OEAV em 24 horas, eliminou-se a concentração de 150 ppm e em 288 horas, eliminou-se a concentração de 150 ppm; para OEXL em 24 horas foram eliminadas as concentrações de 125, 150, 175, 225, 275 e 500 ppm e em 120 horas foram eliminadas as concentrações de 100, 150, 175, 225, 250, 275 e 500 ppm; para  $\alpha$ -pineno em 24 horas foram eliminadas as concentrações de 250, 300 e 350 ppm e em 288 horas foram eliminadas as concentrações de 150, 250, 300 e 350 ppm; para (E)-cariofileno em 24 e 288 horas foi eliminada a concentração de 500 ppm e para  $\beta$ -pineno em 24 e 240 horas foram eliminadas as concentrações de 200, 250, 300 e 350 ppm.

### **4.3 ATIVIDADE LARVICIDA E VERIFICAÇÃO DO PERÍODO DE ATIVIDADE LARVICIDA DOS COMPOSTOS PROCESSADOS NA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCar)**

Os compostos C1 e C7 apresentaram as maiores porcentagens de atividade larvicida sob condições controladas ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ , umidade  $70\% \pm 10$  e fotoperíodo 12:12) sobre populações de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, a partir de bioensaios preliminares com duração de 96 horas (Tabela 73 e Figura 55).

As análises estatísticas para C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8 mostraram que as variáveis tempo e concentração, assim como a interação entre elas, são estatisticamente significativas em relação à variável porcentagem de mortalidade larval ( $p < 0,05$ ). A média do percentual de mortalidade observada no grupo referente ao composto C7 em 72 horas mostrou-se maior e diferente das médias dos demais grupos analisados no bioensaio preliminar realizado com oito compostos diferente, ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. Pelo teste de Dunnett, o grupo referente aos compostos C1 e C7 em 48, 72 e 96 horas diferiram-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle água. Não existiram diferenças estatísticas para os demais grupos analisados (Tabela 74 e Figura 56).

**Tabela 73.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante o bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida dos compostos C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8, sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, na concentração de 40 µM, com duração de 96 horas (quatro dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada.

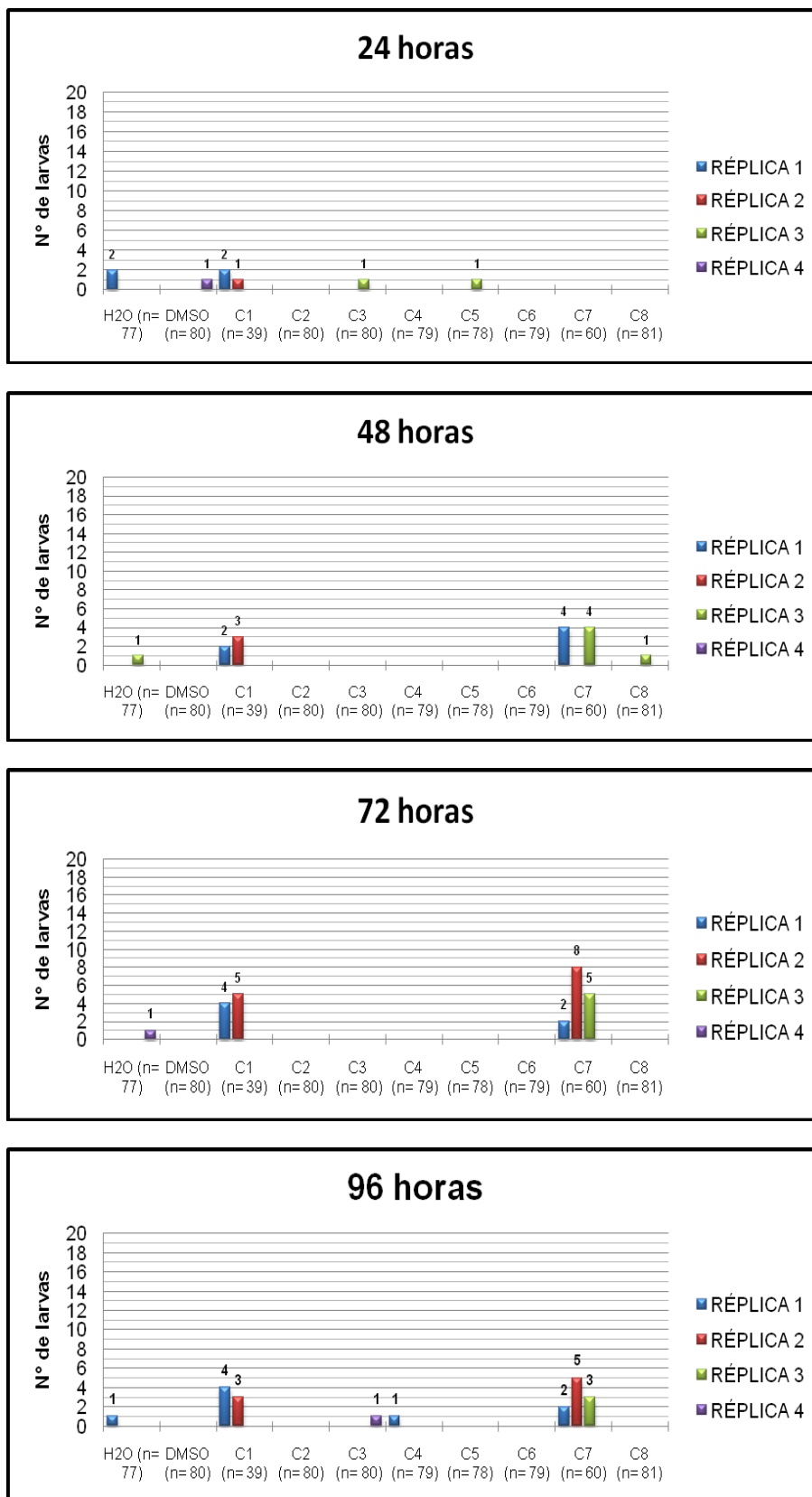
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 77)		CONTROLE DMSO (n= 80)		C1 (n= 39)		C2 (n= 80)		C3 (n= 80)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	2,6	0,0	1,3	0,0	7,7	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0
42 h	3,9	0,0	1,3	0,0	20,5	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0
72 h	5,2	0,0	1,3	0,0	43,6	0,0	0,0	0,0	1,3	1,3
96 h	6,5	1,3	1,3	0,0	61,5	0,0	0,0	0,0	2,5	1,3
<b>TOTAL</b>	<b>6,5</b>	<b>1,3</b>	<b>1,3</b>	<b>0,0</b>	<b>61,5</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>2,5</b>	<b>1,3</b>

HORAS	C4 (n= 79)		C5 (n= 78)		C6 (n= 79)		C7 (n= 60)		C8 (n= 81)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
42 h	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0	13,3	0,0	1,2	0,0
72 h	0,0	0,0	1,3	2,6	0,0	0,0	38,3	0,0	1,2	0,0
96 h	1,3	0,0	1,3	5,1	0,0	0,0	55,0	0,0	1,2	1,2
<b>TOTAL</b>	<b>1,3</b>	<b>0,0</b>	<b>1,3</b>	<b>5,1</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>55,0</b>	<b>0,0</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas; C1= composto 1; C2= composto 2; C3= composto 3; C4= composto 4; C5= composto 5; C6= composto 6; C7= composto 7; C8= composto 8.

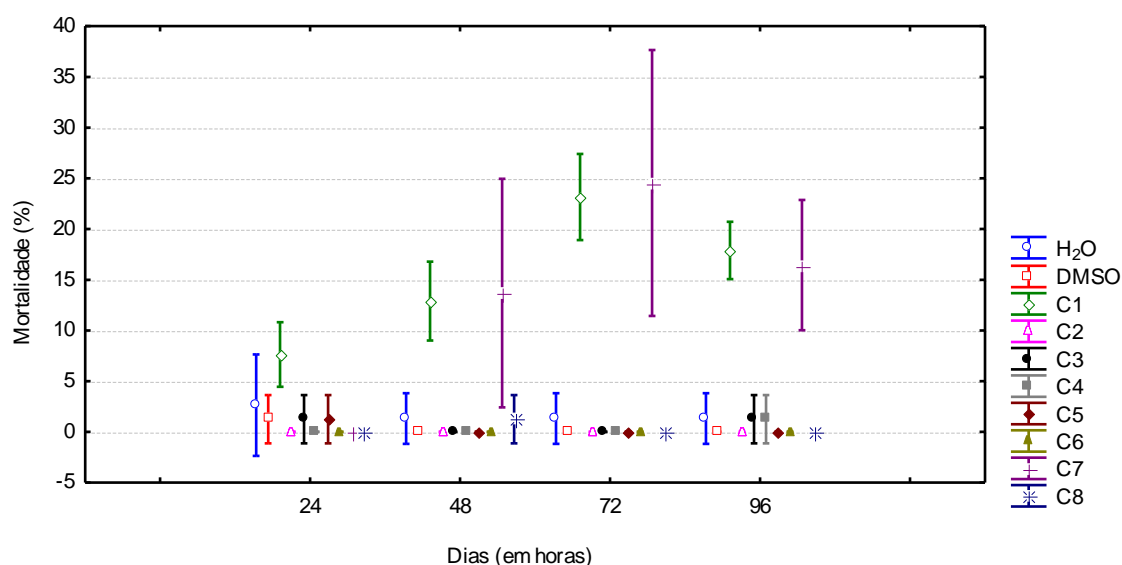




**Figura 55.** Mortalidade larval não acumulada por composto, por réplica e por dia (em horas), referente ao bioensaio preliminar realizado com os compostos C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 74.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar os compostos C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	3,52319	0,017493*
	Concentração	38,16492	0,000000*
	Tempo X Concentração	4,23270	0,000000*



**Figura 56.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com os compostos C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8.

Selecionados para dar continuidade a avaliação de atividade larvicida, os compostos C1 e C7, assim como a subunidade SB3, mostraram atividade larvicida acima de 80% sob condições controladas ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ , umidade  $70\% \pm 10$  e fotoperíodo 12:12) sobre populações de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, a partir de bioensaios preliminares realizados com os compostos C1 e C7 e suas subunidades (SB2, SB3, SB4, SB5 e SB6), com duração de total de 264 horas (Tabela 75).

As análises estatísticas mostraram que, para C1 e C7, as variáveis tempo e concentração, assim como a interação entre elas, são estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação à variável porcentagem de mortalidade larval. A média do percentual de mortalidade observada no grupo referente aos compostos C1 e C7 em 48 horas mostraram-se maiores e diferente das médias dos demais grupos analisados, ao nível de significância de 5% pelo teste de

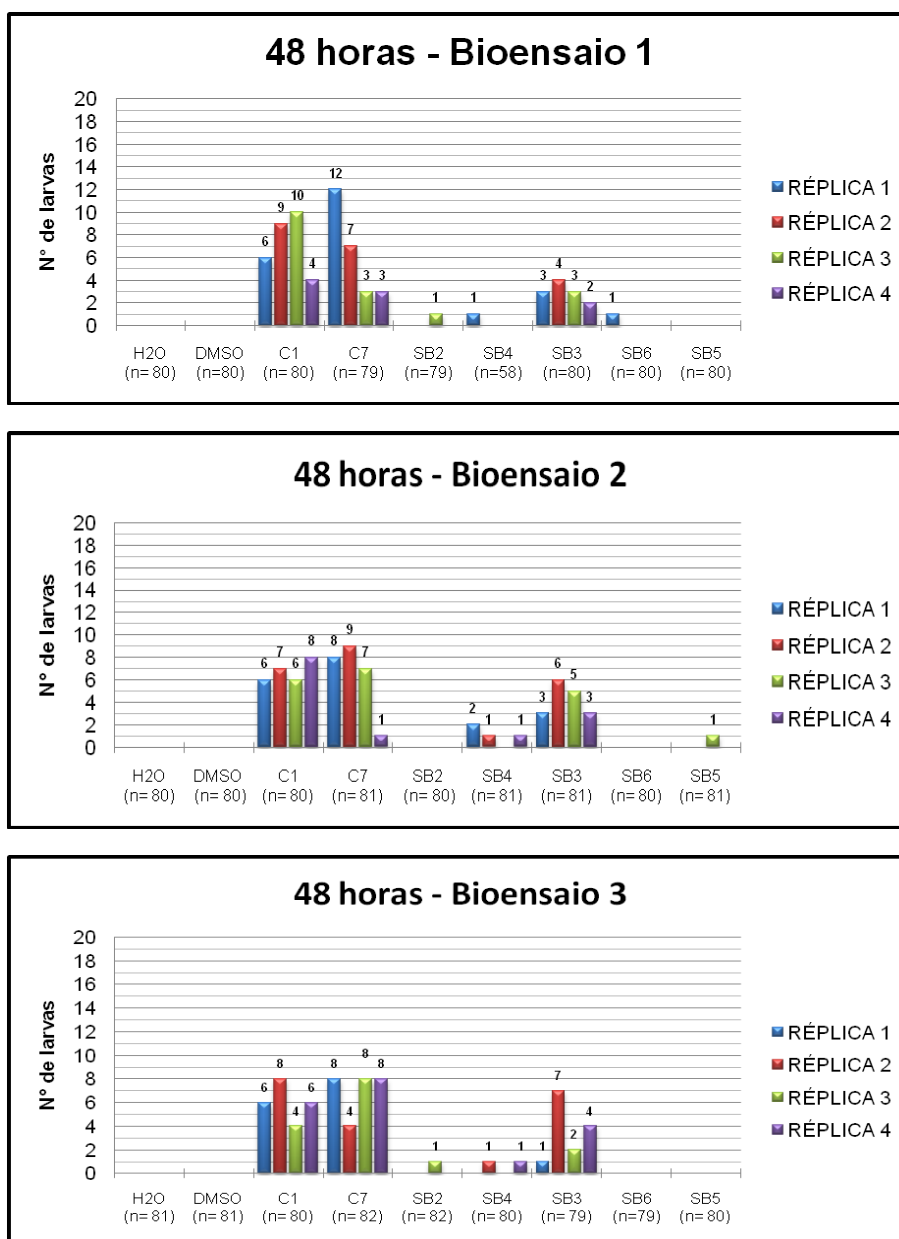
Tukey. Não existiram diferenças estatísticas para os demais grupos analisados (Tabela 76 e Figuras 57 e 58).

**Tabela 75.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios preliminares realizados para avaliação da atividade larvicida dos compostos C1 e C7 e suas subunidades (SB 2, SB 3, SB4, SB 5 e SB6), na concentração de 40  $\mu$ M, sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 264 horas (onze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

HORAS	CONTROLE H2O (n= 241)		CONTROLE DMSO (n= 241)		C1 (n= 240)		C7 (n= 242)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	0,0	0,0	6,3	0,0	6,2	0,0
42 h	0,0	0,4	0,0	0,0	39,6	0,0	38,4	0,0
72 h	0,4	2,5	0,0	0,4	62,5	0,0	64,0	0,0
96 h	2,1	14,1	5,8	7,1	77,9	0,0	79,8	0,0
120 h	2,9	33,6	9,1	22,0	86,3	0,0	88,0	0,0
144 h	3,7	64,3	10,4	31,5	90,8	0,0	92,1	0,0
168 h	4,1	72,6	11,6	39,8	93,3	0,0	93,8	0,4
192 h	5,0	79,7	13,7	44,4	93,8	0,0	93,8	0,4
216 h	5,4	85,1	16,2	47,7	94,2	0,0	93,8	0,4
240 h	10,8	85,9	27,4	47,7	94,2	0,0	93,8	0,4
264 h	11,6	88,4	28,6	47,7	94,2	0,0	93,8	0,4
<b>TOTAL</b>	<b>11,6</b>	<b>88,4</b>	<b>28,6</b>	<b>47,7</b>	<b>94,2</b>	<b>0,0</b>	<b>93,8</b>	<b>0,4</b>

HORAS	SB2 (n= 241)		SB3 (n= 240)		SB4 (n= 219)		SB6 (n= 239)		SB5 (n= 241)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	0,8	0,0	1,8	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
42 h	0,8	0,0	18,8	0,0	5,0	0,0	0,8	0,0	0,4	0,0
72 h	0,8	0,0	43,8	0,0	5,5	0,0	0,8	0,0	0,8	0,0
96 h	2,5	10,8	62,5	0,0	6,8	3,2	2,1	13,4	2,5	14,5
120 h	4,6	27,8	72,9	0,0	9,1	17,8	3,8	36,8	4,1	40,7
144 h	8,3	49,0	82,5	0,8	12,3	30,6	6,3	49,4	4,6	52,7
168 h	9,5	56,0	82,9	1,3	16,0	41,1	6,3	56,1	4,6	59,3
192 h	10,0	62,2	85,4	1,7	21,0	46,1	7,1	59,8	5,8	63,9
216 h	10,4	63,9	87,5	2,1	23,7	50,7	7,9	62,3	7,5	68,0
240 h	14,1	63,9	87,5	2,1	25,6	51,1	10,5	62,3	10,4	70,5
264 h	14,5	63,9	87,5	2,1	26,5	51,1	11,3	62,3	10,8	71,4
<b>TOTAL</b>	<b>14,5</b>	<b>63,9</b>	<b>87,5</b>	<b>2,1</b>	<b>26,5</b>	<b>51,1</b>	<b>11,3</b>	<b>62,3</b>	<b>10,8</b>	<b>71,4</b>

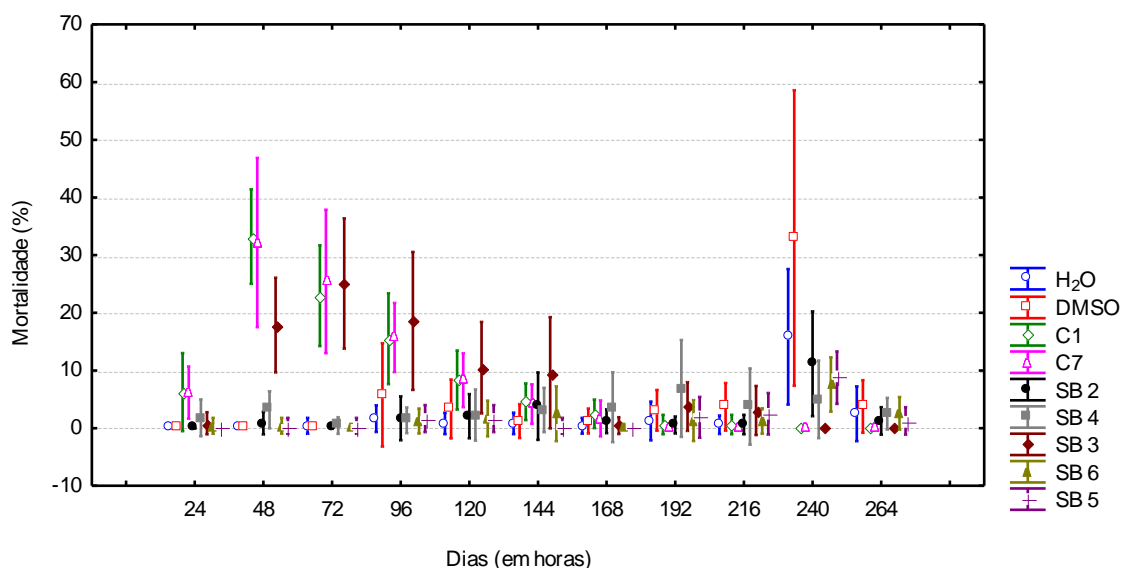
M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas; C1 = composto 1; C7 = compostos 7; SB2 = subunidade 2; SB3 = subunidade 3; SB4 = subunidade 4; SB5 = subunidade 5; SB6 = subunidade 6.



**Figura 57.** Mortalidade larval não acumulada por composto e subunidades e por réplica em 48 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente ao bioensaio de efetividade realizado com os compostos C1 e C7 e suas subunidades. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 76.** Análise estatística dos dados referente ao bioensaio preliminar os compostos C1 e C7 e suas subunidades (SB 2, SB 3, SB4, SB 5 e SB6). Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	32,7552	0,00*
	Concentração	66,2424	0,00*
	Tempo X Concentração	13,0218	0,00*



**Figura 58.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) e por concentração referente ao bioensaio preliminar realizado com os compostos C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8.

Como a realização dos bioensaios de efetividade com nove concentrações diferentes para o composto C7 se fez de forma separada, tornou-se inviável a análise estatística de forma agrupada, seguindo esta, portanto, de forma individual para cada concentração.

Os bioensaios de efetividade realizados com composto C7 mostraram atividade larvicida acima de 90% para as concentrações de 18  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$  sob condições controladas ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ , umidade  $70\% \pm 10$  e fotoperíodo 12:12) sobre populações de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller. Apesar dos resultados satisfatórios, ocorreu a emergência de adultos para as concentrações de 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 13  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 18  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$  (Tabelas 77, 78, 80, 81, 83, 84, 86, 87, 89, 90, 92, 93, 95, 96, 98, 99, 101 e 102 e Figuras 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73).

A análise estatística realizada a partir dos dados obtidos nos bioensaios de efetividade com o composto C7 mostrou que as variáveis tempo e concentração para as concentrações 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 13  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 18  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$ , assim como a interação entre elas, são estatisticamente significativas em relação à variável porcentagem de mortalidade larval ( $p < 0,05$ ). As médias do percentual de mortalidade observada nos grupos referentes às concentrações de 5  $\mu\text{M}$  em 168 horas, 10  $\mu\text{M}$  em 96 horas, 13  $\mu\text{M}$  em 48 horas, 15  $\mu\text{M}$  em 72 horas, 18  $\mu\text{M}$  em 48 e 72 horas, 20 e 30  $\mu\text{M}$  em 48 horas e 200  $\mu\text{M}$

em 24 horas mostraram-se maiores e diferentes das médias dos demais grupos analisados, respectivamente para cada concentração, ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. Pelo teste de Dunnet, os grupos referentes às concentrações de 5  $\mu\text{M}$  em 144 e 168 horas, 10  $\mu\text{M}$  em 24, 48, 72, 96, 120 e 168 horas, 13 $\mu\text{M}$  em 24, 48, 72 e 96 horas, 15  $\mu\text{M}$  em 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas, 18  $\mu\text{M}$  em 24, 48, 72 e 96 horas, 20  $\mu\text{M}$  em 48, 72 e 96 horas, 30  $\mu\text{M}$  em 48, 72 e 96 horas e 200  $\mu\text{M}$  em 24 e 48 horas diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle água. Não existiram diferenças para os demais grupos analisados (Tabela 79, 82, 83, 88, 91, 94, 97, 100, 103 e Figura 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74 e 75).

**Tabela 77.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 200  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 96 horas (quatro dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

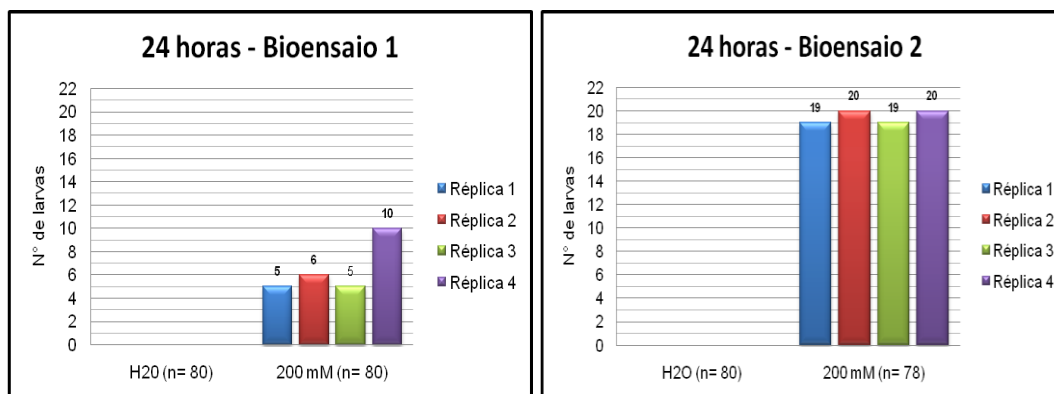
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 160)		200 $\mu\text{M}$ (n= 158)	
	Mortalidade larval (%)	Formação de pupas (%)	Mortalidade larval (%)	Formação de pupas (%)
24 h	0,0	0,0	65,8	0,0
42 h	0,0	0,0	89,2	0,0
72 h	0,0	0,6	96,2	0,0
96 h	3,8	25,0	100,0	0,0
<b>TOTAL</b>	<b>3,8</b>	<b>25,0</b>	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>

n = número total de larvas expostas.

**Tabela 78.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 200  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração de 96 horas (quatro dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (96 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 160)	25,0	0,0	71,2
200 $\mu\text{M}$ (n= 158)	0,0	0,0	0,0

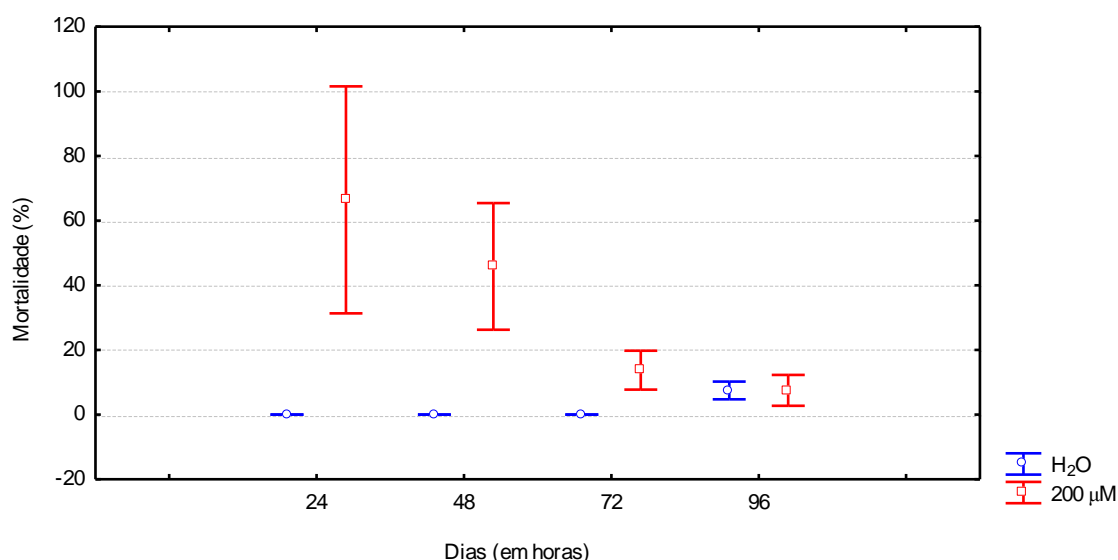
n = número total de larvas expostas.



**Figura 59.** Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica em 24 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 200  $\mu$ M. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 79.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com o composto C7 na concentração de 200  $\mu$ M. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	5,2736979	0,004536*
	Concentração	42,90895758	0,000000*
	Tempo X Concentração	7,154626779	0,000827*



**Figura 60.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente ao bioensaio de efetividade realizado com o composto C7 na concentração de 200  $\mu$ M.

**Tabela 80.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 30  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 238)		30 $\mu\text{M}$ (n= 240)	
	Mortalidade larval (%)	Formação de pupas (%)	Mortalidade larval (%)	Formação de pupas (%)
24 h	0,4	0,0	4,2	0,0
42 h	2,9	0,0	47,5	0,0
72 h	5,0	0,4	70,8	0,0
96 h	6,7	37,0	84,2	0,0
120 h	7,6	66,8	92,9	0,4
144 h	8,8	73,9	97,5	0,4
168 h	8,8	74,4	99,6	0,4
<b>TOTAL</b>	<b>8,8</b>	<b>74,4</b>	<b>99,6</b>	<b>0,4</b>

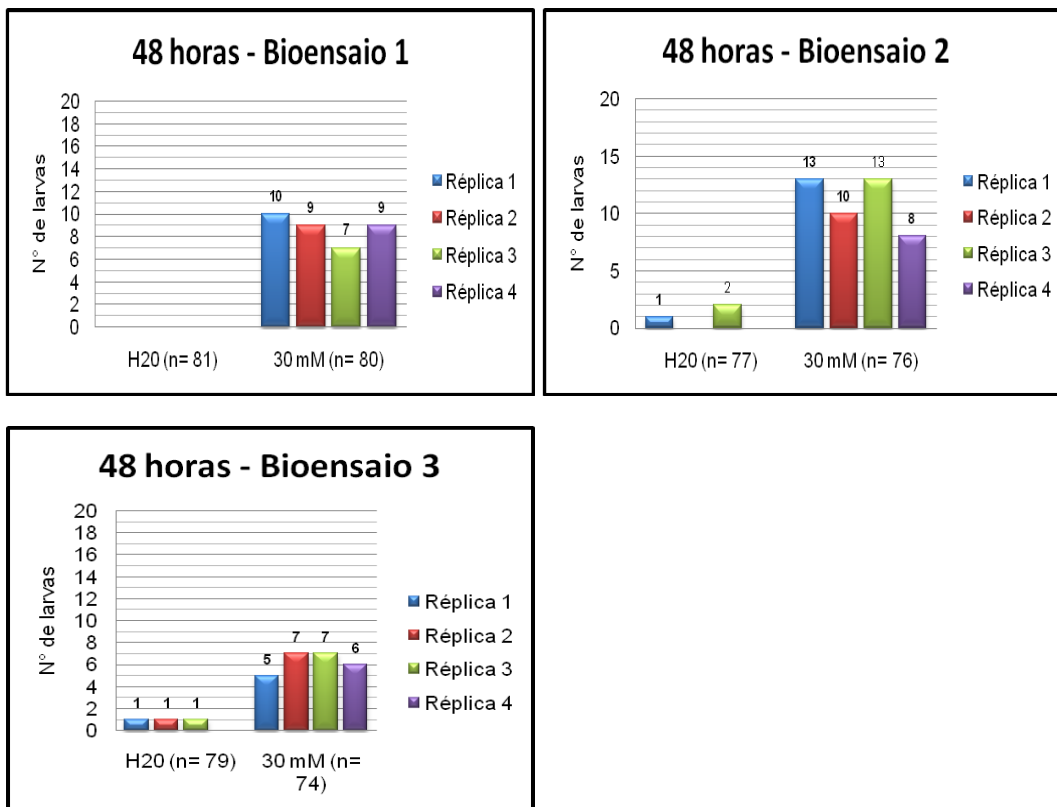
n = número total de larvas expostas.

**Tabela 81.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 30  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (168 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 238)	73,1	1,3	16,8
30 $\mu\text{M}$ (n= 240)	0,0	0,4	0,0

n = número total de larvas expostas.

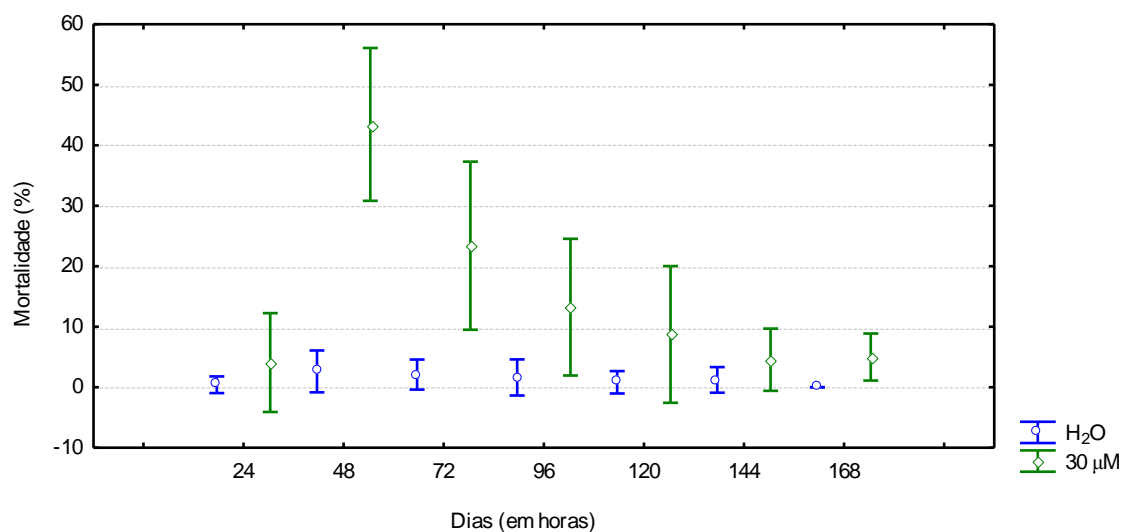




**Figura 61.** Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica, em 48 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 30  $\mu$ M. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 82.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com o composto C7 na concentração de 30 mM. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	19,97209402	0,000000*
	Concentração	117,9253893	0,000000*
	Tempo X Concentração	16,21729031	0,000000*



**Figura 62.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios realizados com os compostos C7 na concentração de 30 µM.

**Tabela 83.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 20 µM, sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

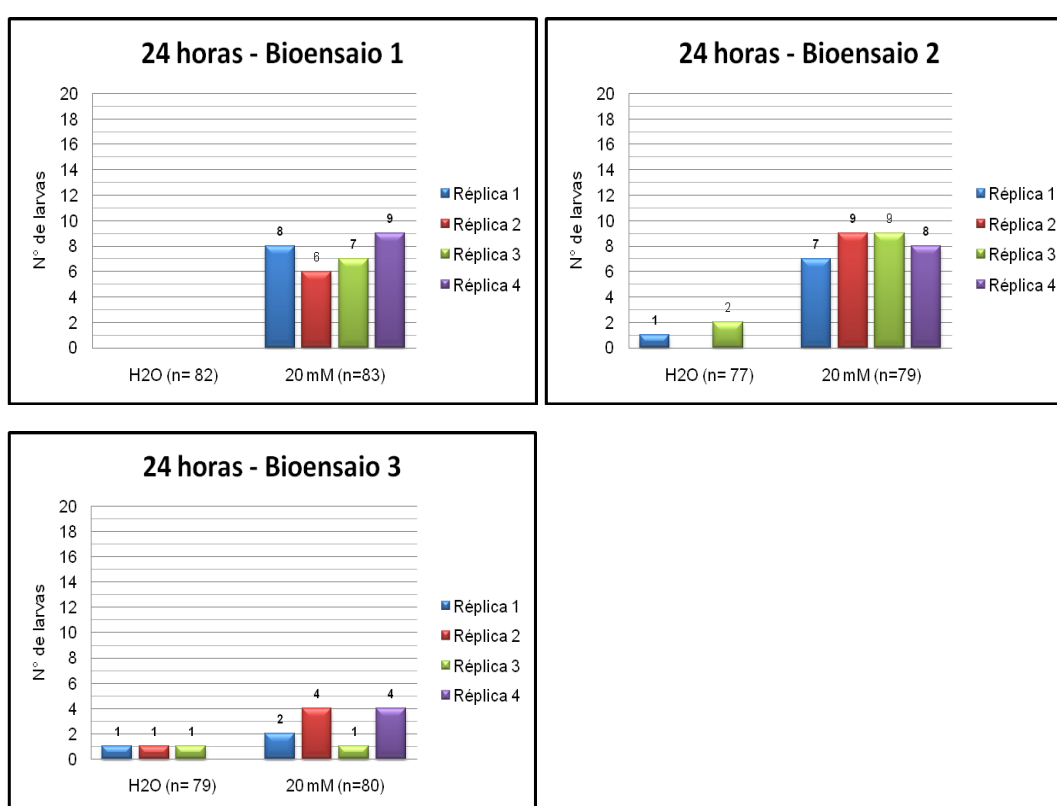
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 238)		20 µM (n=242)	
	Mortalidade larval (%)	Formação de pupas (%)	Mortalidade larval (%)	Formação de pupas (%)
24 h	0,4	0,0	11,6	0,0
42 h	2,9	0,0	42,1	0,0
72 h	5,0	0,4	67,4	0,0
96 h	6,7	37,0	79,8	0,0
120 h	7,6	66,8	85,1	0,0
144 h	8,8	73,9	90,1	0,4
168 h	9,2	76,9	92,1	0,8
192 h	14,7	80,3	92,6	0,8
216 h	14,7	85,3	93,0	0,8
<b>TOTAL</b>	<b>14,7</b>	<b>85,3</b>	<b>93</b>	<b>0,8</b>

n = número total de larvas expostas.

**Tabela 84.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 20  $\mu$ M, sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 216 horas (nove dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (216 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 238)	84,0	1,3	0,0
20 $\mu$ M (n=242)	0,4	0,4	6,2

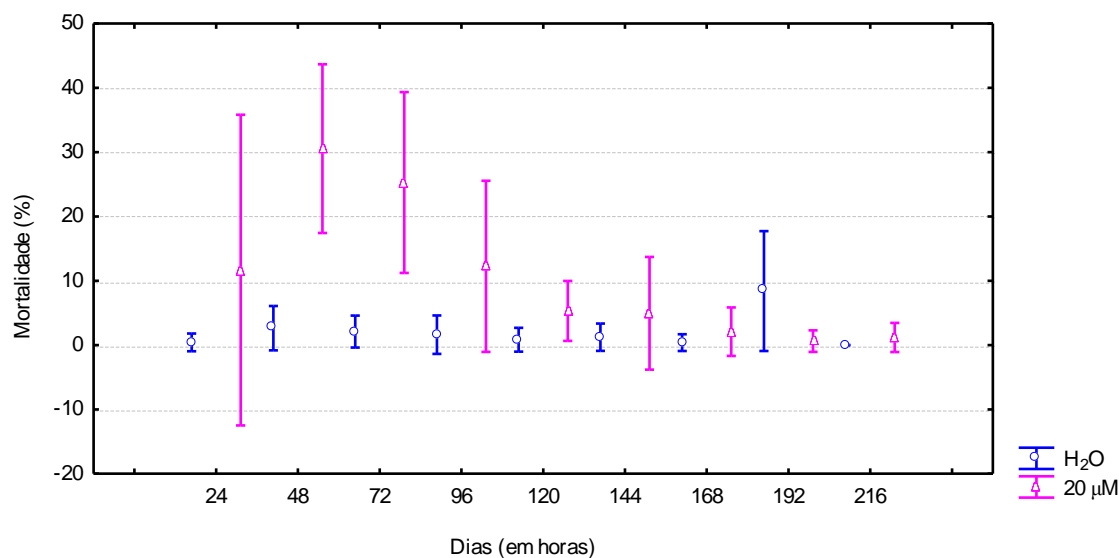
n = número total de larvas expostas.



**Figura 63.** Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica em 24 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 20  $\mu$ M. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 85.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com o composto C7 na concentração de 20  $\mu$ M. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	6,991900393	0,000000*
	Concentração	48,62656422	0,000000*
	Tempo X Concentração	6,956966268	0,000000*



**Figura 64.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 20 µM.

**Tabela 86.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 18 µM, sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 240 horas (dez dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

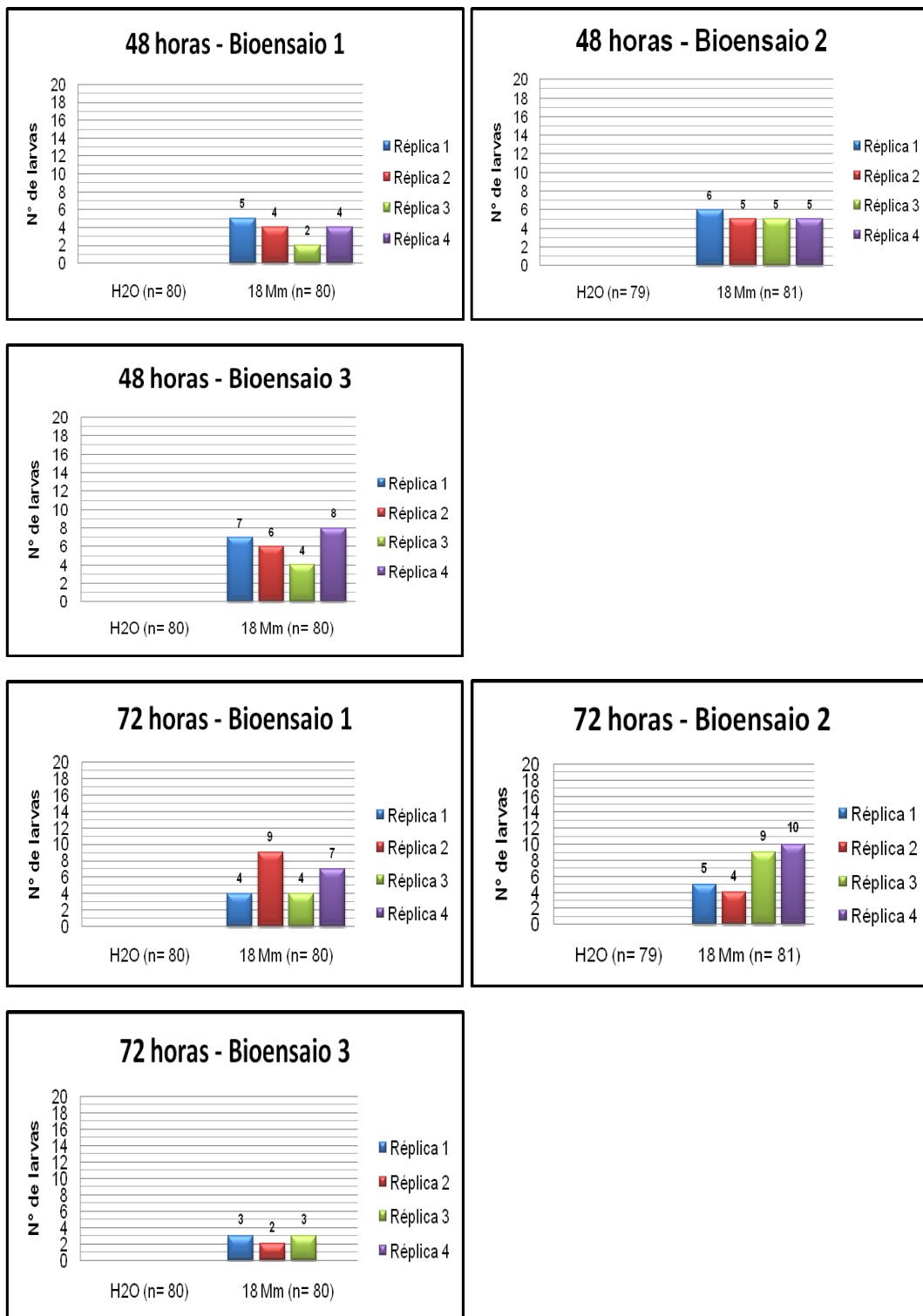
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 239)		18 µM (n= 241)	
	Mortalidade larval (%)	Formação de pupas (%)	Mortalidade larval (%)	Formação de pupas (%)
24 h	0,0	0,0	18,3	0,0
42 h	0,0	1,3	43,6	0,8
72 h	0,0	9,6	68,5	0,8
96 h	2,9	49,8	78,4	0,8
120 h	3,8	76,6	82,6	0,8
144 h	5,0	85,8	85,5	0,8
168 h	5,9	87,4	87,1	1,7
192 h	6,3	89,1	90,0	2,1
216 h	6,7	92,9	90,5	2,5
240 h	6,7	93,3	90,5	2,5
<b>TOTAL</b>	<b>6,7</b>	<b>93,3</b>	<b>90,5</b>	<b>2,5</b>

n = número total de larvas expostas.

**Tabela 87.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 18  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 240 horas (dez dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (240 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 239)	90,8	2,5	0,0
18 $\mu\text{M}$ (n= 241)	1,7	0,8	7,1

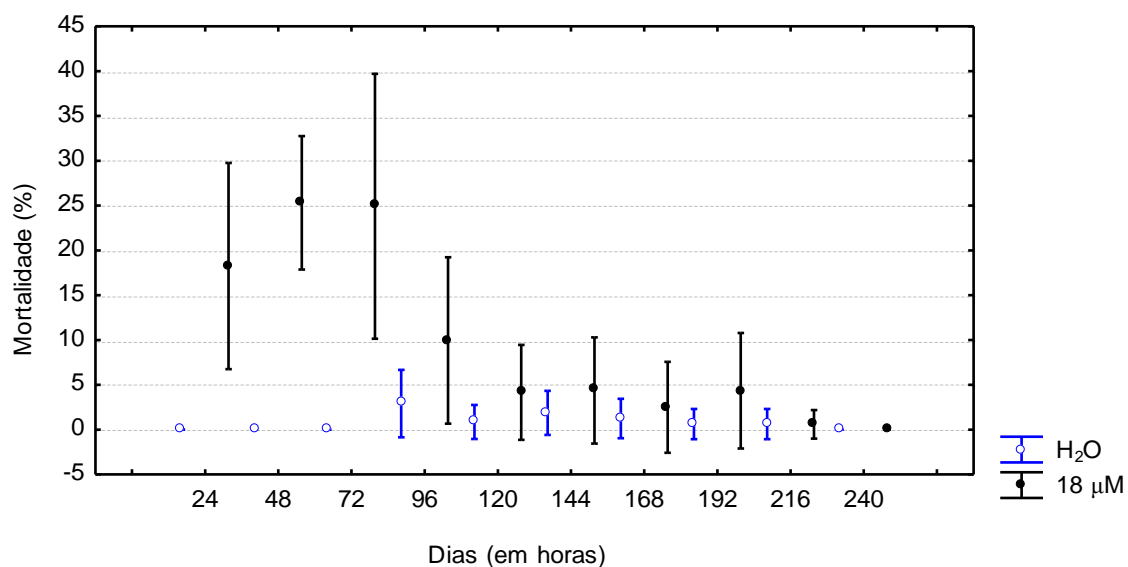
n = número total de larvas expostas.



**Figura 65.** Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica em 48 e 72 horas, horários nos quais ocorreram maiores mortalidades, referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 18  $\mu$ M. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 88.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com o composto C7 na concentração de 18  $\mu\text{M}$ . Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	10,06805886	0,000000*
	Concentração	120,8062881	0,000000*
	Tempo X Concentração	12,11285504	0,000000*



**Figura 66.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 18  $\mu\text{M}$ .

**Tabela 89.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 15  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 240 horas (dez dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 238)		15 $\mu\text{M}$ (n= 243)	
	Mortalidade larval (%)	Formação de pupas (%)	Mortalidade larval (%)	Formação de pupas (%)
24 h	0,0	0,0	8,6	0,0
42 h	1,7	3,8	27,6	0,0
72 h	2,1	5,9	47,3	0,0
96 h	6,3	61,3	59,3	0,0
120 h	6,3	71,8	72,4	0,0
144 h	7,6	79,8	80,7	0,0
168 h	8,4	81,1	86,8	0,4
192 h	8,8	83,6	89,3	0,4
216 h	9,2	87,0	89,3	2,1
240 h	9,2	90,8	89,3	2,5
<b>TOTAL</b>	<b>9,2</b>	<b>90,8</b>	<b>89,3</b>	<b>2,5</b>

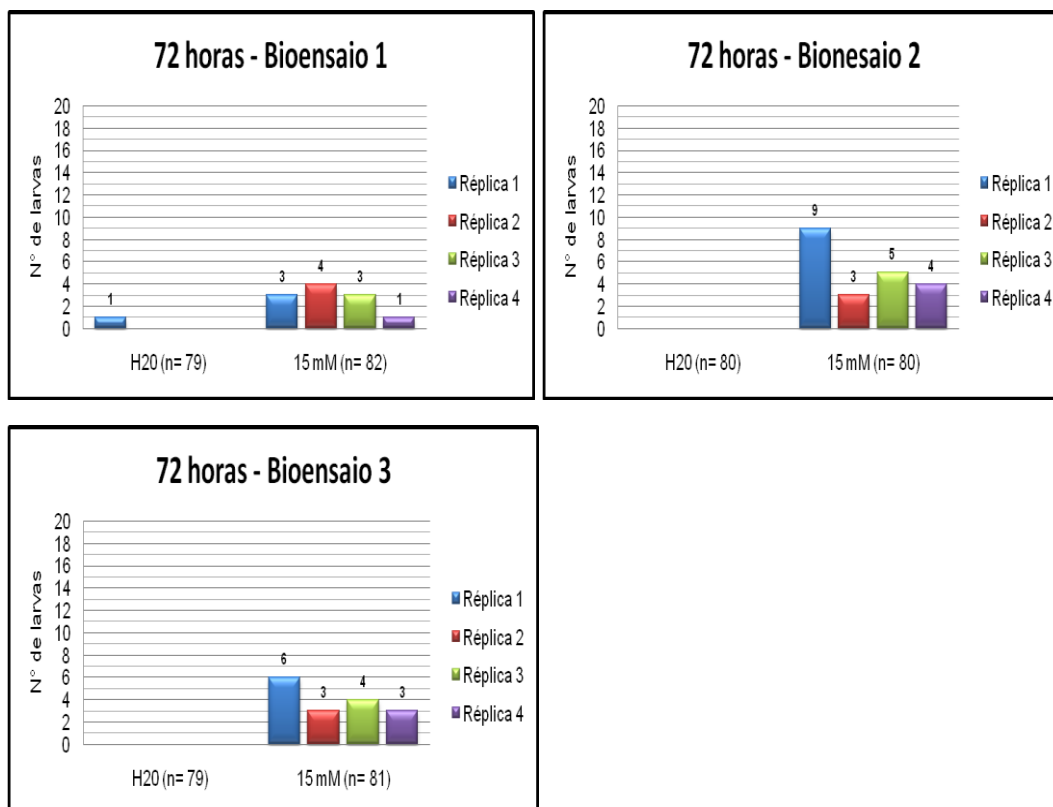
n = número total de larvas expostas.

**Tabela 90.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 15  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 240 horas (dez dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (240 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 238)	85,7	5,0	0,0
15 $\mu\text{M}$ (n= 243)	1,2	1,2	8,6

n = número total de larvas expostas.

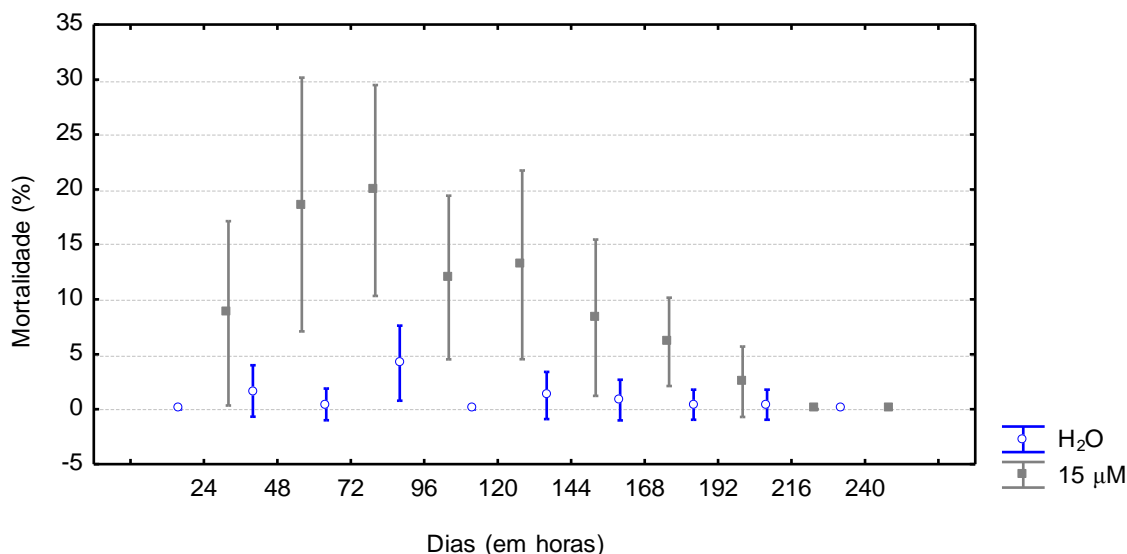




**Figura 67.** Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica em 72 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 15  $\mu$ M. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 91.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com o composto C7 na concentração de 15  $\mu$ M. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	10,44857316	0,00000*
	Concentração	130,1187778	0,00000*
	Tempo X Concentração	8,585188871	0,00000*



**Figura 68.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 15 µM.

**Tabela 92.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 13 µM, sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 240 horas (dez dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

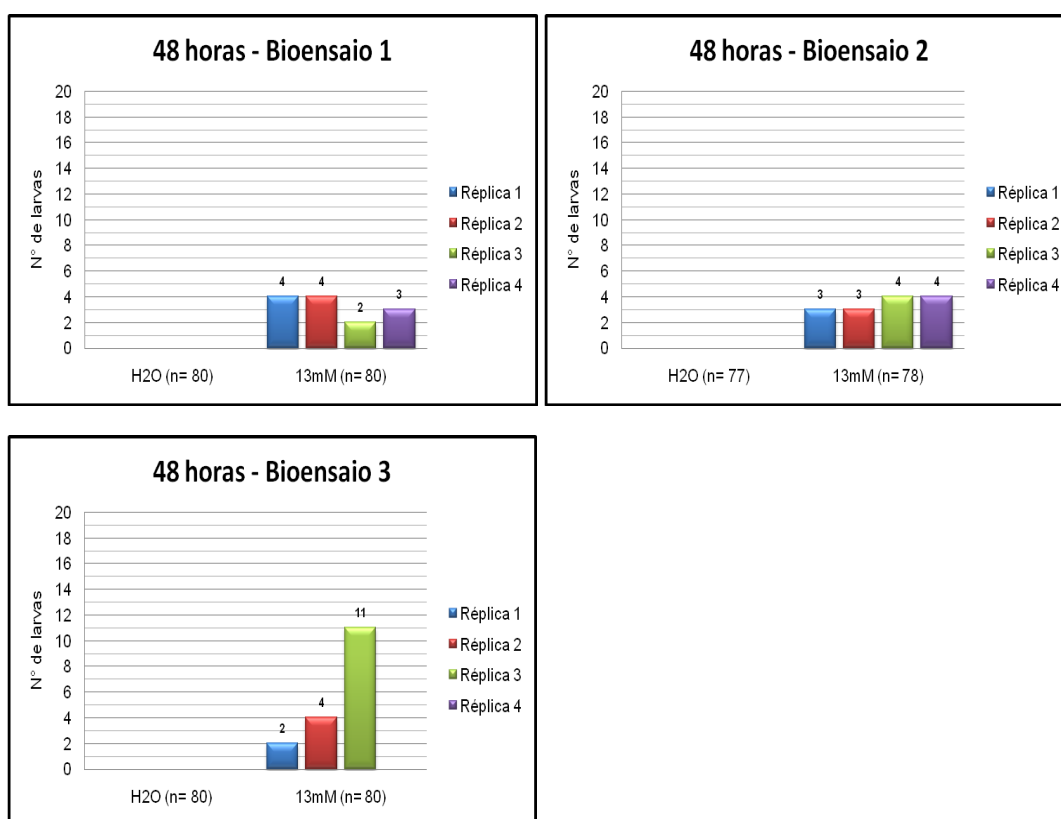
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 239)		13 µM (n= 238)	
	Mortalidade larval (%)	Formação de pupas (%)	Mortalidade larval (%)	Formação de pupas (%)
24 h	0,0	0,0	16,4	0,0
42 h	0,0	1,3	34,9	0,8
72 h	0,0	9,6	48,7	1,3
96 h	2,9	49,8	62,2	1,7
120 h	3,8	76,6	65,5	2,9
144 h	5,0	85,8	68,1	4,2
168 h	5,9	87,4	71,8	6,7
192 h	6,3	89,1	77,7	7,1
216 h	6,7	92,9	78,6	7,6
240 h	6,7	93,3	78,6	7,6
<b>TOTAL</b>	<b>6,7</b>	<b>93,3</b>	<b>78,6</b>	<b>7,6</b>

n = número total de larvas expostas.

**Tabela 93.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término do bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 13  $\mu$ M, sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 240 horas (dez dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (240 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 239)	90,8	2,5	0,0
13 $\mu$ M (n= 238)	5,0	2,5	13,8

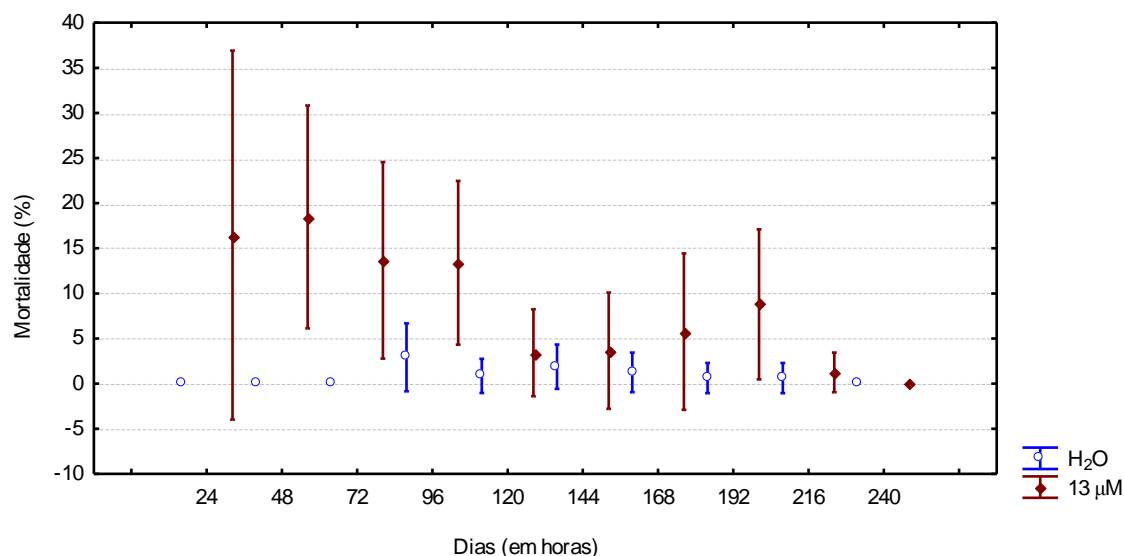
n = número total de larvas expostas.



**Figura 69.** Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica em 48 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 13  $\mu$ M. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 94.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com o composto C7 na concentração de 13  $\mu$ M. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	2,919953781	0,003033*
	Concentração	57,63017948	0,000000*
	Tempo X Concentração	3,318659252	0,000921*



**Figura 70.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 13 µM.

**Tabela 95.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 10 µM, sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

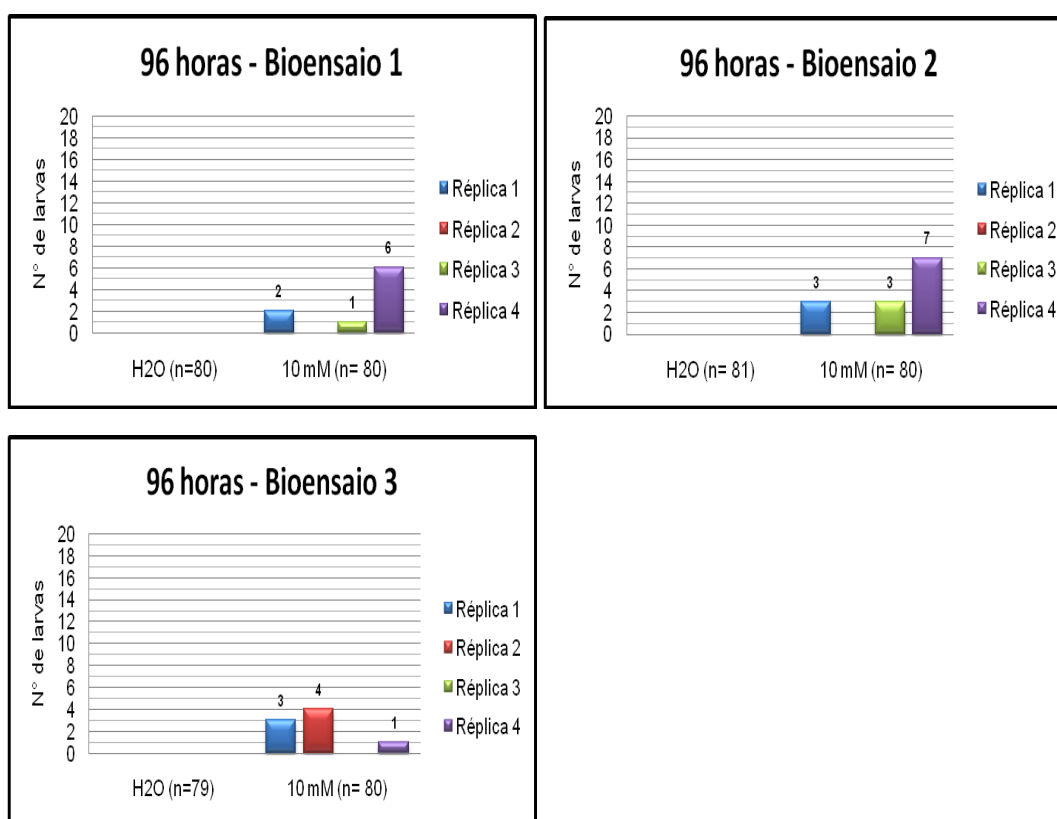
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 240)		10 µM (n= 220)	
	Mortalidade larval (%)	Formação de pupas (%)	Mortalidade larval (%)	Formação de pupas (%)
24 h	0,0	0,0	8,2	0,0
42 h	1,3	3,3	18,6	0,5
72 h	2,9	4,2	26,4	0,9
96 h	2,9	50,8	40,0	1,4
120 h	3,3	72,5	50,0	4,5
144 h	4,2	75,4	56,4	5,9
168 h	4,2	77,1	65,9	7,7
192 h	4,2	80,4	70,5	10,5
216 h	4,6	85,0	71,4	11,8
240 h	5,8	91,7	72,3	16,4
264 h	6,3	91,7	72,3	16,4
288 h	7,5	92,5	72,7	16,8
<b>TOTAL</b>	<b>7,5</b>	<b>92,5</b>	<b>72,7</b>	<b>16,8</b>

n = número total de larvas expostas.

**Tabela 96.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 10  $\mu$ M, sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (288 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 240)	88,8	3,8	0,0
10 $\mu$ M (n= 220)	10,9	5,9	10,4

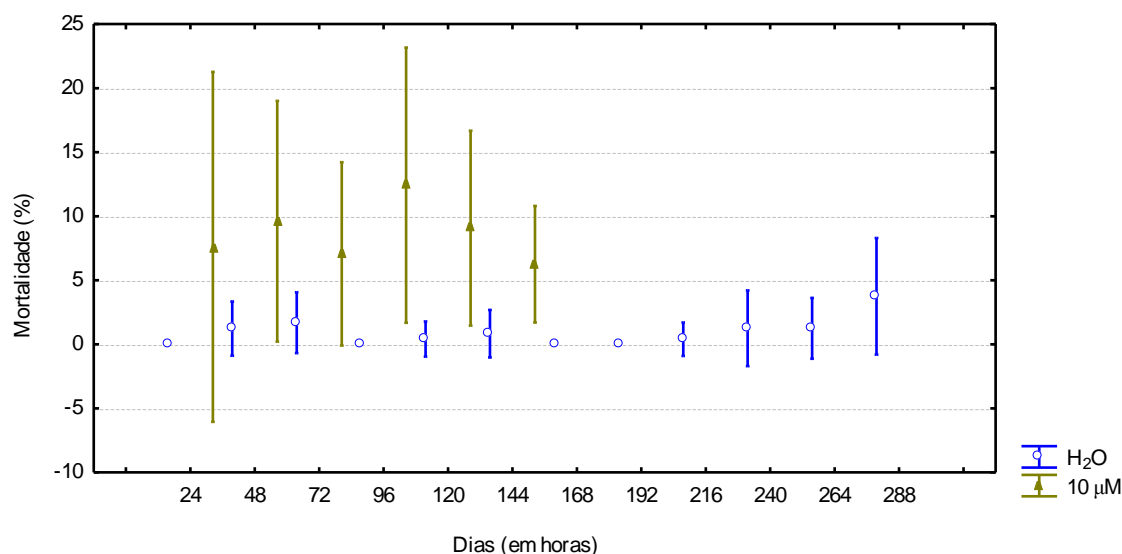
n = número total de larvas expostas.



**Figura 71.** Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica em 96 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 10  $\mu$ M. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 97.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com o composto C7 na concentração de 10  $\mu$ M. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	2,240236077	0,013301*
	Concentração	59,79299574	0,000000*
	Tempo X Concentração	3,001424415	0,000932*



**Figura 72.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 10 µM.

**Tabela 98.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 5 µM, sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

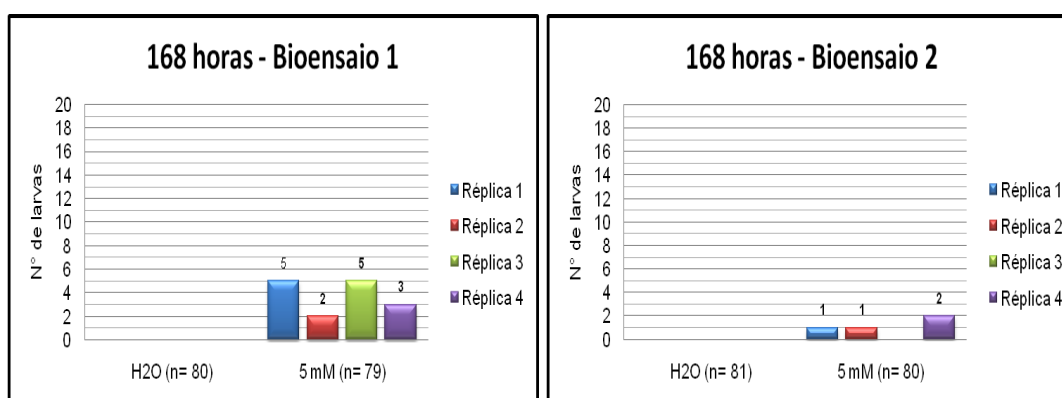
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 240)		5 µM (n= 238)	
	Mortalidade larval (%)	Formação de pupas (%)	Mortalidade larval (%)	Formação de pupas (%)
24 h	0,0	0,0	2,3	0,0
42 h	1,3	3,3	4,6	1,8
72 h	2,9	4,2	6,5	4,1
96 h	2,9	50,8	10,1	18,9
120 h	3,3	72,5	14,3	35,5
144 h	4,2	75,4	19,8	43,3
168 h	4,2	77,1	28,6	46,1
192 h	4,2	80,4	30,0	49,3
216 h	4,6	85,0	30,9	53,0
240 h	5,8	91,7	31,8	60,8
264 h	6,3	91,7	31,8	63,1
288 h	7,5	92,5	31,8	63,1
<b>TOTAL</b>	<b>7,5</b>	<b>92,5</b>	<b>31,8</b>	<b>63,1</b>

n = número total de larvas expostas.

**Tabela 99.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (288 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 240)	88,8	3,8	0,0
5 $\mu\text{M}$ (n= 238)	58,1	5,1	5,1

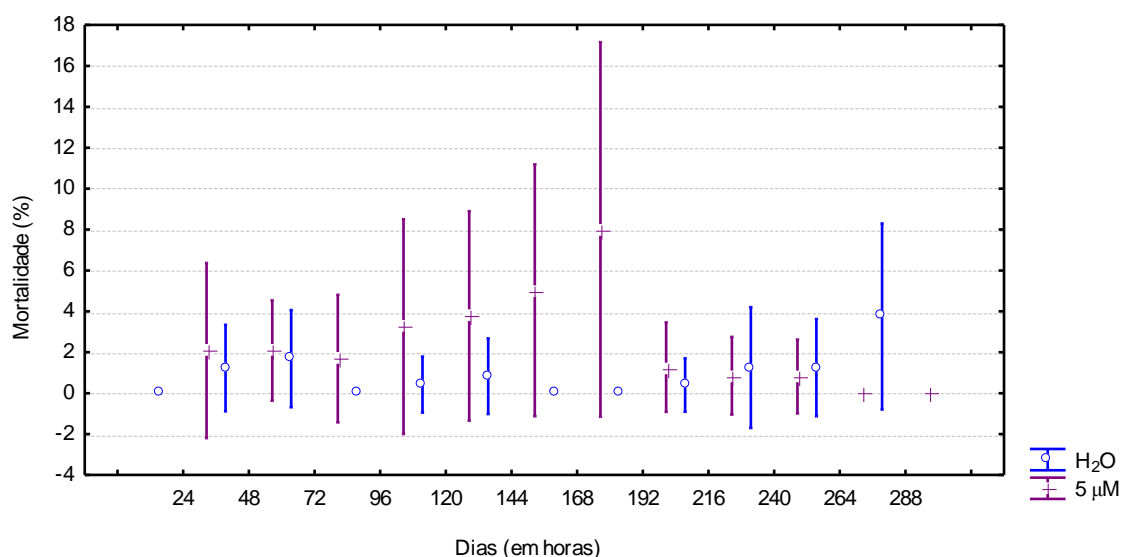
n = número total de larvas expostas.



**Figura 73.** Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica, em 168 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 5  $\mu\text{M}$ . Não houve mortalidade larval em 168 horas no terceiro bioensaio. (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 100.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com o composto C7 na concentração de 5  $\mu\text{M}$ . Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	1,723540524	0,069190*
	Concentração	19,26386014	0,000017*
	Tempo X Concentração	2,984008366	0,000992*



**Figura 74.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios de efetividade realizados com os compostos C7 na concentração de 5 µM.

**Tabela 101.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 1 µM, sobre imaturos de *Ae. aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 240)		1 µM (n= 240)	
	Mortalidade larval (%)	Formação de pupas (%)	Mortalidade larval (%)	Formação de pupas (%)
24 h	0,0	0,0	0,0	0,0
42 h	1,3	3,3	0,4	2,5
72 h	2,9	4,2	1,7	6,7
96 h	2,9	50,8	2,1	42,9
120 h	3,3	72,5	2,5	77,1
144 h	4,2	75,4	3,8	80,8
168 h	4,2	77,1	4,6	82,1
192 h	4,2	80,4	5,8	82,9
216 h	4,6	85,0	5,8	86,3
240 h	5,8	91,7	7,5	90
264 h	6,3	91,7	8,3	90,4
288 h	7,5	92,5	8,8	90,8
<b>TOTAL</b>	<b>7,5</b>	<b>92,5</b>	<b>8,8</b>	<b>90,8</b>

n = número total de larvas expostas.



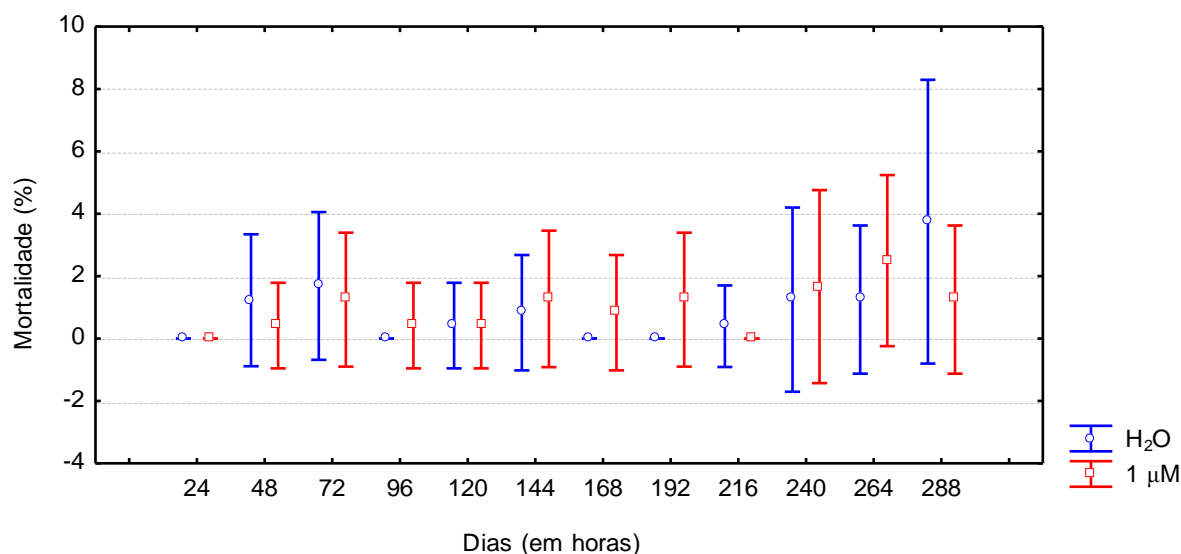
**Tabela 102.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 1 mM, sobre imaturos de *Ae. aegypti* a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 288 horas (doze dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (288 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 240)	88,8	3,8	0,0
1 $\mu\text{M}$ (n= 240)	89,2	1,7	0,4

n = número total de larvas expostas.

**Tabela 103.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com o composto C7 na concentração de 1  $\mu\text{M}$ . Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	2,372882943	0,008497*
	Concentração	0,257256969	0,612492723
	Tempo X Concentração	0,938340076	0,504240548



**Figura 75.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 1  $\mu\text{M}$ .

Por fim, os bioensaios de efetividade com composto C7 sobre populações de *Ae. aegypti* provenientes de Foz do Iguaçu apresentou mortalidade de 78,6% na concentração de 40  $\mu\text{M}$  sob condições controladas ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ , umidade  $70\% \pm 10$  e fotoperíodo 12:12). Ainda sim, observou-se 0,41% de emergência de adultos para tal concentração. Já para a subunidade 3,

a mortalidade larval foi de 100 % para a concentração de 30  $\mu\text{M}$  e 97,5% para a concentração de 20  $\mu\text{M}$ . (Tabelas 104, 105, 107, 108, 110 e 111 e Figuras 76, 78, 80).

A análise estatística dos dados obtidos através de bioensaio de efetividade com composto C7 sobre populações de *Aedes aegypti* da colônia de Foz do Iguaçu mostrou que as variáveis tempo e concentração, assim como a interação entre elas, são estatisticamente significativas em relação à variável porcentagem de mortalidade larval ( $p < 0,05$ ). As médias do percentual de mortalidade observada nos grupos referentes ao composto C7 na concentração de 40  $\mu\text{M}$  em 120 horas e subunidade 3 nas concentrações de 30 e 20  $\mu\text{M}$  em 24 horas mostraram-se maiores e diferentes das médias dos demais grupos analisados, respectivamente para cada concentração, ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. Pelo teste de Dunnet, os grupos referentes ao composto C7 na concentração de 40  $\mu\text{M}$  a 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas, subunidade 3 nas concentrações de 20 e 30  $\mu\text{M}$  em 24 e 48 horas diferiram-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle água. Não ocorreram diferenças significativas para os demais grupos analisados (Tabelas 106, 109 e 112 e Figuras 77, 79 e 81).

**Tabela 104.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 40  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu (F3), com duração total de 192 horas (oito dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^\circ\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

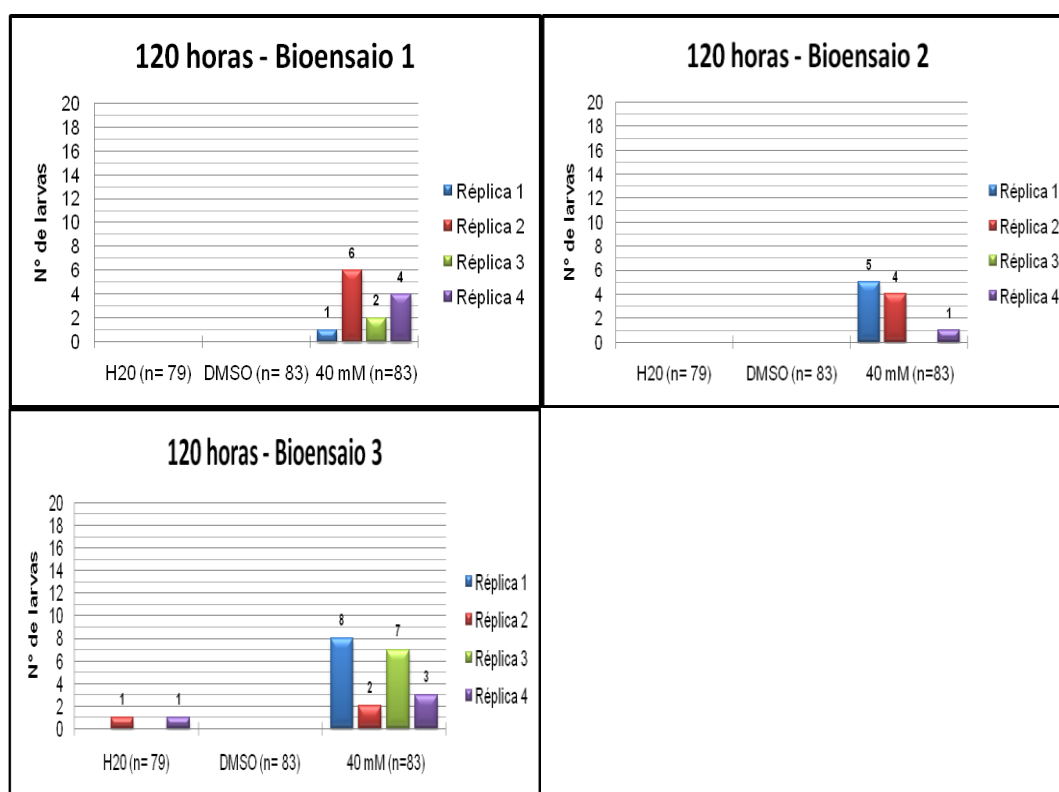
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (= 238)		CONTROLE DMSO (n= 243)		40 $\mu\text{M}$ (n= 243)	
	Mortalidade larval (%)	Formação de pupa (%)	Mortalidade larval (%)	Formação de pupa (%)	Mortalidade larval (%)	Formação de pupa (%)
24 h	0,0	0,0	0,0	0,0	5,3	0,0
42 h	0,0	7,1	2,1	4,9	17,3	0,8
72 h	0,0	27,7	3,7	17,7	30,5	0,8
96 h	1,7	76,5	8,6	61,7	43,6	0,8
120 h	2,5	88,2	8,6	77,8	61,3	0,8
144 h	2,5	92,0	8,6	81,1	71,2	0,8
168 h	2,5	92,9	8,6	84,4	77,4	0,8
192 h	2,5	97,5	8,6	85,2	78,6	0,8
<b>TOTAL</b>	<b>2,5</b>	<b>97,5</b>	<b>8,6</b>	<b>85,2</b>	<b>78,6</b>	<b>0,8</b>

n = número total de larvas expostas.

**Tabela 105.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 40  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu, a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 192 horas (oito dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (192 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (= 238)	97,5	1,7	0,0
DMSO (n= 243)	85,2	1,6	6,2
40 $\mu\text{M}$ (n= 243)	0,4	0,4	20,6

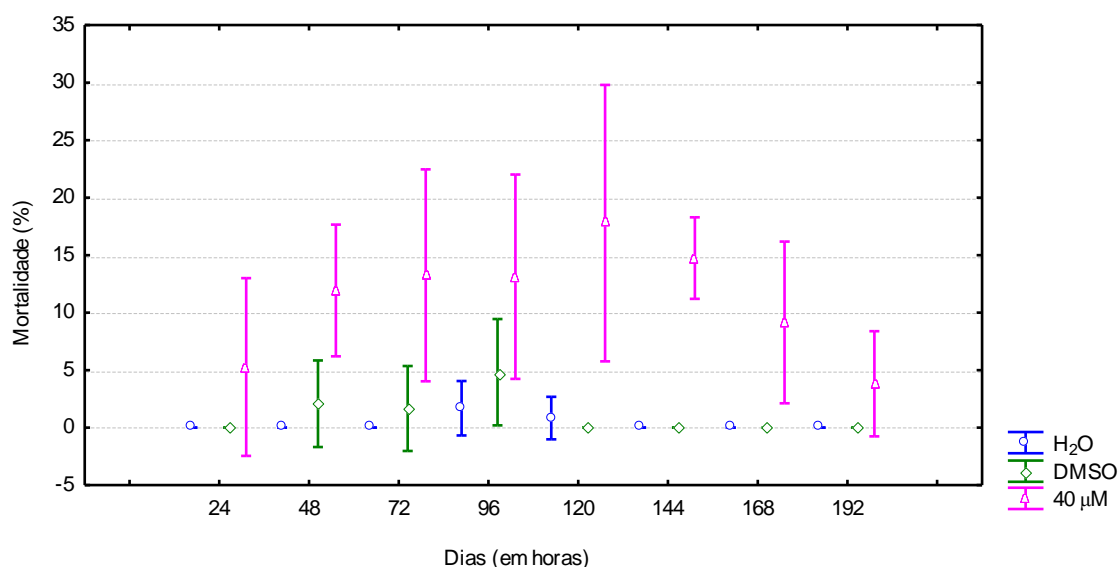
n = número total de larvas expostas.



**Figura 76.** Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica, em 120 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu, na concentração de 40  $\mu\text{M}$ . (n) = número total de larvas expostas por produto.

**Tabela 106.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com o composto C7 na concentração de 40  $\mu\text{M}$  sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu. Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	3,5894	0,001121*
	Concentração	113,0186	0,000000*
	Tempo X Concentração	2,3005	0,005836*



**Figura 77.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios de efetividade realizados com o composto C7 na concentração de 40  $\mu\text{M}$  sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu.

**Tabela 107.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida da subunidade 3 (SB3), na concentração de 30  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu (F3), com duração total de 144 horas (seis dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

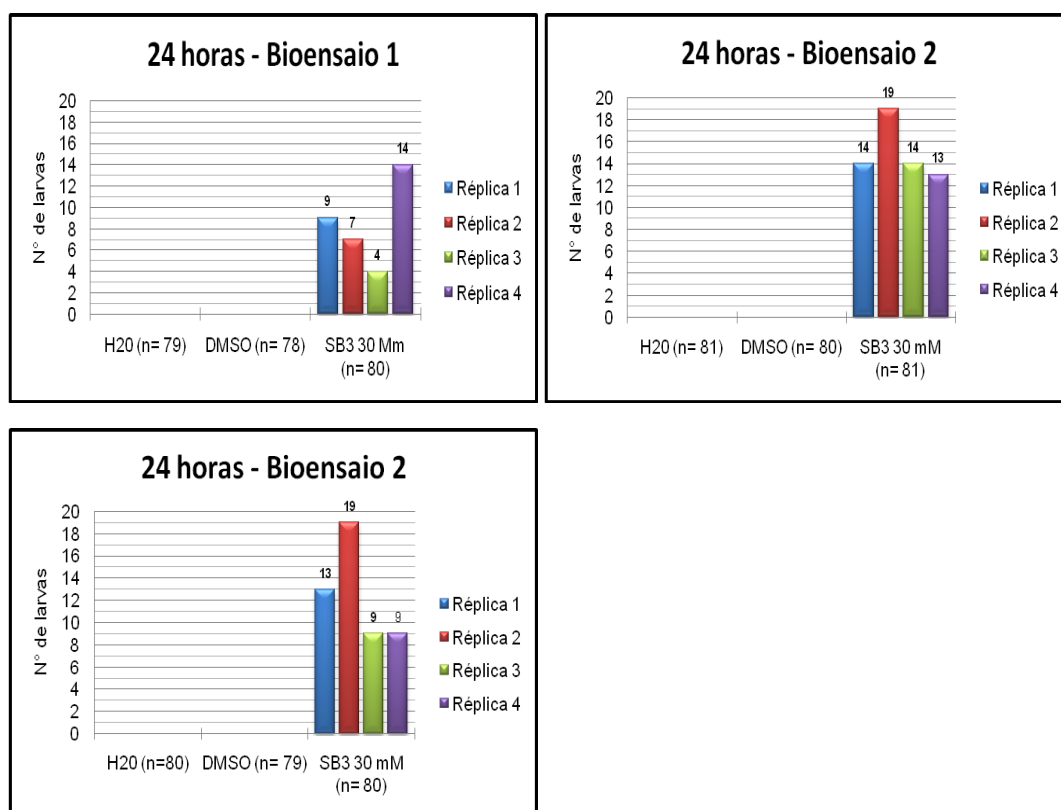
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 240)		CONTROLE DMSO (n= 237)		SB3 - 30 $\mu\text{M}$ (n= 242)	
	Mortalidade larval (%)	Formação de pupa (%)	Mortalidade larval (%)	Formação de pupa (%)	Mortalidade larval (%)	Formação de pupa (%)
24 h	0,0	0,0	0,0	0,0	59,5	0,0
42 h	0,4	9,2	1,3	5,5	89,3	0,0
72 h	4,2	22,1	2,1	21,5	97,1	0,0
96 h	4,6	65,0	3,4	57,0	98,3	0,0
120 h	4,6	67,5	4,2	64,1	99,6	0,0
144 h	4,6	67,5	4,6	64,1	100,0	0,0
<b>TOTAL</b>	<b>4,6</b>	<b>67,5</b>	<b>4,6</b>	<b>64,1</b>	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>

SB3 = subunidade 3; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 108.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida da subunidade 3 (SB3), na concentração de 30  $\mu$ M, sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu, a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 144 horas (seis dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (144 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 240)	66,7	0,8	27,9
DMSO (n= 237)	61,6	2,5	31,2
SB3 - 30 $\mu$ M (n= 242)	0,0	0,0	0,0

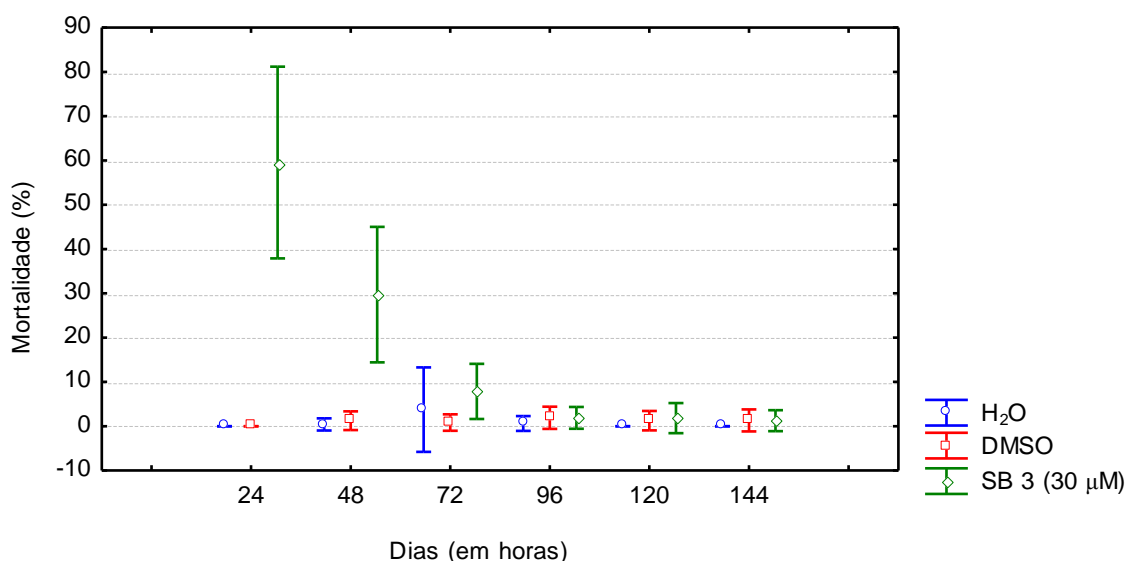
SB3 = subunidade 3; n = número total de larvas expostas.



**Figura 78.** Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica em 24 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente aos bioensaios de efetividade realizados com a subunidade 3 (SB3) sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu, na concentração de 30  $\mu$ M. (n) = número total de larvas expostas por produto

**Tabela 109.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade com a subunidade 3 (SB3) sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu, na concentração de 30  $\mu\text{M}$ . Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	24,4753	0,00*
	Concentração	110,9767	0,00*
	Tempo X Concentração	28,1231	0,00*



**Figura 79.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios de efetividade com a subunidade 3 (SB3) na concentração de 30  $\mu\text{M}$  sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu.

**Tabela 110.** Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida da subunidade 3 (SB3), na concentração de 20  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu (F3), com duração total de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

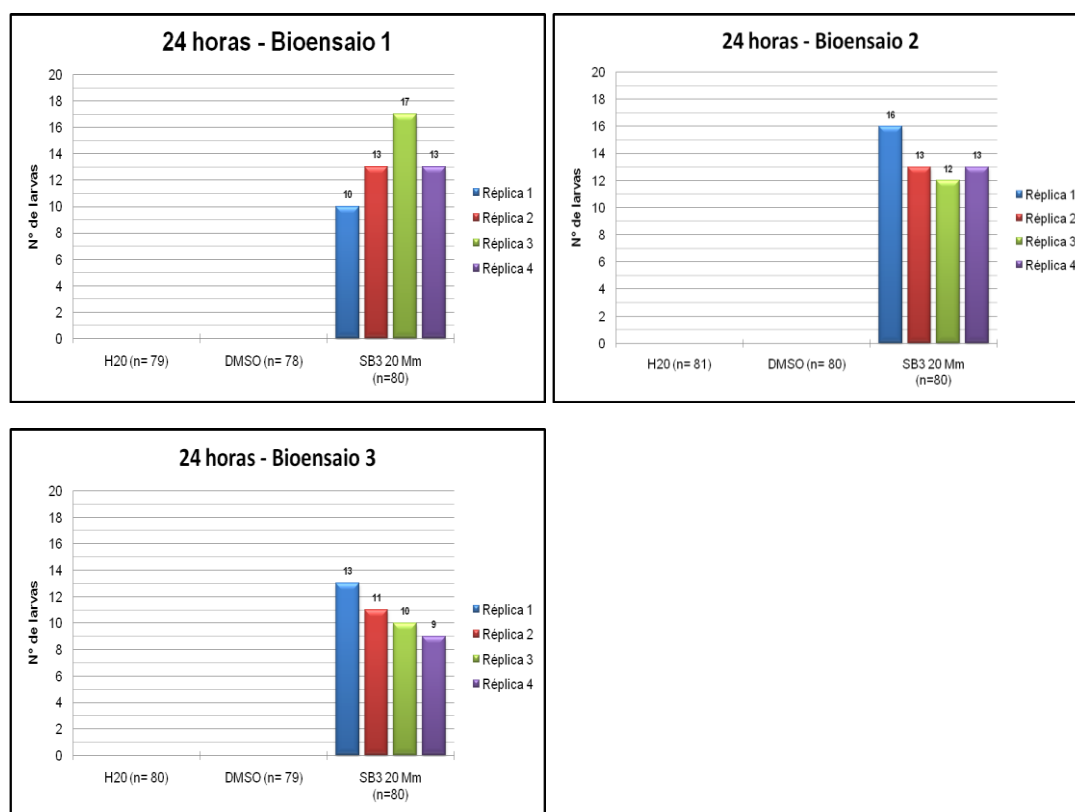
HORAS	CONTROLE H <sub>2</sub> O (n= 240)		CONTROLE DMSO (n= 237)		SB3 – 20 $\mu\text{M}$ (n= 240)	
	Mortalidade larval (%)	Formação de pupa (%)	Mortalidade larval (%)	Formação de pupa (%)	Mortalidade larval (%)	Formação de pupa (%)
24 h	0,0	0,0	0,0	0,0	62,5	0,0
42 h	0,4	9,2	1,3	5,5	87,5	0,0
72 h	4,2	22,1	2,1	21,5	92,1	0,0
96 h	6,3	86,3	5,9	74,3	95,4	0,0
120 h	6,3	92,1	6,8	87,3	96,3	0,0
144 h	6,3	92,9	7,2	88,2	97,1	0,0
168 h	6,7	93,3	7,6	88,2	97,5	0,0
<b>TOTAL</b>	<b>6,7</b>	<b>93,3</b>	<b>7,6</b>	<b>88,2</b>	<b>97,5</b>	<b>0,0</b>

SB3 = subunidade 3; n = número total de larvas expostas.

**Tabela 111.** Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida da subunidade 3 (SB3), na concentração de 20  $\mu\text{M}$ , sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu, a partir das pupas formadas durante o mesmo procedimento, com duração total de 168 horas (sete dias), mantido sob condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

COMPOSTO	Término do bioensaio (168 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O (n= 240)	92,1	1,3	0,0
DMSO (n= 237)	86,5	1,7	4,2
SB3 - 20 $\mu\text{M}$ (n= 240)	0,0	0,0	2,5

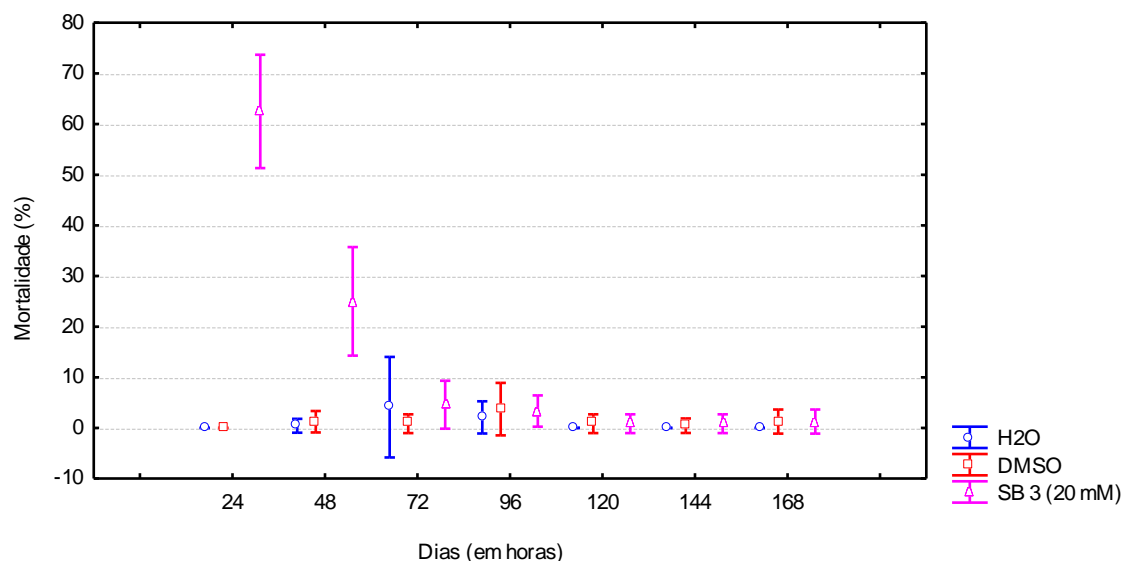
SB3 = subunidade 3; n = número total de larvas expostas.



**Figura 80.** Porcentagem de mortalidade larval por concentração e por réplica em 24 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente aos bioensaios de efetividade realizados com a subunidade 3 (SB3) sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu, na concentração de 20  $\mu\text{M}$ . (n) = número total de larvas expostas por produto

**Tabela 112.** Análise estatística dos dados referente aos bioensaios de efetividade subunidade 3 (SB3) sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu, na concentração de 20  $\mu\text{M}$ . Os valores de p que aparecem com asterisco apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Variável dependente	Fonte de variação	F	p
% mortalidade	Tempo	75,4827	0,00*
	Concentração	206,9400	0,00*
	Tempo X Concentração	85,4069	0,00*



**Figura 81.** Média e desvio padrão dos valores de mortalidade larval observada por dia (em horas) referente aos bioensaios de efetividade com a subunidade 3 (SB3) na concentração de 20  $\mu$ M sobre imaturos de *Ae. aegypti* da população de Foz do Iguaçu.

#### 4.4 AVALIAÇÃO E MONITORAMENTO DOS ANIMAIS DURANTE E APÓS O PROCEDIMENTO DE REPASTO SANGUÍNEO

Após a administração dos fármacos, as médias do período de latência variaram de um minuto e meio a dois minutos e cinquenta e dois segundos, sendo que apenas o protocolo P3 apresentou média maior e diferente dos demais grupos analisados ( $p < 0,05$ ). Já as médias observadas para o período de recuperação variaram de 92,5 a 205 minutos, a maior média foi observada para o protocolo P4 em comparação aos demais grupos avaliados ( $p < 0,05$ ) (Tabela 113).

Observou-se comportamento semelhante quanto à frequência cardíaca (FC) entre os grupos, ao longo de todo o período, verificando queda após administração das drogas e seguido por estabilidade dos valores do parâmetro avaliado, a exceção do protocolo P3, onde a FC se manteve estável em todos os momentos. As médias dos valores de FC apresentaram-se diferentes entre os protocolos nos momentos 0 minuto para os protocolos P1 e P4, em 20 minutos para o protocolo P1 em relação ao demais e em 40 minutos para os protocolos



P1 e P3. Não existiram diferenças estatísticas para os demais grupos analisados (Figura 82).

Quanto à frequência respiratória (FR), observou-se também um comportamento semelhante dos grupos, ao longo de todo o período, com queda da FR após administração das drogas, seguido, também, por estabilidade dos valores do parâmetro avaliado, a exceção do protocolo P2, que manteve a FR estável em todos os momentos. As médias dos valores de FR apresentaram-se diferentes entre os protocolos no momento 0 minuto para os protocolos P1 e P4, em 40 minutos para os protocolos P1 e P3, em 60 minutos para os protocolos P3 e P4 e em 120 minutos para os protocolos P1 e P4, ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. Não existiram diferenças estatísticas para os demais grupos analisados (Figura 83).

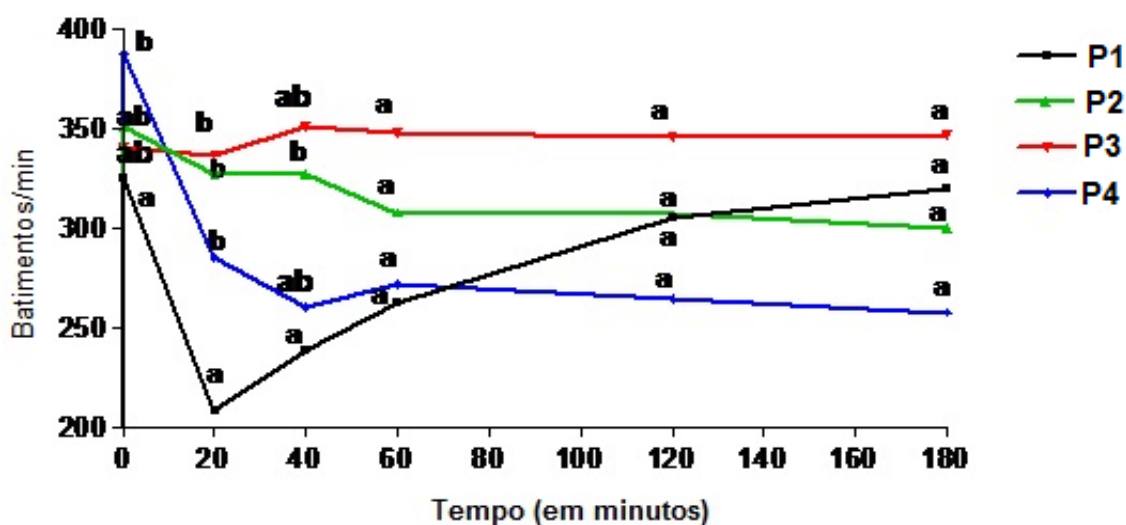
As médias dos valores de temperatura retal apresentaram-se diferentes entre os quatro protocolos analisados entre os momentos 0 minuto e 120 minutos. Houve redução significativa da temperatura retal nos protocolos P1 e P4. Logo após a administração dos fármacos (0 minuto) foi possível observar o decréscimo da temperatura até 20 minutos de procedimento e, então, estabilização dos valores até o final do período analisado. Não existiram diferenças estatísticas para os demais grupos analisados (Figura 84).

As dificuldades na aferição dos parâmetros avaliados com o animal acordado, por intensa reação ao manuseio, produziram erros no procedimento.

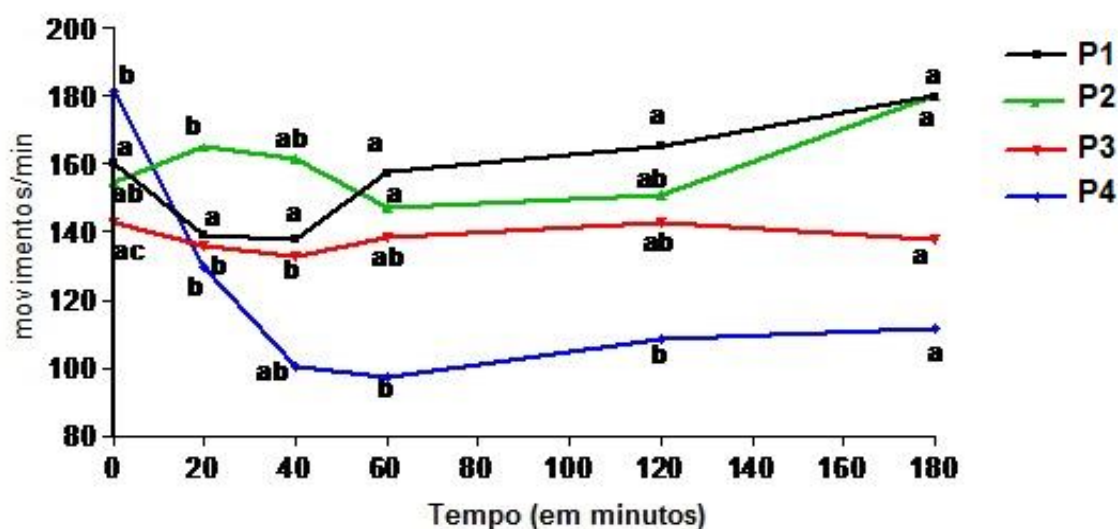
**Tabela 113.** Média e desvio padrão dos valores de tempo de latência e de recuperação (em minutos) dos produtos em camundongos anestesiados por protocolos anestésicos.

PROTOCOLO	TEMPO DE LATÊNCIA	TEMPO DE RECUPERAÇÃO
Cetamina + Xilazina (P1)	1,87 ± 0,35 <sup>a</sup>	135,0 ± 27,8 <sup>ab</sup>
Cetamina + Midazolam (P2)	1,62 ± 0,52 <sup>a</sup>	127,0 ± 21,2 <sup>ab</sup>
Acepromazina + Tiopental (P3)	2,87 ± 1,25 <sup>b</sup>	92,5 ± 67,5 <sup>a</sup>
Tiletamina + Zolazepam (P4)	1,50 ± 0,53 <sup>a</sup>	205,0 ± 127,7 <sup>b</sup>

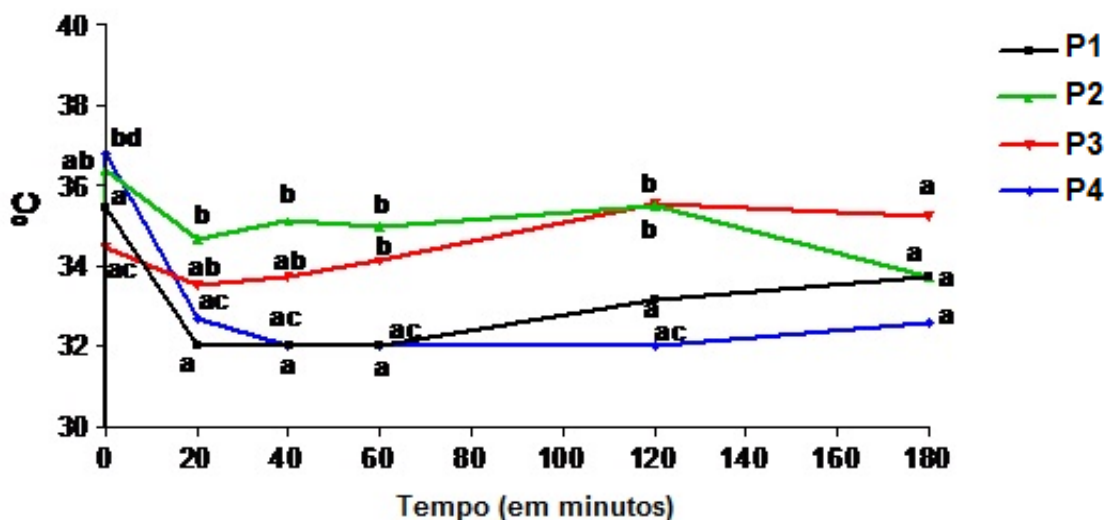
Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (P<0,05).



**Figura 82.** Comparação, em minutos, entre os protocolos anestésicos administrados em camundongos com relação à frequência cardíaca. Letras iguais entre as linhas não apresentam diferenças significativas ( $p>0,05$ ). P1 = protocolo anestésico 1 (cetamina + xilazina); P2 = protocolo anestésico 2 (cetamina + midazolam); P3 = protocolo anestésico 3 (acepromazina + tiopental); P4 = protocolo anestésico 4 (tilemina + zolazepam).



**Figura 83.** Comparação, em minutos, entre os protocolos anestésicos administrados em camundongos com relação à frequência respiratória. Letras iguais entre as linhas não apresentam diferenças significativas ( $p>0,05$ ). P1 = protocolo anestésico 1 (cetamina + xilazina); P2 = protocolo anestésico 2 (cetamina + midazolam); P3 = protocolo anestésico 3 (acepromazina + tiopental); P4 = protocolo anestésico 4 (tilemina + zolazepam).



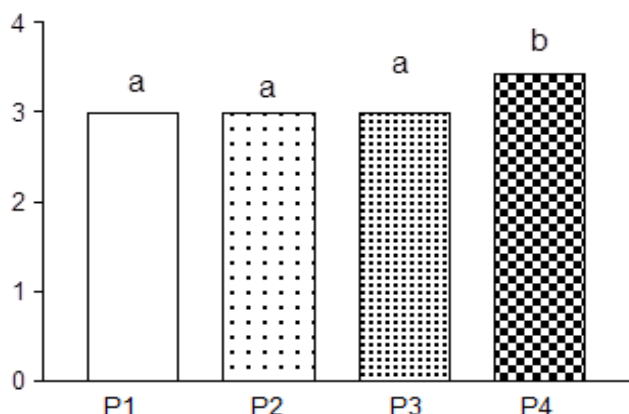
**Figura 84** Comparação, em minutos, entre os protocolos anestésicos administrados em camundongos com relação à temperatura. Letras iguais entre as linhas não apresentam diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). P1 = protocolo anestésico 1 (cetamina + xilazina); P2 = protocolo anestésico 2 (cetamina + midazolam); P3 = protocolo anestésico 3 (acepromazina + tiopental); P4 = protocolo anestésico 4 (tilemina + zolazepam).

Os demais parâmetros avaliados entre os quatro protocolos anestésicos que apresentaram diferença significativa estão representados pelas figuras 85, 86, 87 e 88.

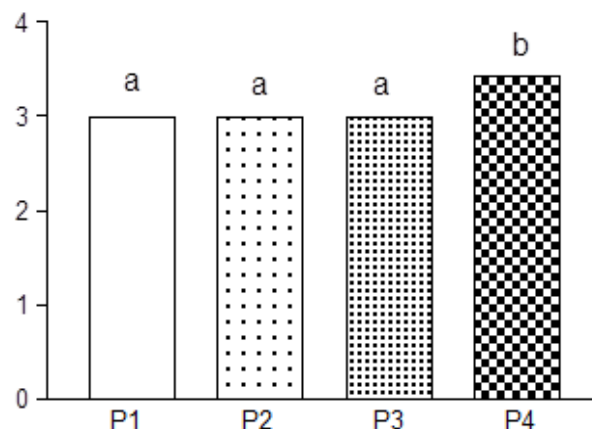
A coloração das mucosas oral e genital apresentaram diferenças significativas somente para o protocolo anestésico P4 ( $p < 0,05$ ), pois pode ser observado hipocromia após 20 minutos de avaliação, retomando a coloração normal das mucosas nos momentos seguintes. A ausência de reflexo caudal e reação ao pinçamento abdominal apresentaram diferenças significativas somente até o vigésimo minuto de procedimento para o protocolo anestésico P1 ( $p < 0,05$ ), retornando a presença dos reflexos após esse período.

Dois animais vieram a óbito entre os momentos 0 minuto e 20 minutos após a administração dos fármacos realizada no procedimento P4, por aspiração em consequência à intensa sialorréia.

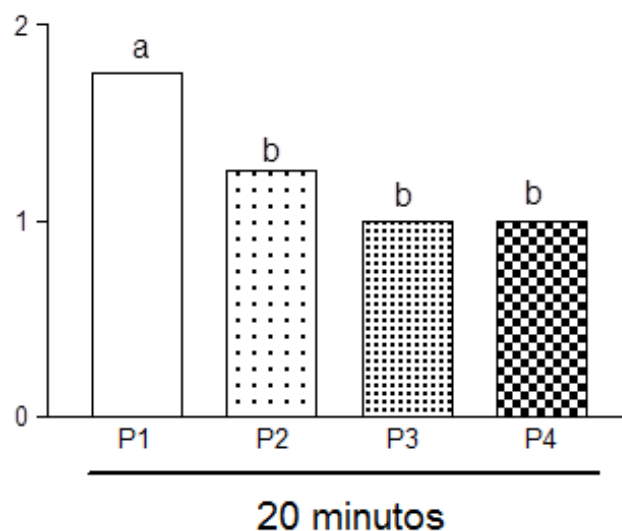
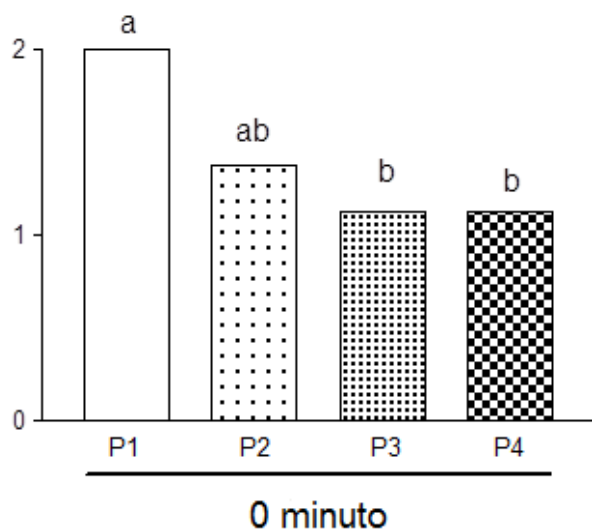
Também houve óbito de um animal imediatamente após a administração dos fármacos no procedimento P3, provavelmente ocasionado pelo estresse no momento da manipulação, sendo, portanto, retirado os dados das análises.



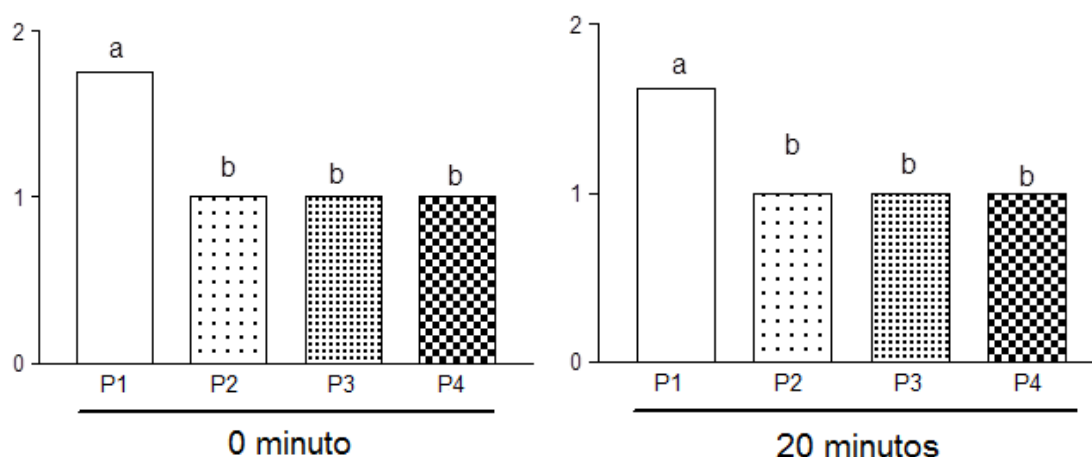
**Figura 85.** Mediana dos valores obtidos para coloração da mucosa genital, aos 20 minutos, momento no qual ocorreu diferença significativa entre os procedimentos anestésicos ( $p < 0,05$ ) em camundongos. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si. P1 = protocolo anestésico 1 (cetamina + xilazina); P2 = protocolo anestésico 2 (cetamina + midazolam); P3 = protocolo anestésico 3 (acepromazina + tiopental); P4 = protocolo anestésico 4 (tilemina + zolazepam). Representação dos valores do eixo y: 3 = coloração normal, 4 = hipocromia e 5 = hiperchromia.



**Figura 86.** Mediana dos valores obtidos para coloração da mucosa oral, aos 20 minutos, momento no qual ocorreu diferença significativa entre os procedimentos anestésicos ( $p < 0,05$ ) em camundongos. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si. P1 = protocolo anestésico 1 (cetamina + xilazina); P2 = protocolo anestésico 2 (cetamina + midazolam); P3 = protocolo anestésico 3 (acepromazina + tiopental); P4 = protocolo anestésico 4 (tilemina + zolazepam). Representação dos valores do eixo y: 3 = coloração normal, 4 = hipocromia e 5 = hiperchromia.



**Figura 87.** Representação da mediana dos valores obtidos para reação ao pinçamento abdominal, no momento logo após a indução anestésica (0 minuto) e aos 20 minutos, momentos nos quais ocorreram diferenças significativas entre os procedimentos anestésicos ( $p < 0,05$ ) em camundongos. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si. P1 = protocolo anestésico 1 (cetamina + xilazina); P2 = protocolo anestésico 2 (cetamina + midazolam); P3 = protocolo anestésico 3 (acepromazina + tiopental); P4 = protocolo anestésico 4 (tilemina + zolazepam). Representação dos valores do eixo y: 1 = presença e 2 = ausência.



**Figura 88.** Representação da mediana dos valores obtidos para reflexo de cauda, no momento logo após a indução anestésica (0 minuto) e aos 20 minutos, momentos nos quais ocorreram diferenças significativas entre os procedimentos anestésicos ( $p < 0,05$ ) em camundongos. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si. P1 = protocolo anestésico 1 (cetamina + xilazina); P2 = protocolo anestésico 2 (cetamina + midazolam); P3 = protocolo anestésico 3 (acepromazina + tiopental); P4 = protocolo anestésico 4 (tilemina + zolazepam). Representação dos valores do eixo y: 1 = presença e 2 = ausência.

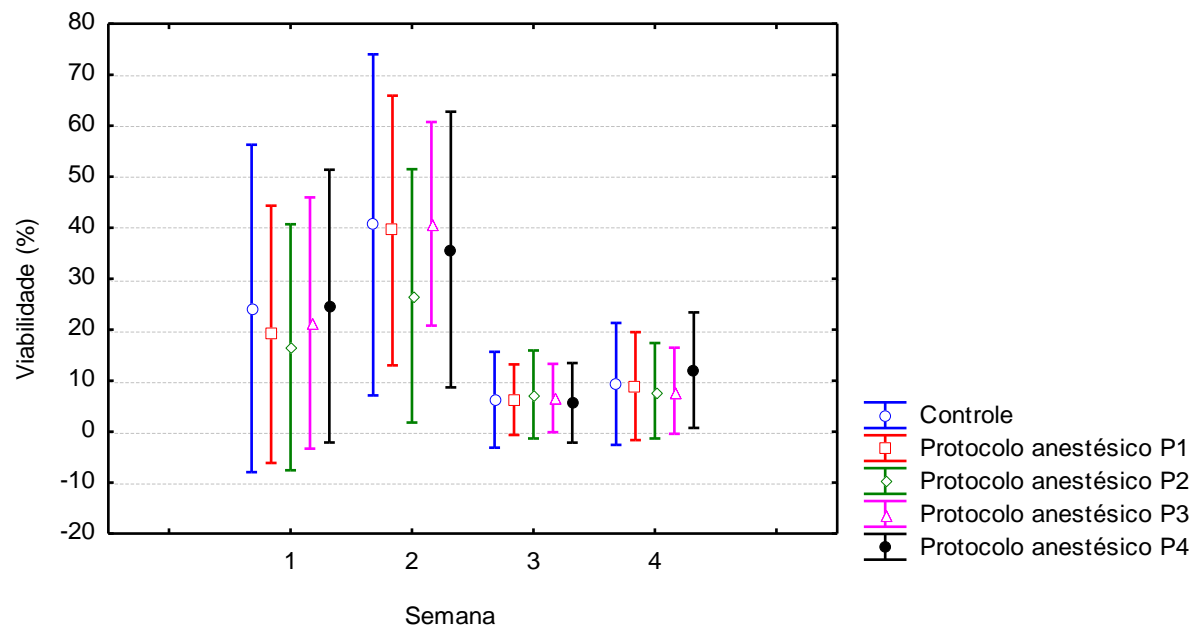
#### 4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS OVOS DE *Ae. aegypti*

Os resultados encontrados referente a viabilidade dos ovos de *Ae. aegypti* obtidos a partir de oviposição realizada pelas fêmeas da mesma espécie quando alimentadas de sangue de camundongos anestesiados com os fármacos avaliados, não apresentaram alterações estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Os resultados estão apresentados na tabela 114 e figura 89.

**Tabela 114.** Média e desvio padrão dos valores de porcentagem de larvas de *Ae. aegypti* eclodidas em 24 horas após os ovos serem colocados para eclosão, por semana e por protocolo anestésico.

PROTOCOLO	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4
<b>CONTROLE</b>	29,5 ± 38,8 <sup>a</sup>	40,6 ± 35,2 <sup>b</sup>	6,2 ± 9,9 <sup>c</sup>	9,3 ± 12,6 <sup>d</sup>
<b>P1</b>	18,9 ± 24,5 <sup>a</sup>	38,5 ± 23,8 <sup>b</sup>	6,4 ± 4,5 <sup>c</sup>	8,7 ± 8,9 <sup>d</sup>
<b>P2</b>	17,7 ± 20,2 <sup>a</sup>	29,0 ± 25,3 <sup>b</sup>	8,0 ± 6,4 <sup>c</sup>	7,8 ± 6,5 <sup>d</sup>
<b>P3</b>	20,6 ± 23,8 <sup>a</sup>	41,3 ± 19,0 <sup>b</sup>	7,2 ± 6,7 <sup>c</sup>	7,9 ± 5,9 <sup>d</sup>
<b>P4</b>	24,2 ± 27,5 <sup>a</sup>	32,8 ± 14,3 <sup>b</sup>	5,7 ± 6,4 <sup>c</sup>	12,3 ± 12,0 <sup>d</sup>

P1 = protocolo anestésico 1 (cetamina + xilazina); P2 = protocolo anestésico 2 (cetamina + midazolam); P3 = protocolo anestésico 3 (acepromazina + tiopental); P4 = protocolo anestésico 4 (tilemina + zolazepam). Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).



**Figura 89.** Média e desvio padrão dos valores de porcentagem de larvas de *Ae. aegypti* eclodidas 24 horas após os ovos depositados por fêmeas da mesma espécie, alimentadas com sangue de camundongos anestesiados com diferentes substâncias anestésicas, serem colocados para eclosão, por semana e por protocolo anestésico.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 ESTUDO QUÍMICO: COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DAS ESPÉCIES *Annona pickelii* (OEAP), *Annona vepretorum* (OEAV) e *Xylopia laevigata* (OEXL)

A maioria das substâncias identificadas nos óleos essenciais das três espécies de Annonaceae em estudo está de acordo com as substâncias encontradas nos óleos essenciais das Annonaceae, principalmente nas espécies dos gêneros *Annona* (COSTA *et al.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2011) e *Xylopia* (MAIA *et al.*, 2005).

O rendimento da extração dos óleos essenciais das espécies da família Annonaceae é um fator relevante em um produto de origem botânica com ação inseticida. Observou-se que os óleos essenciais analisados são constituídos em sua maioria por compostos pertencentes à classe dos sesquiterpenos, com 97,7% em *A. pickelii*, 92,5% em *X. laevigata* e 68,9% em *A. vepretorum*.

Costa *et al.* (2011) identificaram a presença de 18 compostos no óleo essencial de *A. vepretorum* (OEAV), sendo os sesquiterpenos os constituintes majoritários ( $\alpha$ -Pineno,  $\alpha$ -Felandreno, *p*-Cimeno, (*E*)- $\beta$ -Ocimeno, Germacreno D, Biciclogermacreno e Espatuleno), enquanto que os principais constituintes do óleo essencial de *A. vepretorum* encontrados nesse estudo foram biciclogermacreno (43,7%), espatuleno (11,4%),  $\alpha$ -felandreno (10,0%),  $\alpha$ -pineno (7,1%), (*E*)- $\beta$ -ocimeno (6,8%), germacreno D (5,8%) e *p*-cimeno (4,2%).

Costa *et al.* (2011) descreveram rendimentos de sesquiterpenos de *A. pickelii* idênticos aos rendimentos obtidos nesse estudo para a mesma espécie. Os mesmos autores, ainda, relataram que os compostos mais abundantes presentes no óleo essencial de *A. pickelii* (OEAP), em ordem decrescente, foram o biciclogermacreno, (*E*)-cariofileno e  $\alpha$ -copaeno, corroborando novamente com os nossos resultados. Detectou-se, também, a presença de  $\beta$ -elemene,  $\alpha$ -gurjunene, aromadendreno,  $\alpha$ -humuleno, óxido de  $\gamma$ -muuroleno, óxido de germacreno D, óxido de spathuleno e óxido de cariofileno para *A. pickelii*, semelhante aos achados para a mesma espécie.

Portanto, os compostos biciclogermaceno, (*E*)-cariofileno e  $\alpha$ -copaeno podem ser considerados marcadores quimiotaxonômicos do gênero *Annona*, uma vez que sua ocorrência também foi encontrada pelos mesmos autores anteriormente citados em mais uma espécie do gênero, *Annona salzmannii*, sendo comum em espécies do gênero. Ainda assim, Cruz et al. (2011) reportaram o isolamento e identificação de três sesquiterpenos, dois esteróides e sete alcalóides a partir da casca de *A. salzmannii*, além de identificarem o composto óxido de cariofileno como um componente de óleo essencial de folhas de várias espécies de *Annona* e *Xylopia*.

Para o óleo essencial de *X. laevigata* (OEXL) observou-se a presença de  $\gamma$ -muuroleno (21,5%),  $\alpha$ -copaeno (8,3%),  $\delta$ -cadineno (8,1%), (*E*)-cariofileno (5,9%), aromadendreno (5,7%),  $\gamma$ -cadineno (5,6%), biciclogermaceno (5,1%) e  $\gamma$ -amorfenol (4,7%), semelhante aos resultados obtidos para as outras duas espécies descritas.

Os resultados demonstram que *A. vepretorum* e *A. pickelii* são espécies típicas de Annonaceae e uma fonte promissora de compostos bioativos. De mesma forma, tal pressuposto pode ser considerado para as espécies pertencentes aos gêneros *Xylopia*, uma vez que possuem constituição semelhante às espécies do gênero *Annona*.

Os resultados aqui obtidos revelam bons rendimentos dos óleos essenciais para as espécies de plantas avaliadas, permitindo, ainda, levantar a hipótese de que os óleos, ricos em sesquiterpenos, podem ser considerados mais ativos para o controle de *A. aegypti* do que os que possuem mais monoterpenos, segundo Costa et al. (2008).

## **5.2 ATIVIDADE LARVICIDA E VERIFICAÇÃO DO PERÍODO DE ATIVIDADE LARVICIDA DOS EXTRATOS VEGETAIS E ÓLEOS ESSENCIAIS DA FAMÍLIA ANNONACEAE E SUBSTÂNCIAS PURAS**

A mortalidade observada para os compostos de extrato metanólico e extrato hexânico de *A. pickelii* e *X. laevigata* e extrato metanólico e extrato éter de petróleo de *A. vepretorum* foi inferior a 80%, considerando concentrações



abaixo de 250 ppm. A única exceção obtida foi o composto extrato hexânico da folha de *X. laevigata* (XLFEH), que apresentou mortalidade de 95% na concentração de 250 ppm. Todos os compostos que apresentaram mortalidade abaixo de 80% permitiram a emergência de adultos. Considerou-se, também, como baixa eficiência qualquer dado de mortalidade para concentrações acima de 500 ppm.

O óleo essencial de *A. pickelii* (OEAP) apresentou mortalidade larval acima de 80% nas concentrações acima de 200 ppm, enquanto o óleo essencial de *A. vepretorum* (OEAV) apresentou mortalidade larval acima de 80% nas concentrações acima de 175 ppm e o óleo essencial de *X. laevigata* (OEXL) apresentou mortalidade larval acima de 80% somente nas concentrações de 275 e 500 ppm (95% para ambas as concentrações). Ainda sim, apesar da mortalidade elevada, observou-se a emergência de adultos para os óleos essenciais das três espécies de plantas estudadas. As doses letais calculadas após 24 horas de bioensaio OEAP foram: CL50 = 183, 57 ppm, CL90 = 231,15 ppm e CL99 = 251,31 ppm. Ao término dos bioensaios, com 168 horas, as doses obtidas para o mesmo composto foram semelhantes às obtidas em 24 horas, sendo CL50 = 149, 89 ppm, CL90 = 256, 66 ppm e CL99 = 320, 72 ppm. Com resultados próximos ao composto anteriormente citado, as doses letais calculadas após 24 horas de bioensaio para OEAV foram: CL50 = 123,80 ppm, CL90 = 243,15 ppm e CL99 = 327,24 ppm. Ao término do bioensaio, com 288 horas, as doses letais obtidas para OEAV foram, também, semelhantes àquelas obtidas em 24 horas, sendo CL50 = 115,89 ppm, CL90 = 212,93 ppm e CL99 = 273,97 ppm. De forma diferente, as doses letais calculadas após 24 horas de bioensaio para OEXL foram: CL50 = 632,36 ppm, CL90 = 2.977,52 ppm e CL99 = 5.657,40 ppm. Ao término do bioensaio, com 120 horas, as doses letais obtidas para OEXL apresentaram valores mais discrepantes ainda, onde CL50 = 430,80 ppm, CL90 = 13.942,50 ppm e CL99 = 58.874,57 ppm.

Semelhante aos dados obtidos, Coelho *et al.* (2009), relataram que extratos etanólicos da casca e do caule de *Xylopija emarginata* causaram mortalidade média igual ou superior a 50% contra imaturos de *Ae. aegypti*, na concentração de 500 ppm, após 24 horas. De acordo com os autores, os terpenos possuem ampla atividade inseticida conhecida, podendo atribuir a essas substâncias a responsabilidade pela atividade larvicida observada.

Já Bobadilla *et al.* (2005) obtiveram valores de mortalidade larval contra *Ae. aegypti* que alcançaram 100% em 24 horas com extrato aquoso de semente de *Annona muricata* na concentração de 0,5 mg/mL. Nesse mesmo trabalho, observou-se que extratos aquosos de folhas e flores da mesma espécie atingiu a mortalidade larval de 100% somente após 36 horas de exposição, nas concentrações de 100 e 50 mg/mL, respectivamente. Os resultados obtidos revelam que a atividade larvicida é muito maior para extratos obtidos de sementes dessa espécie, por possuir maiores reservas de nutrientes e com probabilidade de conter maior quantidade de princípios ativos da espécie em questão com relação às demais partes da planta.

Entretanto, Henao *et al.* (2007) observaram que os extratos de *A. muricata* produziram mortalidade larval sobre *Ae. aegypti* em 24 horas, com dose letal CL 50 (900 ppm) , próximo aos valores obtidos nesse estudo para APFEM, e bem menores do que os valores de CL 50 de OEAV, OEAP e OEXL em 24 horas. Ainda sim, os autores relatam que tais resultados indicam que os extratos da espécie *A. muricata* podem ser considerados promissores para o controle biológico de larvas de *Ae. aegypti*, indicando que, em plantas do gênero *Annona*, a atividade de acetogeninas é dada como responsável pela atividade biológica apresentada.

Em concentração menor do que as testadas nesse estudo e em menor tempo, Moraes (2009) relatou que óleos essenciais das espécies *Annona coriacea* e *Annona dioica* demonstraram eficiência na mortalidade das larvas de *Ae. aegypti* acima de 75%, na concentração de 50 ppm, com um tempo de exposição de 12 horas. O extrato etanólico de *A. coriacea* apresentou, ainda, atividade larvicida sobre *Ae. aegypti* nas concentrações 6, 8, 10, 15 e 20 ppm, com mortalidade de 80, 91, 97, 98 e 100% respectivamente. As concentrações letais do extrato etanólico de *A. coriacea* obtidas apresentaram resultados bem abaixo daqueles obtidos nesse estudo, sendo CL90 = 7,14 ppm e CL50 = 3,14 ppm. Em contrapartida, os extratos de *Xylopia aromatica* não apresentaram significativa mortalidade nas concentrações testadas, igualando-se aos resultados obtidos nesse estudo, a exceção do extrato hexânico da folha de *X. laevigata*. Segundo o autor, essas diferenças de toxicidade das plantas avaliadas sobre as larvas de *Ae. aegypti* podem estar relacionadas a diversos fatores,

como a diferenciação fitoquímica dos componentes das espécies vegetais e a variação nos teores de princípios ativos.

Com porcentagem de mortalidade larval semelhante às obtidas em 24 horas, Oliveira *et al.* (2010) relataram que o extrato bruto hexânico da semente de *Annona crassiflora* causou mortalidade significativa nas concentrações 1000, 800, 600 e 400 ppm em 24 horas, destacando a concentração de 1000 ppm, com mortalidade média de 18,75%. Somente a concentração de 200 ppm não causou mortalidade significativa (3,75%) em 24 horas.

Em outro trabalho, e divergindo dos dados obtidos nesse estudo, Oliveira *et al.* (2011) relataram que os extratos metanólicos da semente e da folha e o extrato hexânico da semente de *Annona mucosa* atingiram 100% de mortalidade nas concentrações 1000, 500 e 100ppm, após 210, 300 e 390 minutos, respectivamente, e, segundo os mesmos, estão dentro do tempo preconizado pela Organização Mundial de Saúde, que determina 24 horas para bioensaios de efeito larvicida.

Por fim, as substâncias puras (*E*)-cariofileno,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno mostraram atividade larvicida abaixo de 80% para todas as concentrações avaliadas, assim como todas as concentrações permitiram a emergência de adultos. Dentre as substâncias puras, o óxido de cariofileno foi o qual apresentou maior mortalidade, acima de 80% na concentração de 100 ppm.

A diluição completa de todos os extratos vegetais avaliados nesse estudo, utilizando DMSO a 1% como solvente, foi de grande dificuldade, afetando, principalmente, a pipetagem de cada produto e a determinação correta das concentrações utilizadas. Nascimento *et al.* (2009) relataram a importância da reprodutibilidade para obtenção de resultados confiáveis. De acordo com os autores, essa tem sido uma difícil tarefa a ser cumprida, devido às características que os óleos e extratos apresentam como volatilidade, viscosidade, insolubilidade em água e complexidade, interferindo significativamente nos resultados. Existe, ainda, a possibilidade de formação de uma suspensão turva que impede a determinação fidedigna da eficácia dos compostos, devido à interferência da dissolução insuficiente dos extratos e óleos, como ocorreu para diversos extratos testados nesse estudo. E apesar de ser comum a utilização de solventes, como DMSO, para facilitar a dispersão dos extratos e óleos em água destilada utilizada em bioensaios, a dissolução dos

mesmos apresentou-se prejudicada. Tal fato pode ser observado ao avaliar os gráficos de mortalidade larval observado por réplica, por dia e por concentração de cada composto, onde encontra-se resultados diferentes para cada uma das réplicas, de cada bioensaio.

Curiosamente, Beserra *et al.* (2009) relataram que, ao manter criação de *Ae. aegypti* em laboratório, o aumento da densidade larval foi prejudicial ao desenvolvimento das mesmas, em relação às demais fases do desenvolvimento, em função da disponibilidade de alimento. Carência nutricional decorrente da baixa assimilação de nutrientes aumenta o tempo de desenvolvimento de imaturos, assim como aumenta a mortalidade na fase de pupa. De acordo com os autores, o indicado é manter proporção de 1,9 mg de ração/larva em um único momento. A quantidade de ração administrada durante o desenvolvido desse trabalho foi maior do que a estipulada pelos autores acima (0,013g/larvas a cada 96 horas), descartando a probabilidade de ter ocorrido morte larval em decorrência de falta de alimento.

Além disso, a densidade larval apresentada nos bioensaios realizados nesse estudo (20 larval/ 100 mL, ou 200 larvas/L) está dentro da normalidade, confirmada por estudos feito por Gama *et al.* (2005), que consideraram como densidade baixa 150 larvas por litro de água e densidade média 500 larvas por litro de água. Adicionado a esse fator, a porcentagem de mortalidade larval normal observada na criação com baixa densidade foi 15,9%, justificando, assim, a porcentagem de mortalidade observada os grupos controles ao final de cada bioensaio, onde os valores obtidos chegaram a 25% de mortalidade. Vale lembrar que não ocorreu mortalidade larval acima de 5% para nenhum grupo controle em 24 horas de duração do bioensaio.

Outro dado importante observado neste trabalho e confirmado por Beserra *et al.* (2010) foi o aumento da quantidade de substâncias orgânicas acumuladas na água contida nos copos de bioensaio, ocasionando o decréscimo da tensão superficial da água, facilitado pela temperatura elevada (25°C). A viscosidade, definida como a capacidade da água em oferecer resistência ao movimento dos organismos, aumenta com o teor de substâncias dissolvidas, e pode dificultar a manutenção das larvas junto à superfície da água, limitando as trocas gasosas, ao mesmo tempo em que aumenta o gasto energético para

obtenção de alimento, contribuindo para a mortalidade larval dos grupos controles.

### 5.3 AVALIAÇÃO E MONITORAMENTO DOS ANIMAIS DURANTE E APÓS O PROCEDIMENTO DE REPASTO SANGUÍNEO

Damy *et al.* (2010) relataram que o tempo de recuperação da associação anestésica entre cetamina e xilazina em camundongos é de 60 a 100 minutos, variando de acordo com a dose administrada, enquanto o período de latência via intravenosa é praticamente inexistente; assim como Alonso *et al.* (2008) relataram que, após a administração da associação tiletamina e zolazepam em camundongos, o período de latência médio foi de um minuto e 16 segundos, dados estes semelhantes aos resultados obtidos neste estudo.

Para a avaliação dos protocolos anestésicos que permitiram a menor variação nos valores fisiológicos normais dos parâmetros avaliados, optou-se, portanto, pela comparação com os valores já descritos em literatura como grupo controle, representados na tabela 115.

**Tabela 115.** Valores normais de frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (TR) apresentados para camundongos (*Mus musculus*).

Espécie	Parâmetros		
	FC	FR	TR
<b>Camundongo (<i>Mus musculus</i>)</b>	327-780	90-160	37,4

Fonte: Taborda et al. (2004)

Observou-se comportamento semelhante quanto à frequência cardíaca (FC) entre os grupos, ao longo de todo o período, verificando queda após administração das drogas, mais acentuada no protocolo P1, e seguida por estabilidade dos valores do parâmetro avaliado, a exceção do protocolo P3, onde a FC manteve-se estável em todos os momentos. Quanto à frequência respiratória (FR), observou-se também um comportamento semelhante dos grupos, ao longo de todo o período, com queda da FR após administração das drogas, mais exacerbada no protocolo P4, seguido, também, por estabilidade

dos valores do parâmetro avaliado, a exceção do protocolo P2, que manteve a FR estável em todos os momentos.

As médias dos valores de temperatura retal apresentaram-se diferentes entre os quatro protocolos analisados entre os momentos 0 minuto e 120 minutos. Houve redução significativa da temperatura retal nos protocolos P1 e P4. Logo após a administração dos fármacos (0 minuto) foi possível observar o decréscimo da temperatura até 20 minutos de procedimento e, então, estabilização dos valores até o final do período analisado. Segundo Carvalho e Lopes (2006) esses pequenos animais são mais suscetíveis a hipotermia, por isso o monitoramento da temperatura corporal é essencial.

Mohamed *et al.* (2011) relataram que, em coelhos, a administração de xilazina e diazepam, separadamente, ocasionou decréscimo nas frequências cardíaca e respiratória. Com relação à temperatura corporal, não houve alteração significativa após a administração de ambas as drogas. Quando combinados, a administração desses fármacos também resultou em diminuição das taxas respiratórias. A administração de tiopental também ocasionou a redução na FR na mesma espécie estudada, porém a FC apresentou-se elevada. A depressão da FR foi mais acentuada com xilazina em comparação com tiopental e diazepam, porém sem haver comprometimento grave das funções vitais. Ainda segundo os mesmos autores, a diminuição da FR ocasionada pelo diazepam pode ser atribuída à propriedade de relaxamento muscular que tal fármaco proporciona. Apesar da espécie trabalhada pelos pesquisadores em questão ser diferente, os resultados por eles apresentados assemelham-se aos resultados obtidos neste estudo.

Os animais utilizados nesse estudo apresentaram discreta elevação da FR logo após a administração dos fármacos, permanecendo assim por menos de 15 minutos, como também apresentaram redução significativa da temperatura retal e efeito depressor sobre a temperatura corporal quando administrada a associação tiletamina-zolazepam. Todos esses resultados obtidos estão de acordo com os relatos de Alonso *et al.* (2008) em camundongos. Segundo os autores, os resultados mostram, claramente, o efeito potencializador das fenotiazinas que, pela depleção de catecolaminas no sistema nervoso central, são capazes de aumentar o efeito dos fármacos analgésicos.

Por fim, os reflexos oculopalpebrais estiveram presentes em todos os grupos e foram considerados como manifestações típicas da anestesia dissociativa. A associação tiletamina-zolazepam isoladamente não promoveu anestesia cirúrgica em camundongos, porém a dose de 40 a 80 mg/kg, por via intramuscular, foi suficiente para proporcionar boa contenção desses animais (ALONSO *et al.*, 2008).

Relatos feitos por Dyson *et al.* (1988) estão de acordo com os dados obtidos neste estudo e mostram que a associação de acepromazina com tiopental ocasionaram depressão cardiovascular contínua em gatos, embora o índice cardíaco não tenha sido significativamente deprimido, mantendo a FC constante durante todo o experimento.

No trabalho realizado por Xu *et al.* (2007) a associação de 100 mg/Kg de cetamina e 0,5 mg/Kg de xilazina induziu a uma anestesia relativamente leve, porém aceitável em camundongos. Os animais apresentaram ausência de atividades espontâneas e reflexo de pé (quando animal é colocado na posição supina), mas com presença de reflexo palpebral por, pelo menos, 20 minutos após a administração dos fármacos. Quando 100 mg/Kg de cetamina e 2,5 mg/kg de xilazina foram associados, produziu uma anestesia satisfatória por até 30 minutos. Quando elevou-se a dose de xilazina para 10 mg/Kg, junto com 100 mg/Kg de cetamina produziu uma anestesia profunda com duração de mais de 40 minutos. A associação de 100 mg/Kg de cetamina e 10 mg/Kg de xilazina promoveu a redução da FC em camundongos, reduzindo-a para menos de 300 bpm, mantendo-a assim constante pelo período observado de 40 minutos, semelhante aos resultados obtidos neste estudo. Segundos os mesmos autores, quando camundongos são anestesiados com doses menores de xilazina (0,5 mg/kg), as mudanças na FC são bifásicas, com uma redução dos valores nos primeiros 10 minutos, seguido por recuperação gradual do parâmetro, concluindo-se que os efeitos da diminuição da FC são atribuídos em grande parte à xilazina. Além disso, quando associada à cetamina, a xilazina inibe o metabolismo da primeira pelo fígado, prolongando o tempo de atividade da cetamina no organismo do animal.

Arras *et al.* (2001) relataram que 100 mg/Kg de cetamina associado a 20 mg/Kg de xilazina produziu uma anestesia com presença, ainda, de algumas respostas reflexas em camundongos. Aumentando a dose para 150 mg/Kg de

cetamina e 30 mg/kg de xilazina, atinge-se boa tolerância cirúrgica, mas aumenta a taxa de mortalidade para 40%. Tais achados concordam com os dados obtidos neste estudo e demonstram que a dose administrada da associação cetamina e xilazina foi suficiente e segura para a realização do procedimento de repasto sanguíneo.

Ainda segundo Arras *et al.* (2001) tanto para a associação quetamina com xilazina, quanto a associação tiletamina-zolazepam os camundongos apresentaram reação positiva (presença de reflexo) para o reflexo interdigital, reflexo de reação ao pinçamento abdominal e reações defensivas a estímulos táteis, demonstrando que os animais eram capazes de sentir dor a procedimentos invasivos, semelhante aos dados encontrados neste estudo. Os mesmos autores relataram também que a alteração mais marcante para os protocolos anestésicos avaliados foi a hipotermia, aonde os valores chegaram a atingir 32°C. Esta diminuição de temperatura desenvolveu-se rapidamente nos primeiros 10 minutos após a administração dos fármacos e permaneceu estável até a completa recuperação anestésica dos animais. A FC também diminuiu acentuadamente, com valores entre 250 e 350 bpm. Porém o sistema cardiovascular não foi acometido criticamente pela anestesia avaliada, corroborando, novamente, com os dados obtidos neste estudo.

Assim como os dados obtidos neste estudo para camundongos, Cruz *et al.* (1998) relataram que, para capivaras, a FC foi maior nos animais anestesiados com cetamina associado a midazolam do que em animais anestesiados com cetamina associado a xilazina, em todos os momentos avaliados (15, 30, 45 e 60 minutos), confirmando a estabilidade do midazolam sobre o sistema cardiovascular. Para os dois protocolos analisados a FR manteve-se estável, porém houve diminuição da temperatura retal, sem diferença significativa entre os protocolos anestésicos avaliados, em decorrência da inibição do centro termorregulador, pela vasodilatação periférica e conseqüente perda de calor corporal e tônus muscular.

Por fim, segundo Pothikasikorn *et al.* (2010), apesar de haver estudos indicando a presença de métodos alternativos para alimentação com sangue por fêmeas de *Ae. aegypti*, utilizando membranas de silicone e sangue humano já descartados provenientes de bancos de sangue, dessa forma os mosquitos alimentam-se de forma mais precária, pois a medida em que os glóbulos



vermelhos envelhecem ocorre a lise dessa células, liberando substâncias que seriam essenciais ao desenvolvimento embrionário dos ovos dessa espécie, como aminoácidos, lipídios, proteínas, potássio, entre outros. Apesar de tal técnica apresentar menores taxas de eclosão dos ovos quando comparado à técnica de repasto sanguíneos *in vivo*, os adultos que conseguiram emergir não tiveram seu desenvolvimento afetado. Com a única condição de usar sangue fresco, sem lise de células, a técnica de membrana de silicone não possui vantagens sobre a alimentação sanguínea *in vivo*.

#### **5.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS OVOS DE *Aedes aegypti***

Não há relatos na literatura sobre possíveis drogas presentes no sangue dos animais utilizados como fonte de repasto sanguíneo para fêmeas de *Ae. aegypti* que interfiram na viabilidade dos ovos por elas depositados após a alimentação.

É importante ressaltar que houve diferença estatística para a viabilidade dos ovos de *Ae. aegypti* somente entre as semanas (variável tempo) em que ocorreram os procedimentos anestésicos devido à quantidade de ovos depositados pelas fêmeas durante os mesmos períodos, diminuindo na medida em que as fêmeas envelheciam, tendo, conseqüentemente, menor quantidade de ovos destinados a obtenção de larvas.

Harrington *et al.* (2001) apenas revelaram que o repasto sanguíneo se faz necessário devido a constituintes do sangue utilizados durante a embriogênese de *Ae. aegypti*, principalmente devido a presença do aminoácido isoleucina. Apesar de haver baixos valores de isoleucina nas hemáceas humanas, esse estudo indica que a alimentação com sangue humano fornece ao inseto uma vantagem quanto a sua aptidão física devido ao maior quantidade de glicogênio e triglicerídeos obtidos durante o repasto em relação às outras espécies animais, permitindo maior longevidade.

## 6 CONCLUSÕES

1. A ação dos extratos metanólicos, hexânicos e éter de petróleo das espécies representantes da família Annonaceae, apesar de não apresentarem mortalidade larval significativa em 24 horas, impediram a emergência de parte da população de adultos de *Ae. aegypti*;

2. Os óleos essenciais de *A. pickelii*, *A. vepretorum* e *X. laevigata* apresentaram maiores porcentagens de mortalidade do que os demais extratos vegetais. Ainda assim, houve formação de adultos para algumas concentrações analisadas;

3. Os compostos C7 e C1 provenientes da universidade Federal de São Carlos atuaram de forma efetiva, inviabilizando completamente a emergência de adultos, sendo o composto C7 efetivo em concentrações acima de 30  $\mu$ M. Os demais compostos avaliados provenientes da Universidade Federal de São Carlos não foram eficientes como inseticidas das formas imaturas de *Ae. aegypti*;

4. O refinamento dos extratos metanólico, hexânico, éter de petróleo e óleos essenciais de *A. pickelii*, *A. vepretorum* e *X. laevigata* se faz necessário, uma vez que encontrou-se dificuldade para diluição completa dos mesmos, havendo prejuízos na ação da atividade larvicida presente;

5. Cetamina associado ao midazolam (P2) e acepromzina associada ao tiopental sódico (P3) foram os procedimentos anestésicos que apresentaram os melhores resultados para a administração em camundongos utilizados como fonte de sangue para fêmeas de *Ae. aegypti*, uma vez que alteraram minimamente os parâmetros fisiológicos dos animais, permitindo um retorno anestésico rápido.

6. Todos os anestésicos apresentaram valores similares de viabilidade dos ovos, com redução da viabilidade ocorrendo somente de acordo com o período de permanência dos ovos no ambiente, e não devido a fármacos administrados nos camundongos destinados ao repasto sanguíneo.

## 7 REFERÊNCIAS

ALONSO, D. C.; POMPERMAYER, L. G.; PEREIRA, T.; ZEYMER, F. V.; LANG, A.; MATA, L. B. S. C. **Tiletamina-zolazepam e levomepromazina como anestésico em camundongos (*Mus musculus*)**. Revista Ceres, v. 55, n. 4, p. 265-269, 2008

ARMIEN, B.; SUAYA, J. A.; QUIROZ, E.; SAH, B. K.; BAYARD, V.; MARCHENA, L.; CAMPOS, C.; SHEPARD, D. S. **Clinical characteristics and national economic cost of the 2005 dengue epidemic in Panama**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, n. 79, p. 364 – 371, 2008.

ARRAS, M.; AUTENRIED, P.; RETTICH, A.; SPAENI, D.; RÜLICHE, T. **Optimization of Intraperitoneal Injection Anesthesia in Mice: Drugs, Dosages, Adverse Effects, and Anesthesia Depth**. Comparative Medicine by the American Association for Laboratory Animal Science. v. 51, n. 5, p. 443-456, 2001.

BALLENGER-BROWNING, K. K.; ELDER, J. P. **Multi-modal *Aedes aegypti* mosquito reduction interventions and dengue fever prevention**. Tropical Medicine and International Health, v. 14, n. 12, p. 1542–1551, 2009.

BARRETO, C. F. ***Aedes aegypti* - Resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle**. Revista Eletrônica da Faculdade Montes Belos, Goiás, v. 1, n. 2, p. 62-73, 2005.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. **Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa**. Estudos Avançados, v. 22, n. 64, 2008.

BERMEJO, A.; FIGADÈRE, B.; ZAFRA-POLO, M. C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. **Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action**. Nat. Prod. Rep., n. 22, p. 269-303, 2005.

BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; QUEIROGA, M. F. C.; CASTRO JR, F. P. **Resistência de Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao Organofosforado Temefós na Paraíba**. Neotropical Entomology, v. 36, n. 2, p. 303-307, 2007.

BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; RIBEIRO, P. S. **Relação entre Densidade Larval e Ciclo de Vida, Tamanho e Fecundidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em Laboratório**. Neotropical Entomology, v. 38, n. 6, p. 847-852, 2009.

BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; SOUSA, J. T.; FREITAS, E. M.; SANTOS, K. **Efeito da Qualidade da Água no Ciclo de Vida e na Atração para Oviposição de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae)**. Neotropical Entomology, v. 39, n. 6, p.1016-1023, 2010.

BOBADILLA, M.; ZAVALA, F.; SISNIEGAS, M.; ZAVALETA, G.; MOSTACERO, J.; TARAMONA, L. **Evaluación larvicida de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus (guanábana) sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae).** Revista peruana de biología, v. 12, n. 1, p. 145-152, 2005.

BONES, V.C.; SANS, E. C. O.; SIMON, R. A. F.; MOLENTO, C. F. M. **O Controle do uso de animais para ensino e pesquisa.** Archives of Veterinary Science, v. 15, n. 3, p.163-182, 2010.

BRAGA, I. A.; LIMA, J. B. P.; SOARES, S. S.; VALLE, D. ***Aedes aegypti* Resistance to Temephos during 2001 in Several Municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, n. 2, p. 199-203, 2004.

BRAGA, I. A.; MELLO, C. B.; MONTELLA, I. R.; LIMA, J. B. P.; MARTINS JÚNIOR, A. J.; MEDEIROS, P. F. V.; VALLE, D. **Effectiveness of Methoprene, an Insect Growth Regulator, Against Temephos-Resistant *Aedes aegypti* Populations from Different Brazilian Localities, Under Laboratory Conditions.** J. Med. Entomol., 42(5): 830-837, 2005

BRAGA, I. A.; VALLE, D. ***Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência.** Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, v. 16, n. 4, p. 279-293, 2007a.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. ***Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil.** Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007b.

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

BRASIL, Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. **Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998.** Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Brasília, DF: Senado Federal, 1998. Disponível em [[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/L9605.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9605.htm)]

BRASIL, Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. **Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008.** Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Brasília, DF: Senado Federal, 2008. Disponível em [[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm)]

BRASIL, Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. **Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009.** Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos

para o uso científico de animais, e dá outras providências. Brasília, DF: Senado Federal, 2009. Disponível em [[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6899.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6899.htm)]

BRICKS, L. F. **Vacinas para a dengue: perspectivas**. *Pediatria*, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 268-81, 2004.

CARVALHO, T. H. F.; LOPES, O. U. **O emprego de camundongo geneticamente modificado como modelo de estudo para doenças cardiovasculares**. *Medicina (Ribeirão Preto)*, v. 39, n. 1, p.110-116, 2006.

CASTILLO-SÁNCHEZ, L. E.; JIMÉNEZ-OSORNIO, J. J.; DELGADO-HERRERA, M. A. **Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects**. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, n. 12, p. 445 -462, 2010.

CFMV, CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002**. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. Brasil, DF, 2002. Disponível em [[http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao\\_714.pdf](http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_714.pdf)]

CFMV, CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Resolução nº 879, de 15 de fevereiro de 2008**. Dispõe sobre o uso de animais no ensino e na pesquisa e regulamenta as Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs) no âmbito da Medicina Veterinária e da Zootecnia brasileiras e dá outras providências. Brasil, DF, 2008. Disponível em [[http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao\\_879.pdf](http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_879.pdf)]

CLARO, L. B. L.; TOMASSINI, H. C. B.; ROSA, M. L. G. **Prevenção e controle do dengue: uma revisão de estudos sobre conhecimentos, crenças e práticas da população**. *Caderno de Saúde Pública*, v. 20, n 6, p. 1447-1457, 2004.

COELHO, A. A. M.; DE PAULA, J. E.; ESPÍNDOLA, L. S. **Atividade larvicida de extratos vegetais sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), em condições de Laboratório**. *BioAssay*, v. 4. n. 3, 2009.

COELHO, G. E. **Challenges in the control of *Aedes aegypti***. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 54, n. 18, p. 13-14, 2012.

COLEMAN, M.; HEMINGWAY, J. **Insecticide Resistance monitoring and evaluation in disease transmitting mosquitoes**. *Journal of Pesticide Science*, v. 32, n. 2, p. 69-76, 2007.

CONASS, CONSELHO NACIONAL DOS SECRETÁRIOS DE SAÚDE. **Nota técnica – dengue: situação atual, desafios e estratégias para enfrentamento**. Brasília, DF: 2011.

CONSOLI, R. A. G. B. & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora FioCruz. Fundação Oswaldo Cruz, p. 225, 1994.

COSTA, E. V.; DUTRA, L. M.; JESUS, H. C. R.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAESA, V. R. S.; SALVADOR, M. J.; CAVALCANTI, S. C. H.; SANTOS, R. C.; PRATA, A. P. N. **Chemical Composition and Antioxidant, Antimicrobial, and Larvicidal Activities of the Essential Oils of *Annona salzmannii* and *A. pickelii* (Annonaceae)**. Natural Product Communications, v. 6, n. 6, p. 907-912, 2011.

CRUZ, M. L.; LUNA, S. P. L.; MOURA, C. A.; CASTRO, G. B.; TEIXEIRA NETO, F. J.; NISHIDA, S. M. **Técnica anestésicas injetáveis em capivaras**. Ciência Rural, Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 411-415, 1998.

DAMY, S. B.; CAMARGO, R. B.; CHAMMAS, R.; FIGUEIREDO, L. F. P. **Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental**. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 56, n. 1, p. 103-11, 2010.

DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M.. **Vigilância Entomológica e Controle de Vetores do Dengue**. Revista Brasileira de Epidemiologia, vol. 5, nº 3, 2002.

DUQUE L, J. E.; NAVARRO-SILVA, M. A. **Dynamics of the control of *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) by *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*, related with temperature, density and concentration of insecticide**. Revista Brasileira de Entomologia, v. 50, n. 4, p. 528-533, 2006.

DYSON, D. H.; ALLEN, D. G.; INGWERSEN, W.; PASCOE, P. J. **Evaluation of Acepromazine/ Meperidine Atropine Premedication Followed by Thiopental Anesthesia in the Cat**. Canine Journal Veterinary Research, v. 52, p. 419-422, 1998.

ERLANGER, T. E.; UTZINGER, J.; KEISER, J. **Effect of dengue vector control interventions on entomological parameters in developing countries: a systematic review and meta-analysis**. Medical and Veterinary Entomology, n. 22, p. 203 – 221, 2008.

ESPINDOLA, C.B.; GUEDES, R. N.; SOUZA, R. C. P. **Avaliação da Eficácia do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no Controle de Formas Imaturas do *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em Ambiente de Laboratório**. EntomoBrasilis, v. 1, n. 1, p. 10-13, 2008.

FAVIER, C.; DEGALLIER, N.; VILARINHOS, P. T. R.; CARVALHO, M. S. L.; YOSHIZAWA, M. A. C.; KNOX, M. B. **Effects of climate and different management strategies on *Aedes aegypti* breeding sites: a longitudinal survey in Brasília (DF, Brazil)**. Tropical Medicine and International Health, v. 11, n. 7, p. 1104-1118, 2006.

FERREIRA, B. J.; SOUZA, M. F. M.; SOARES FILHO A. M.; CARVALHO, A. A. **Evolução histórica dos programas de prevenção e controle da dengue no Brasil.** *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 14, n. 3, p. 961-972, 2009.

FORATTINIA, O. P.; BRITO, M. **Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*.** *Revista de Saúde Pública*, v. 37, n. 5, p. 676-7, 2003.

FOURNET, F.; SANNIER, C.; MONTENY, N. 1997. **Effects of two insect growth regulators on the susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) to *Molinema dessetae* (nematoda: filarioidea).** *Journal of the American Mosquito Control Association*, 13(1):40-42.

FUNASA, FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Brasil, Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD).** Brasília, DF, 2002.

FURTADO, R. F.; LIMA, M. G. A; ANDRADE NETO, M.; BEZERRA, J. N. S.; SILVA, M. G. V. **Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae).** *Neotropical Entomology*, v. 34, n. 5, p. 843-847, 2005.

GAMA, R. A.; ALVES, K. C.; MARTINS, R. F.; EIRAS, A. E.; RESENDE, M. C. **Efeito da densidade larval no tamanho de adultos de *Aedes aegypti* criados em condições de laboratório.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, n. 1, p.64-66, 2005.

GREENBERG, J. **Some nutritional requirements of adult mosquitoes (*Aedes aegypti*) for oviposition.** *The journal of nutrition*, p. 27-35, 1950.

GOMES, A. C. **Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* em programa de vigilância entomológica.** *IESUS*, v. 7, n. 3, 1998.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. **Community involvement in the control of *Aedes aegypti*.** *Acta Tropica*, n. 61, p. 169-179, 1996.

GUBLER, D. J. **Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century.** *TRENDS in Microbiology*, v. 10, n. 2, 2002.

GUBLER, D. J. **Prevention and Control of *Aedes aegypti*-borne Diseases: Lesson Learned from Past Successes and Failures.** *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, v. 19, n. 3, p. 111-114, 2011.

GUIRADO, M. M.; BICUDO, H. E. M. C. **Alguns aspectos do controle populacional e da resistência a inseticidas em *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae).** *Bepa*, v. 6, n. 64, p. 5-14, 2009.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. **Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges.** *Journal of Clinical Virology*, n. 27, p. 1-13, 2003.

HARRINGTON, L.C.; EDMAN, J. D.; SCOTT, T. W.. **Why Do Female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Feed Preferentially and Frequently on Human Blood?** Journal of Medical Entomology, v. 38, n. 3, p.411-422, 2001.

LAGROTTA, M. T. F.; SILVA, W. C.; SOUZA-SANTOS, R. **Identification of key areas for *Aedes aegypti* control through geoprocessing in Nova Iguaçu, Rio de Janeiro State, Brazil.** Caderno de Saúde Pública, v. 24, n. 1, p. 70-80, 2008.

LEBOEUF, M.; CAVE, A.; BHAUMIK, P. K; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEETS, R. **The phytochemistry of the Annonaceae.** Phytochemistry, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1982.

LENZI, M. F.; COURA, L. C. **Prevenção da dengue: a informação em foco.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 37, n. 4, p. 343-350, 2004.

LIMA, E. P.; OLIVEIRA FILHO, A. M.; LIMA, J. W. O; RAMOS JÚNIOR, A. N.; CAVALCANTI, L. P. G.; PONTES, R. J. S. **Resistência do *Aedes aegypti* ao Temefós em Municípios do Estado do Ceará.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 39, n. 3, p. 259-263, 2006.

MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; AMÓRA, S.S.A. **Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v.12, n.1, p.105-112, 2010.

MACORIS, M. L. G; ANDRIGHETTI, M. T. M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C. M.; GARBELOTO, V. C.;BRACCO, J. E. **Resistance of *Aedes aegypti* from the State of São Paulo, Brazil, to Organophosphates Insecticides.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 98, n. 5, p. 703-708, 2003

MAGADULA, J. J.; INNOCENT, E.; OTIENO, J. N. **Mosquito larvicidal and cytotoxic activities of 3 *Annona* species and isolation of active principles.** Journal of Medicinal Plants Research, v. 3, n. 9, p. 674-680, 2009.

MAIA, J. G.S; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, A. C. M.; CARREIRA, L. M. M.; ARAÚJO, J. S. **Leaf volatile oils from four Brazilian *Xylopi*a species.** Flavour and Fragrance Journal, v. 20, n. 5, p. 474–477, 2005.

MAAS, P. J. M.; KAMER, H. M.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R., RAINER H. **Annonaceae from central-eastern Brazil.** Rodriguésia, n. 52, p. 61-94, 2001.

MARZOCHI, K. B. F. **Dengue endêmico: o desafio das estratégias de vigilância.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 37, n. 5, p. 413-415, 2004.

MCCALL, P. J.; KITTAYAPONG, P. **Control of dengue vectors: tools and strategies.** In: Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Genebra, 2006. Disponível em [[http://www.who.int/tdr/publications/publications/swg\\_dengue\\_2.htm](http://www.who.int/tdr/publications/publications/swg_dengue_2.htm)].



MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. **Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento**. Brasília, DF: Fundação Nacional de Saúde, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. Diretoria Técnica de Gestão. **Dengue : diagnóstico e manejo clínico**. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2 ed., 2005

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. Coordenação-Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue. **Balanço Dengue Informe – janeiro a março/2011**. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe\_dengue\_2011\_janeiro\_em\_arco\_13\_04.pdf]

MOHAMMED, A.A., SAYED, M.A.M., ABDELNABI, M.A. **A New Protocol of Anesthesia Using Thiopental, Diazepam and Xylazine in White New Zealand Rabbits**. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, v. 5, n. 9, p. 1296-1300, 2011

MONTELLA, I. R.; MARTINS, A. J.; VIANA-MEDEIROS, P. F.; LIMA, J. B. P; BRAGA, I. A.; VALLE, D. **Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Populations from 2001 to 2004**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 77, n. 3, p. 467–477, 2007.

MORAES, J. M. **Bioatividade de extratos de Annonaceae sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade do Estado de Mato Grosso, Cáceres, 2009.

MORRISON, A. C.; ZIELINSKI-GUTIERREZ, M.; SCOTT, T. W.; ROSENBERG, R. **Defining Challenges and Proposing Solutions for Control of the Virus Vector *Aedes aegypti***. PLoS Medicine, v. 5, n. 3, 2008.

NASCIMENTO, P. F. C., NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. **Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

OCAMPO, C. B.; GONZÁLEZ, C.; MORALES, C. A.; PÉREZ, M.; WESSON, D.; APPERSON, C. S. **Evaluation of community-based strategies for *Aedes aegypti* control inside houses**. Biomédica, n. 29, p. 282-297, 2009.

OLIVEIRA, S. S.; PEREIRA, M. J. B.; COSTA, M. S. **Bioatividade do extrato hexânico bruto de *Annona crassiflora* no controle do vetor da dengue *Aedes aegypti* L. (DIPTERA: CULICIDAE)**. In: Congresso de Iniciação Científica, 3ª. (JC), 2010, Cáceres/MT. Anais... Cáceres/MT: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PRPPG, v. 6, 2010.

OLIVEIRA, S. S.; BUTNARIU, A. R.; COSTA, M. S. **Efeito de extratos de *Annona mucosa* (Jacq.) (Annonaceae) sobre o comportamento das larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)**. In: Congresso de Iniciação Científica,

4ª. (JC), 2011, Cáceres/MT. Anais...Cáceres/MT: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – PRPPG, v. 7, 2011.

PARANÁ, Governo Estadual. **Lei nº14037, de 20 de março de 2003**. Súmula: Institui o Código Estadual de Proteção aos Animais. Curitiba, PR: Assembléia Legislativa do Estado do Paraná. 2003. Disponível em [<http://www.inteligenciaambiental.com.br/sila/pdf/eleilegpr14037-03.pdf>]

PARRA, G.J.; GARCÍA, C. M.; COTES, J. M. **Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia**. Rev CES Med, v. 21, n. 1, p. 47-54, 2007.

PAUL, A.; HARRINGTON, L. C.; SCOTT, J. G. **Evaluation of Novel Insecticides for Control of Dengue Vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. Journal of Medical Entomology, v. 43, n. 1, p. 55-60, 2006.

PERAZA, G. G.; RODRIGUES, S. T.; MEDEIROS, S. H. L.; MUCCILLO-BAISCH, A. L. **O uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos produtos de origem natural**. Vittalle, Rio Grande, v. 19, n.1, p. 35-4, 2007.

PEREZ, D.; LEFEVRE, P.; SANCHEZ, L.; SANCHEZ, L. M.; BOELAERT, M.; KOURI, G.; VAN DER STUYFT, P. **Community participation in *Aedes aegypti* control: a sociological perspective on five years of research in the health area “26 de Julio”, Havana, Cuba**. Tropical Medicine and International Health, v. 12, n. 5, p. 664–672, 2007.

PESSANHA, J. E. M.; CAIAFFA, W. T.; CÉSAR, C. C.; PROIETTI, F. A. **Avaliação do Plano Nacional de Controle da Dengue**. Caderno de Saúde Pública, v. 25, n. 7, p. 1637-1641, 2009.

PINA, I. G.; FONSECA, A. H. **Comportamento de *Aedes aegypti* L., 1762 (diptera: culicidae) alimentados artificialmente com sangue de diferentes espécies de doadores**; Revista de Patologia Tropical, v. 28, n.1, p. 64-71, 1999.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. O.; ALVES, S. B. **Potencial de *Bacillus thuringiensis israelenses* Berliner no controle de *Aedes aegypti***. Revista de Saúde Pública, v. 37, n. 6, p. 813-816, 2003.

POTHIKASIKORN, J.; BOONPLUEANG, R.; SUEBSAENG, C.; KHAENGRANG, R.; CHAREONVIRIYAPHAP, T. **Feeding response of *Aedes aegypti* and *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) using out-of-date human blood in a membrane feeding apparatus**. Journal of Vector Ecology, v. 35, n. 1, 2010.

PROPHIRO, J. S.; SILVA, O. S.; LUNA, J. E. D.; PICCOLI, C. F.; KANIS, L. A.; NAVARRO-SILVA, M. A. ***Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temephos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of**

**urbanization.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 44, n.3, p. 300-305, 2011.

REGIS, L.; SOUZA, W. V.; FURTADO, A. F.; FONSECA, C. D.; SILVEIRA JR, J. C.; RIBEIRO JR, P. J.; MELO-SANTOS, M. A. V.; CARVALHO, M. S.; MONTEIRO, A. M. V. **An entomological surveillance system based on open spatial information for participative dengue control.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 81, n. 4, p. 655-662, 2009.

RAJU, A. K. **Community Mobilization in *Aedes aegypti* Control Programme by Source Reduction in Peri-Urban District of Lautoka, Viti Levu, Fiji Islands.** Dengue Bulletin, v. 27, 2003.

RICHARDSON, J. E.; CHATROU, L. W.; MOLS, J. B.; ERKENS, R. H. J.; PIRIE, M. D. **Historical biogeography of two cosmopolitan families of flowering plants: Annonaceae and Rhamaceae.** Philosophical Transactions of the Royal Society B, n. 359, p. 1495- 1508, 2004.

SANCHEZ, L.; PEREZ, D.; PEREZ, T.; SOSA, T.; CRUZ, C.; KOURI, G.; BOELAERT, M.; VAN DER STUYFT, P. **Intersectoral coordination in *Aedes aegypti* control. A pilot project in Havana City, Cuba.** Tropical Medicine and International Health, v. 10, n. 1, p. 82–91, 2005.

SCHNAIDER, T. B.; SOUZA, C. **Aspectos éticos da experimentação animal.** Revista Brasileira de Anestesiologia, v. 53, n. 2, p.278 – 285, 2003

SECRETÁRIA MUNICIPAL DA SAÚDE, CURITIBA. Centro de Epidemiologia. Vigilância Epidemiológica. **Dengue: Situação atual em Curitiba - 30/03/2011.** Curitiba, PR, 2011. Disponível em [<http://www.hc.ufpr.br/files/DEengue.pdf>].

SERPA; L. L. N.; ARDUINO, M. B.; MARQUES, G. R. A. M.; RAMOS, D. G. **Prevenção da dengue: implicações do uso de tela no controle de *Aedes aegypti* em reservatórios de água para consumo humano.** Boletim epidemiológico paulista, v. 7, n. 80, 2010.

SESA, SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, PARANÁ. Governo do Estado do Paraná, Superintendência de Vigilância em Saúde, Sala de Situação em Saúde. **Situação da dengue no Paraná – 2011: Informe técnico 25 – Período 2010/2011 e Período 2011/2012.** Curitiba, PR, 2011a. Disponível em [[http://www.combateadengue.pr.gov.br/arquivos/File/DengueInformeTecnico25\\_20102011.pdf](http://www.combateadengue.pr.gov.br/arquivos/File/DengueInformeTecnico25_20102011.pdf)].

SESA, SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, PARANÁ. Governo do Estado do Paraná, Superintendência de Vigilância em Saúde, Sala de Situação em Saúde. **Situação da dengue no Paraná – 2011: Informe técnico 30 – Período 2011/2012 – Semana 31 a 51 de 2011.** Curitiba, PR, 2011b. Disponível em [<http://www.combateadengue.pr.gov.br/arquivos/File/DengueInformeTecnico302011.pdf>].

SIEBRA, C. A.; NARDIN, J. M.; FLORÃO, A.; ROCHA, F. H.; BASTOS, D. Z.; OLIVEIRA, B. H.; WEFFORT-SANTOS, A. M. **Potencial antiinflamatório de *Annona glabra*, Annonaceae.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 19, n. 1A, p. 82-88, 2009.

SILVA, J. S.; MARIANO, Z. F.; SCOPEL, I. **A dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: da tentativa de erradicação às políticas de controle.** Hygeia, v. 6, n. 3, p. 163-175, 2008.

SIMÕES, F. G.; REIS, R. C.; BRITO E DIAS, R.; MESQUITA CARVALHO, J. C. 2008. **A experimentação animal.** Academia Tiradentes de Odontologia, n. 11. Disponível em [[http://www.actiradentes.com.br/revista/2008/textos/41RevistaAT O-Experimentacao\\_animal-2008.pdf](http://www.actiradentes.com.br/revista/2008/textos/41RevistaAT O-Experimentacao_animal-2008.pdf)]

SIQUEIRA, C. A. T.; OLIANI, J.; SARTORATTO, A.; QUEIROGA, C. L.; MORENO, P. R. H.; REIMÃO, J. Q.; TEMPONE, A. G.; FISCHER, D. C. H. **Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* and in vitro antiprotozoal activity.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 2, n. 1, p. 33-40, 2011.

TABORDA, C.; MEHNERT, D. U.; SILVA, C. A. **Manual de normas técnicas.** Biotério de Experimentação Animal Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas – USP, 2004.

TAUIL, P. L. **Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil.** Caderno de Saúde Pública, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; COSTA, M. C. N.; FERREIRA, L. D. A.; VASCONCELOS, P. F. C. **Avaliação de impacto de ações de combate ao *Aedes aegypti* na cidade de Salvador, Bahia.** Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 5, n. 1, 2002.

TOLEDO, M. E.; VANLERBERGHE, V.; BALLYA, A.; CEBALLOS, E.; VALDESC, L.; SEARRETC, M.; BOELAERT, M.; VAN DER STUYFT, P. **Towards active community participation in dengue vector control: results from action research in Santiago de Cuba, Cuba.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, n. 101, p. 56-63, 2007.

VALLE, D.; MARTINS, A. J.; BELINATO, T. A.; LIMA, J. B. P. 2008. **Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos.** Pest. Manag. Sci. 64: 676–680.

VILARINHOS, P. T. R.; DIAS, D. G. S.; MONNERAT, R. G. **Persistência larvicida de formulações de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* para o controle de larvas de *Aedes aegypti*.** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n. 39, p. 18, 2003.

XU, Q.; MING, Z.; DART AND, A. M.; DU, J. X. **Optimizing dosage of ketamine and xylazine in murine echocardiography.** Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, v. 34, p. 499–507, 2007

WHO, Western Pacific Region. **Action Against Dengue: Dengue Day Campaigns Across Asia.** 2011a.

WHO. Regional Committee for the Eastern Mediterranean. **Technical paper - Dengue: call for urgent interventions for a rapidly expanding emerging disease.** 58 ed., 2011b

ZAFRA-POLO, M. C.; FIGADÈRE, B.; GALLARDO, T.; TORMO, J. R.; CORTES, D. **Natural Acetogenins from Annonaceae, Synthesis and Mechanisms of Action.** *Phytochemistry*, v. 48, n. 7, p. 1087-1117, 1998.

**ANEXOS**

ANEXO 1.....	215
ANEXO 2.....	231
ANEXO 3.....	244
ANEXO 4.....	251
ANEXO 5.....	255
ANEXO 6.....	259

## ANEXO 1

### LEI Nº 9.605, DE 12 DE FEVEREIRO DE 1998.

Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências.

**O PRESIDENTE DA REPÚBLICA** Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

#### CAPÍTULO I

#### DISPOSIÇÕES GERAIS

Art. 1º (VETADO)

Art. 2º Quem, de qualquer forma, concorre para a prática dos crimes previstos nesta Lei, incide nas penas a estes cominadas, na medida da sua culpabilidade, bem como o diretor, o administrador, o membro de conselho e de órgão técnico, o auditor, o gerente, o preposto ou mandatário de pessoa jurídica, que, sabendo da conduta criminosa de outrem, deixar de impedir a sua prática, quando podia agir para evitá-la.

Art. 3º As pessoas jurídicas serão responsabilizadas administrativa, civil e penalmente conforme o disposto nesta Lei, nos casos em que a infração seja cometida por decisão de seu representante legal ou contratual, ou de seu órgão colegiado, no interesse ou benefício da sua entidade.

Parágrafo único. A responsabilidade das pessoas jurídicas não exclui a das pessoas físicas, autoras, co-autoras ou partícipes do mesmo fato.

Art. 4º Poderá ser desconsiderada a pessoa jurídica sempre que sua personalidade for obstáculo ao ressarcimento de prejuízos causados à qualidade do meio ambiente.

Art. 5º (VETADO)

#### CAPÍTULO II

#### DA APLICAÇÃO DA PENA

Art. 6º Para imposição e gradação da penalidade, a autoridade competente observará:

I - a gravidade do fato, tendo em vista os motivos da infração e suas conseqüências para a saúde pública e para o meio ambiente;

II - os antecedentes do infrator quanto ao cumprimento da legislação de interesse ambiental;

III - a situação econômica do infrator, no caso de multa.

Art. 7º As penas restritivas de direitos são autônomas e substituem as privativas de liberdade quando:

I - tratar-se de crime culposo ou for aplicada a pena privativa de liberdade inferior a quatro anos;

II - a culpabilidade, os antecedentes, a conduta social e a personalidade do condenado, bem como os motivos e as circunstâncias do crime indicarem que a substituição seja suficiente para efeitos de reprovação e prevenção do crime.

Parágrafo único. As penas restritivas de direitos a que se refere este artigo terão a mesma duração da pena privativa de liberdade substituída.

Art. 8º As penas restritivas de direito são:

- I - prestação de serviços à comunidade;
- II - interdição temporária de direitos;
- III - suspensão parcial ou total de atividades;
- IV - prestação pecuniária;
- V - recolhimento domiciliar.

Art. 9º A prestação de serviços à comunidade consiste na atribuição ao condenado de tarefas gratuitas junto a parques e jardins públicos e unidades de conservação, e, no caso de dano da coisa particular, pública ou tombada, na restauração desta, se possível.

Art. 10. As penas de interdição temporária de direito são a proibição de o condenado contratar com o Poder Público, de receber incentivos fiscais ou quaisquer outros benefícios, bem como de participar de licitações, pelo prazo de cinco anos, no caso de crimes dolosos, e de três anos, no de crimes culposos.

Art. 11. A suspensão de atividades será aplicada quando estas não estiverem obedecendo às prescrições legais.

Art. 12. A prestação pecuniária consiste no pagamento em dinheiro à vítima ou à entidade pública ou privada com fim social, de importância, fixada pelo juiz, não inferior a um salário mínimo nem superior a trezentos e sessenta salários mínimos. O valor pago será deduzido do montante de eventual reparação civil a que for condenado o infrator.

Art. 13. O recolhimento domiciliar baseia-se na autodisciplina e senso de responsabilidade do condenado, que deverá, sem vigilância, trabalhar, freqüentar curso ou exercer atividade autorizada, permanecendo recolhido nos dias e horários de folga em residência ou em qualquer local destinado a sua moradia habitual, conforme estabelecido na sentença condenatória.

Art. 14. São circunstâncias que atenuam a pena:

- I - baixo grau de instrução ou escolaridade do agente;
- II - arrependimento do infrator, manifestado pela espontânea reparação do dano, ou limitação significativa da degradação ambiental causada;
- III - comunicação prévia pelo agente do perigo iminente de degradação ambiental;
- IV - colaboração com os agentes encarregados da vigilância e do controle ambiental.

Art. 15. São circunstâncias que agravam a pena, quando não constituem ou qualificam o crime:

- I - reincidência nos crimes de natureza ambiental;
- II - ter o agente cometido a infração:
  - a) para obter vantagem pecuniária;
  - b) coagindo outrem para a execução material da infração;
  - c) afetando ou expondo a perigo, de maneira grave, a saúde pública ou o meio ambiente;
  - d) concorrendo para danos à propriedade alheia;
  - e) atingindo áreas de unidades de conservação ou áreas sujeitas, por ato do Poder Público, a regime especial de uso;



- f) atingindo áreas urbanas ou quaisquer assentamentos humanos;
- g) em período de defeso à fauna;
- h) em domingos ou feriados;
- i) à noite;
- j) em épocas de seca ou inundações;
- l) no interior do espaço territorial especialmente protegido;
- m) com o emprego de métodos cruéis para abate ou captura de animais;
- n) mediante fraude ou abuso de confiança;
- o) mediante abuso do direito de licença, permissão ou autorização ambiental;
- p) no interesse de pessoa jurídica mantida, total ou parcialmente, por verbas públicas ou beneficiada por incentivos fiscais;
- q) atingindo espécies ameaçadas, listadas em relatórios oficiais das autoridades competentes;
- r) facilitada por funcionário público no exercício de suas funções.

Art. 16. Nos crimes previstos nesta Lei, a suspensão condicional da pena pode ser aplicada nos casos de condenação a pena privativa de liberdade não superior a três anos.

Art. 17. A verificação da reparação a que se refere o § 2º do art. 78 do Código Penal será feita mediante laudo de reparação do dano ambiental, e as condições a serem impostas pelo juiz deverão relacionar-se com a proteção ao meio ambiente.

Art. 18. A multa será calculada segundo os critérios do Código Penal; se revelar-se ineficaz, ainda que aplicada no valor máximo, poderá ser aumentada até três vezes, tendo em vista o valor da vantagem econômica auferida.

Art. 19. A perícia de constatação do dano ambiental, sempre que possível, fixará o montante do prejuízo causado para efeitos de prestação de fiança e cálculo de multa.

Parágrafo único. A perícia produzida no inquérito civil ou no juízo cível poderá ser aproveitada no processo penal, instaurando-se o contraditório.

Art. 20. A sentença penal condenatória, sempre que possível, fixará o valor mínimo para reparação dos danos causados pela infração, considerando os prejuízos sofridos pelo ofendido ou pelo meio ambiente.

Parágrafo único. Transitada em julgado a sentença condenatória, a execução poderá efetuar-se pelo valor fixado nos termos do *caput*, sem prejuízo da liquidação para apuração do dano efetivamente sofrido.

Art. 21. As penas aplicáveis isolada, cumulativa ou alternativamente às pessoas jurídicas, de acordo com o disposto no art. 3º, são:

- I - multa;
- II - restritivas de direitos;
- III - prestação de serviços à comunidade.

Art. 22. As penas restritivas de direitos da pessoa jurídica são:

- I - suspensão parcial ou total de atividades;
- II - interdição temporária de estabelecimento, obra ou atividade;
- III - proibição de contratar com o Poder Público, bem como dele obter subsídios, subvenções ou doações.

§ 1º A suspensão de atividades será aplicada quando estas não estiverem obedecendo às disposições legais ou regulamentares, relativas à proteção do meio ambiente.

§ 2º A interdição será aplicada quando o estabelecimento, obra ou atividade estiver funcionando sem a devida autorização, ou em desacordo com a concedida, ou com violação de disposição legal ou regulamentar.

§ 3º A proibição de contratar com o Poder Público e dele obter subsídios, subvenções ou doações não poderá exceder o prazo de dez anos.

Art. 23. A prestação de serviços à comunidade pela pessoa jurídica consistirá em:

- I - custeio de programas e de projetos ambientais;
- II - execução de obras de recuperação de áreas degradadas;
- III - manutenção de espaços públicos;
- IV - contribuições a entidades ambientais ou culturais públicas.

Art. 24. A pessoa jurídica constituída ou utilizada, preponderantemente, com o fim de permitir, facilitar ou ocultar a prática de crime definido nesta Lei terá decretada sua liquidação forçada, seu patrimônio será considerado instrumento do crime e como tal perdido em favor do Fundo Penitenciário Nacional.

### CAPÍTULO III

#### DA APREENSÃO DO PRODUTO E DO INSTRUMENTO DE INFRAÇÃO ADMINISTRATIVA OU DE CRIME

Art. 25. Verificada a infração, serão apreendidos seus produtos e instrumentos, lavrando-se os respectivos autos.

§ 1º Os animais serão libertados em seu *habitat* ou entregues a jardins zoológicos, fundações ou entidades assemelhadas, desde que fiquem sob a responsabilidade de técnicos habilitados.

§ 2º Tratando-se de produtos perecíveis ou madeiras, serão estes avaliados e doados a instituições científicas, hospitalares, penais e outras com fins beneficentes.

§ 3º Os produtos e subprodutos da fauna não perecíveis serão destruídos ou doados a instituições científicas, culturais ou educacionais.

§ 4º Os instrumentos utilizados na prática da infração serão vendidos, garantida a sua descaracterização por meio da reciclagem.

### CAPÍTULO IV

#### DA AÇÃO E DO PROCESSO PENAL

Art. 26. Nas infrações penais previstas nesta Lei, a ação penal é pública incondicionada.

Parágrafo único. (VETADO)

Art. 27. Nos crimes ambientais de menor potencial ofensivo, a proposta de aplicação imediata de pena restritiva de direitos ou multa, prevista no art. 76 da Lei nº 9.099, de 26 de setembro de 1995, somente poderá ser formulada desde que tenha havido a prévia composição do dano ambiental, de que trata o art. 74 da mesma lei, salvo em caso de comprovada impossibilidade.

Art. 28. As disposições do art. 89 da Lei nº 9.099, de 26 de setembro de 1995, aplicam-se aos crimes de menor potencial ofensivo definidos nesta Lei, com as seguintes modificações:

I - a declaração de extinção de punibilidade, de que trata o § 5º do artigo referido no *caput*, dependerá de laudo de constatação de reparação do dano ambiental, ressalvada a impossibilidade prevista no inciso I do § 1º do mesmo artigo;

II - na hipótese de o laudo de constatação comprovar não ter sido completa a reparação, o prazo de suspensão do processo será prorrogado, até o período máximo previsto no artigo referido no *caput*, acrescido de mais um ano, com suspensão do prazo da prescrição;

III - no período de prorrogação, não se aplicarão as condições dos incisos II, III e IV do § 1º do artigo mencionado no *caput*;

IV - findo o prazo de prorrogação, proceder-se-á à lavratura de novo laudo de constatação de reparação do dano ambiental, podendo, conforme seu resultado, ser novamente prorrogado o período de suspensão, até o máximo previsto no inciso II deste artigo, observado o disposto no inciso III;

V - esgotado o prazo máximo de prorrogação, a declaração de extinção de punibilidade dependerá de laudo de constatação que comprove ter o acusado tomado as providências necessárias à reparação integral do dano.

## CAPÍTULO V

### DOS CRIMES CONTRA O MEIO AMBIENTE

#### Seção I

##### Dos Crimes contra a Fauna

Art. 29. Matar, perseguir, caçar, apanhar, utilizar espécimes da fauna silvestre, nativos ou em rota migratória, sem a devida permissão, licença ou autorização da autoridade competente, ou em desacordo com a obtida:

Pena - detenção de seis meses a um ano, e multa.

§ 1º Incorre nas mesmas penas:

I - quem impede a procriação da fauna, sem licença, autorização ou em desacordo com a obtida;

II - quem modifica, danifica ou destrói ninho, abrigo ou criadouro natural;

III - quem vende, expõe à venda, exporta ou adquire, guarda, tem em cativeiro ou depósito, utiliza ou transporta ovos, larvas ou espécimes da fauna silvestre, nativa ou em rota migratória, bem como produtos e objetos dela oriundos, provenientes de criadouros não autorizados ou sem a devida permissão, licença ou autorização da autoridade competente.

§ 2º No caso de guarda doméstica de espécie silvestre não considerada ameaçada de extinção, pode o juiz, considerando as circunstâncias, deixar de aplicar a pena.

§ 3º São espécimes da fauna silvestre todos aqueles pertencentes às espécies nativas, migratórias e quaisquer outras, aquáticas ou terrestres, que tenham todo ou parte de seu ciclo de vida ocorrendo dentro dos limites do território brasileiro, ou águas jurisdicionais brasileiras.

§ 4º A pena é aumentada de metade, se o crime é praticado:

I - contra espécie rara ou considerada ameaçada de extinção, ainda que somente no local da infração;

II - em período proibido à caça;

III - durante a noite;

IV - com abuso de licença;

V - em unidade de conservação;

VI - com emprego de métodos ou instrumentos capazes de provocar destruição em massa.

§ 5º A pena é aumentada até o triplo, se o crime decorre do exercício de caça profissional.

§ 6º As disposições deste artigo não se aplicam aos atos de pesca.

Art. 30. Exportar para o exterior peles e couros de anfíbios e répteis em bruto, sem a autorização da autoridade ambiental competente:

Pena - reclusão, de um a três anos, e multa.

Art. 31. Introduzir espécime animal no País, sem parecer técnico oficial favorável e licença expedida por autoridade competente:

Pena - detenção, de três meses a um ano, e multa.

Art. 32. Praticar ato de abuso, maus-tratos, ferir ou mutilar animais silvestres, domésticos ou domesticados, nativos ou exóticos:

Pena - detenção, de três meses a um ano, e multa.

§ 1º Incorre nas mesmas penas quem realiza experiência dolorosa ou cruel em animal vivo, ainda que para fins didáticos ou científicos, quando existirem recursos alternativos.

§ 2º A pena é aumentada de um sexto a um terço, se ocorre morte do animal.

Art. 33. Provocar, pela emissão de efluentes ou carreamento de materiais, o perecimento de espécimes da fauna aquática existentes em rios, lagos, açudes, lagoas, baías ou águas jurisdicionais brasileiras:

Pena - detenção, de um a três anos, ou multa, ou ambas cumulativamente.

Parágrafo único. Incorre nas mesmas penas:

I - quem causa degradação em viveiros, açudes ou estações de aquicultura de domínio público;

II - quem explora campos naturais de invertebrados aquáticos e algas, sem licença, permissão ou autorização da autoridade competente;

III - quem fundeia embarcações ou lança detritos de qualquer natureza sobre bancos de moluscos ou corais, devidamente demarcados em carta náutica.

Art. 34. Pescar em período no qual a pesca seja proibida ou em lugares interditados por órgão competente:

Pena - detenção de um ano a três anos ou multa, ou ambas as penas cumulativamente.

Parágrafo único. Incorre nas mesmas penas quem:

I - pesca espécies que devam ser preservadas ou espécimes com tamanhos inferiores aos permitidos;

II - pesca quantidades superiores às permitidas, ou mediante a utilização de aparelhos, petrechos, técnicas e métodos não permitidos;

III - transporta, comercializa, beneficia ou industrializa espécimes provenientes da coleta, apanha e pesca proibidas.

Art. 35. Pescar mediante a utilização de:

I - explosivos ou substâncias que, em contato com a água, produzam efeito semelhante;

II - substâncias tóxicas, ou outro meio proibido pela autoridade competente:

Pena - reclusão de um ano a cinco anos.

Art. 36. Para os efeitos desta Lei, considera-se pesca todo ato tendente a retirar, extrair, coletar, apanhar, apreender ou capturar espécimes dos grupos

dos peixes, crustáceos, moluscos e vegetais hidróbios, suscetíveis ou não de aproveitamento econômico, ressalvadas as espécies ameaçadas de extinção, constantes nas listas oficiais da fauna e da flora.

Art. 37. Não é crime o abate de animal, quando realizado:

I - em estado de necessidade, para saciar a fome do agente ou de sua família;

II - para proteger lavouras, pomares e rebanhos da ação predatória ou destruidora de animais, desde que legal e expressamente autorizado pela autoridade competente;

III - (VETADO)

IV - por ser nocivo o animal, desde que assim caracterizado pelo órgão competente.

Seção II

Dos Crimes contra a Flora

Art. 38. Destruir ou danificar floresta considerada de preservação permanente, mesmo que em formação, ou utilizá-la com infringência das normas de proteção:

Pena - detenção, de um a três anos, ou multa, ou ambas as penas cumulativamente.

Parágrafo único. Se o crime for culposo, a pena será reduzida à metade.

Art. 38-A. Destruir ou danificar vegetação primária ou secundária, em estágio avançado ou médio de regeneração, do Bioma Mata Atlântica, ou utilizá-la com infringência das normas de proteção: (Incluído pela Lei nº 11.428, de 2006).

Pena - detenção, de 1 (um) a 3 (três) anos, ou multa, ou ambas as penas cumulativamente. (Incluído pela Lei nº 11.428, de 2006).

Parágrafo único. Se o crime for culposo, a pena será reduzida à metade. (Incluído pela Lei nº 11.428, de 2006).

Art. 39. Cortar árvores em floresta considerada de preservação permanente, sem permissão da autoridade competente:

Pena - detenção, de um a três anos, ou multa, ou ambas as penas cumulativamente.

Art. 40. Causar dano direto ou indireto às Unidades de Conservação e às áreas de que trata o art. 27 do Decreto nº 99.274, de 6 de junho de 1990, independentemente de sua localização:

Pena - reclusão, de um a cinco anos.

§ 1º Entende-se por Unidades de Conservação de Proteção Integral as Estações Ecológicas, as Reservas Biológicas, os Parques Nacionais, os Monumentos Naturais e os Refúgios de Vida Silvestre. (Redação dada pela Lei nº 9.985, de 18.7.2000)

§ 2º A ocorrência de dano afetando espécies ameaçadas de extinção no interior das Unidades de Conservação de Proteção Integral será considerada circunstância agravante para a fixação da pena. (Redação dada pela Lei nº 9.985, de 18.7.2000)

§ 3º Se o crime for culposo, a pena será reduzida à metade.

Art. 40-A. (VETADO) (Artigo incluído pela Lei nº 9.985, de 18.7.2000)

§ 1º Entende-se por Unidades de Conservação de Uso Sustentável as Áreas de Proteção Ambiental, as Áreas de Relevante Interesse Ecológico, as Florestas Nacionais, as Reservas Extrativistas, as Reservas de Fauna, as

Reservas de Desenvolvimento Sustentável e as Reservas Particulares do Patrimônio Natural. (Parágrafo incluído pela Lei nº 9.985, de 18.7.2000)

§ 2º A ocorrência de dano afetando espécies ameaçadas de extinção no interior das Unidades de Conservação de Uso Sustentável será considerada circunstância agravante para a fixação da pena. (Parágrafo incluído pela Lei nº 9.985, de 18.7.2000)

§ 3º Se o crime for culposo, a pena será reduzida à metade. (Parágrafo incluído pela Lei nº 9.985, de 18.7.2000)

Art. 41. Provocar incêndio em mata ou floresta:

Pena - reclusão, de dois a quatro anos, e multa.

Parágrafo único. Se o crime é culposo, a pena é de detenção de seis meses a um ano, e multa.

Art. 42. Fabricar, vender, transportar ou soltar balões que possam provocar incêndios nas florestas e demais formas de vegetação, em áreas urbanas ou qualquer tipo de assentamento humano:

Pena - detenção de um a três anos ou multa, ou ambas as penas cumulativamente.

Art. 43. (VETADO)

Art. 44. Extrair de florestas de domínio público ou consideradas de preservação permanente, sem prévia autorização, pedra, areia, cal ou qualquer espécie de minerais:

Pena - detenção, de seis meses a um ano, e multa.

Art. 45. Cortar ou transformar em carvão madeira de lei, assim classificada por ato do Poder Público, para fins industriais, energéticos ou para qualquer outra exploração, econômica ou não, em desacordo com as determinações legais:

Pena - reclusão, de um a dois anos, e multa.

Art. 46. Receber ou adquirir, para fins comerciais ou industriais, madeira, lenha, carvão e outros produtos de origem vegetal, sem exigir a exibição de licença do vendedor, outorgada pela autoridade competente, e sem munir-se da via que deverá acompanhar o produto até final beneficiamento:

Pena - detenção, de seis meses a um ano, e multa.

Parágrafo único. Incorre nas mesmas penas quem vende, expõe à venda, tem em depósito, transporta ou guarda madeira, lenha, carvão e outros produtos de origem vegetal, sem licença válida para todo o tempo da viagem ou do armazenamento, outorgada pela autoridade competente.

Art. 47. (VETADO)

Art. 48. Impedir ou dificultar a regeneração natural de florestas e demais formas de vegetação:

Pena - detenção, de seis meses a um ano, e multa.

Art. 49. Destruir, danificar, lesar ou maltratar, por qualquer modo ou meio, plantas de ornamentação de logradouros públicos ou em propriedade privada alheia:

Pena - detenção, de três meses a um ano, ou multa, ou ambas as penas cumulativamente.

Parágrafo único. No crime culposo, a pena é de um a seis meses, ou multa.

Art. 50. Destruir ou danificar florestas nativas ou plantadas ou vegetação fixadora de dunas, protetora de mangues, objeto de especial preservação:

Pena - detenção, de três meses a um ano, e multa.

Art. 50-A. Desmatar, explorar economicamente ou degradar floresta, plantada ou nativa, em terras de domínio público ou devolutas, sem autorização do órgão competente: (Incluído pela Lei nº 11.284, de 2006)

Pena - reclusão de 2 (dois) a 4 (quatro) anos e multa. (Incluído pela Lei nº 11.284, de 2006)

§ 1º Não é crime a conduta praticada quando necessária à subsistência imediata pessoal do agente ou de sua família. (Incluído pela Lei nº 11.284, de 2006)

§ 2º Se a área explorada for superior a 1.000 ha (mil hectares), a pena será aumentada de 1 (um) ano por milhar de hectare. (Incluído pela Lei nº 11.284, de 2006)

Art. 51. Comercializar motosserra ou utilizá-la em florestas e nas demais formas de vegetação, sem licença ou registro da autoridade competente:

Pena - detenção, de três meses a um ano, e multa.

Art. 52. Penetrar em Unidades de Conservação conduzindo substâncias ou instrumentos próprios para caça ou para exploração de produtos ou subprodutos florestais, sem licença da autoridade competente:

Pena - detenção, de seis meses a um ano, e multa.

Art. 53. Nos crimes previstos nesta Seção, a pena é aumentada de um sexto a um terço se:

I - do fato resulta a diminuição de águas naturais, a erosão do solo ou a modificação do regime climático;

II - o crime é cometido:

a) no período de queda das sementes;

b) no período de formação de vegetações;

c) contra espécies raras ou ameaçadas de extinção, ainda que a ameaça ocorra somente no local da infração;

d) em época de seca ou inundação;

e) durante a noite, em domingo ou feriado.

### Seção III

#### Da Poluição e outros Crimes Ambientais

Art. 54. Causar poluição de qualquer natureza em níveis tais que resultem ou possam resultar em danos à saúde humana, ou que provoquem a mortandade de animais ou a destruição significativa da flora:

Pena - reclusão, de um a quatro anos, e multa.

§ 1º Se o crime é culposo:

Pena - detenção, de seis meses a um ano, e multa.

§ 2º Se o crime:

I - tornar uma área, urbana ou rural, imprópria para a ocupação humana;

II - causar poluição atmosférica que provoque a retirada, ainda que momentânea, dos habitantes das áreas afetadas, ou que cause danos diretos à saúde da população;

III - causar poluição hídrica que torne necessária a interrupção do abastecimento público de água de uma comunidade;

IV - dificultar ou impedir o uso público das praias;

V - ocorrer por lançamento de resíduos sólidos, líquidos ou gasosos, ou detritos, óleos ou substâncias oleosas, em desacordo com as exigências estabelecidas em leis ou regulamentos:

Pena - reclusão, de um a cinco anos.

§ 3º Incorre nas mesmas penas previstas no parágrafo anterior quem deixar de adotar, quando assim o exigir a autoridade competente, medidas de precaução em caso de risco de dano ambiental grave ou irreversível.

Art. 55. Executar pesquisa, lavra ou extração de recursos minerais sem a competente autorização, permissão, concessão ou licença, ou em desacordo com a obtida:

Pena - detenção, de seis meses a um ano, e multa.

Parágrafo único. Nas mesmas penas incorre quem deixa de recuperar a área pesquisada ou explorada, nos termos da autorização, permissão, licença, concessão ou determinação do órgão competente.

Art. 56. Produzir, processar, embalar, importar, exportar, comercializar, fornecer, transportar, armazenar, guardar, ter em depósito ou usar produto ou substância tóxica, perigosa ou nociva à saúde humana ou ao meio ambiente, em desacordo com as exigências estabelecidas em leis ou nos seus regulamentos:

Pena - reclusão, de um a quatro anos, e multa.

§ 1º Nas mesmas penas incorre quem: (Redação dada pela Lei nº 12.305, de 2010)

I - abandona os produtos ou substâncias referidos no **caput** ou os utiliza em desacordo com as normas ambientais ou de segurança; (Incluído pela Lei nº 12.305, de 2010)

II - manipula, acondiciona, armazena, coleta, transporta, reutiliza, recicla ou dá destinação final a resíduos perigosos de forma diversa da estabelecida em lei ou regulamento. (Incluído pela Lei nº 12.305, de 2010)

§ 2º Se o produto ou a substância for nuclear ou radioativa, a pena é aumentada de um sexto a um terço.

§ 3º Se o crime é culposo:

Pena - detenção, de seis meses a um ano, e multa.

Art. 57. (VETADO)

Art. 58. Nos crimes dolosos previstos nesta Seção, as penas serão aumentadas:

I - de um sexto a um terço, se resulta dano irreversível à flora ou ao meio ambiente em geral;

II - de um terço até a metade, se resulta lesão corporal de natureza grave em outrem;

III - até o dobro, se resultar a morte de outrem.

Parágrafo único. As penalidades previstas neste artigo somente serão aplicadas se do fato não resultar crime mais grave.

Art. 59. (VETADO)

Art. 60. Construir, reformar, ampliar, instalar ou fazer funcionar, em qualquer parte do território nacional, estabelecimentos, obras ou serviços potencialmente poluidores, sem licença ou autorização dos órgãos ambientais competentes, ou contrariando as normas legais e regulamentares pertinentes:

Pena - detenção, de um a seis meses, ou multa, ou ambas as penas cumulativamente.

Art. 61. Disseminar doença ou praga ou espécies que possam causar dano à agricultura, à pecuária, à fauna, à flora ou aos ecossistemas:

Pena - reclusão, de um a quatro anos, e multa.

#### Seção IV

#### Dos Crimes contra o Ordenamento Urbano e o Patrimônio Cultural



Art. 62. Destruir, inutilizar ou deteriorar:

I - bem especialmente protegido por lei, ato administrativo ou decisão judicial;

II - arquivo, registro, museu, biblioteca, pinacoteca, instalação científica ou similar protegido por lei, ato administrativo ou decisão judicial:

Pena - reclusão, de um a três anos, e multa.

Parágrafo único. Se o crime for culposo, a pena é de seis meses a um ano de detenção, sem prejuízo da multa.

Art. 63. Alterar o aspecto ou estrutura de edificação ou local especialmente protegido por lei, ato administrativo ou decisão judicial, em razão de seu valor paisagístico, ecológico, turístico, artístico, histórico, cultural, religioso, arqueológico, etnográfico ou monumental, sem autorização da autoridade competente ou em desacordo com a concedida:

Pena - reclusão, de um a três anos, e multa.

Art. 64. Promover construção em solo não edificável, ou no seu entorno, assim considerado em razão de seu valor paisagístico, ecológico, artístico, turístico, histórico, cultural, religioso, arqueológico, etnográfico ou monumental, sem autorização da autoridade competente ou em desacordo com a concedida:

Pena - detenção, de seis meses a um ano, e multa.

Art. 65. Pichar ou por outro meio conspurcar edificação ou monumento urbano: (Redação dada pela Lei nº 12.408, de 2011)

Pena - detenção, de 3 (três) meses a 1 (um) ano, e multa. (Redação dada pela Lei nº 12.408, de 2011)

§ 1º Se o ato for realizado em monumento ou coisa tombada em virtude do seu valor artístico, arqueológico ou histórico, a pena é de 6 (seis) meses a 1 (um) ano de detenção e multa. (Renumerado do parágrafo único pela Lei nº 12.408, de 2011)

§ 2º Não constitui crime a prática de grafite realizada com o objetivo de valorizar o patrimônio público ou privado mediante manifestação artística, desde que consentida pelo proprietário e, quando couber, pelo locatário ou arrendatário do bem privado e, no caso de bem público, com a autorização do órgão competente e a observância das posturas municipais e das normas editadas pelos órgãos governamentais responsáveis pela preservação e conservação do patrimônio histórico e artístico nacional. (Incluído pela Lei nº 12.408, de 2011)

## Seção V

### Dos Crimes contra a Administração Ambiental

Art. 66. Fazer o funcionário público afirmação falsa ou enganosa, omitir a verdade, sonegar informações ou dados técnico-científicos em procedimentos de autorização ou de licenciamento ambiental:

Pena - reclusão, de um a três anos, e multa.

Art. 67. Conceder o funcionário público licença, autorização ou permissão em desacordo com as normas ambientais, para as atividades, obras ou serviços cuja realização depende de ato autorizativo do Poder Público:

Pena - detenção, de um a três anos, e multa.

Parágrafo único. Se o crime é culposo, a pena é de três meses a um ano de detenção, sem prejuízo da multa.

Art. 68. Deixar, aquele que tiver o dever legal ou contratual de fazê-lo, de cumprir obrigação de relevante interesse ambiental:

Pena - detenção, de um a três anos, e multa.

Parágrafo único. Se o crime é culposos, a pena é de três meses a um ano, sem prejuízo da multa.

Art. 69. Obstar ou dificultar a ação fiscalizadora do Poder Público no trato de questões ambientais:

Pena - detenção, de um a três anos, e multa.

Art. 69-A. Elaborar ou apresentar, no licenciamento, concessão florestal ou qualquer outro procedimento administrativo, estudo, laudo ou relatório ambiental total ou parcialmente falso ou enganoso, inclusive por omissão: (Incluído pela Lei nº 11.284, de 2006)

Pena - reclusão, de 3 (três) a 6 (seis) anos, e multa. (Incluído pela Lei nº 11.284, de 2006)

§ 1º Se o crime é culposos: (Incluído pela Lei nº 11.284, de 2006)

Pena - detenção, de 1 (um) a 3 (três) anos. (Incluído pela Lei nº 11.284, de 2006)

§ 2º A pena é aumentada de 1/3 (um terço) a 2/3 (dois terços), se há dano significativo ao meio ambiente, em decorrência do uso da informação falsa, incompleta ou enganosa. (Incluído pela Lei nº 11.284, de 2006)

## CAPÍTULO VI

### DA INFRAÇÃO ADMINISTRATIVA

Art. 70. Considera-se infração administrativa ambiental toda ação ou omissão que viole as regras jurídicas de uso, gozo, promoção, proteção e recuperação do meio ambiente.

§ 1º São autoridades competentes para lavrar auto de infração ambiental e instaurar processo administrativo os funcionários de órgãos ambientais integrantes do Sistema Nacional de Meio Ambiente - SISNAMA, designados para as atividades de fiscalização, bem como os agentes das Capitâncias dos Portos, do Ministério da Marinha.

§ 2º Qualquer pessoa, constatando infração ambiental, poderá dirigir representação às autoridades relacionadas no parágrafo anterior, para efeito do exercício do seu poder de polícia.

§ 3º A autoridade ambiental que tiver conhecimento de infração ambiental é obrigada a promover a sua apuração imediata, mediante processo administrativo próprio, sob pena de co-responsabilidade.

§ 4º As infrações ambientais são apuradas em processo administrativo próprio, assegurado o direito de ampla defesa e o contraditório, observadas as disposições desta Lei.

Art. 71. O processo administrativo para apuração de infração ambiental deve observar os seguintes prazos máximos:

I - vinte dias para o infrator oferecer defesa ou impugnação contra o auto de infração, contados da data da ciência da autuação;

II - trinta dias para a autoridade competente julgar o auto de infração, contados da data da sua lavratura, apresentada ou não a defesa ou impugnação;

III - vinte dias para o infrator recorrer da decisão condenatória à instância superior do Sistema Nacional do Meio Ambiente - SISNAMA, ou à Diretoria de Portos e Costas, do Ministério da Marinha, de acordo com o tipo de autuação;

IV – cinco dias para o pagamento de multa, contados da data do recebimento da notificação.

Art. 72. As infrações administrativas são punidas com as seguintes sanções, observado o disposto no art. 6º:

I - advertência;

II - multa simples;

III - multa diária;

IV - apreensão dos animais, produtos e subprodutos da fauna e flora, instrumentos, petrechos, equipamentos ou veículos de qualquer natureza utilizados na infração;

V - destruição ou inutilização do produto;

VI - suspensão de venda e fabricação do produto;

VII - embargo de obra ou atividade;

VIII - demolição de obra;

IX - suspensão parcial ou total de atividades;

X – (VETADO)

XI - restritiva de direitos.

§ 1º Se o infrator cometer, simultaneamente, duas ou mais infrações, serão aplicadas, cumulativamente, as sanções a elas cominadas.

§ 2º A advertência será aplicada pela inobservância das disposições desta Lei e da legislação em vigor, ou de preceitos regulamentares, sem prejuízo das demais sanções previstas neste artigo.

§ 3º A multa simples será aplicada sempre que o agente, por negligência ou dolo:

I - advertido por irregularidades que tenham sido praticadas, deixar de saná-las, no prazo assinalado por órgão competente do SISNAMA ou pela Capitania dos Portos, do Ministério da Marinha;

II - opuser embaraço à fiscalização dos órgãos do SISNAMA ou da Capitania dos Portos, do Ministério da Marinha.

§ 4º A multa simples pode ser convertida em serviços de preservação, melhoria e recuperação da qualidade do meio ambiente.

§ 5º A multa diária será aplicada sempre que o cometimento da infração se prolongar no tempo.

§ 6º A apreensão e destruição referidas nos incisos IV e V do *caput* obedecerão ao disposto no art. 25 desta Lei.

§ 7º As sanções indicadas nos incisos VI a IX do *caput* serão aplicadas quando o produto, a obra, a atividade ou o estabelecimento não estiverem obedecendo às prescrições legais ou regulamentares.

§ 8º As sanções restritivas de direito são:

I - suspensão de registro, licença ou autorização;

II - cancelamento de registro, licença ou autorização;

III - perda ou restrição de incentivos e benefícios fiscais;

IV - perda ou suspensão da participação em linhas de financiamento em estabelecimentos oficiais de crédito;

V - proibição de contratar com a Administração Pública, pelo período de até três anos.

Art. 73. Os valores arrecadados em pagamento de multas por infração ambiental serão revertidos ao Fundo Nacional do Meio Ambiente, criado pela Lei nº 7.797, de 10 de julho de 1989, Fundo Naval, criado pelo Decreto nº 20.923,

de 8 de janeiro de 1932, fundos estaduais ou municipais de meio ambiente, ou correlatos, conforme dispuser o órgão arrecadador.

Art. 74. A multa terá por base a unidade, hectare, metro cúbico, quilograma ou outra medida pertinente, de acordo com o objeto jurídico lesado.

Art. 75. O valor da multa de que trata este Capítulo será fixado no regulamento desta Lei e corrigido periodicamente, com base nos índices estabelecidos na legislação pertinente, sendo o mínimo de R\$ 50,00 (cinquenta reais) e o máximo de R\$ 50.000.000,00 (cinquenta milhões de reais).

Art. 76. O pagamento de multa imposta pelos Estados, Municípios, Distrito Federal ou Territórios substitui a multa federal na mesma hipótese de incidência.

## CAPÍTULO VII

### DA COOPERAÇÃO INTERNACIONAL PARA A PRESERVAÇÃO DO MEIO AMBIENTE

Art. 77. Resguardados a soberania nacional, a ordem pública e os bons costumes, o Governo brasileiro prestará, no que concerne ao meio ambiente, a necessária cooperação a outro país, sem qualquer ônus, quando solicitado para:

I - produção de prova;

II - exame de objetos e lugares;

III - informações sobre pessoas e coisas;

IV - presença temporária da pessoa presa, cujas declarações tenham relevância para a decisão de uma causa;

V - outras formas de assistência permitidas pela legislação em vigor ou pelos tratados de que o Brasil seja parte.

§ 1º A solicitação de que trata este artigo será dirigida ao Ministério da Justiça, que a remeterá, quando necessário, ao órgão judiciário competente para decidir a seu respeito, ou a encaminhará à autoridade capaz de atendê-la.

§ 2º A solicitação deverá conter:

I - o nome e a qualificação da autoridade solicitante;

II - o objeto e o motivo de sua formulação;

III - a descrição sumária do procedimento em curso no país solicitante;

IV - a especificação da assistência solicitada;

V - a documentação indispensável ao seu esclarecimento, quando for o caso.

Art. 78. Para a consecução dos fins visados nesta Lei e especialmente para a reciprocidade da cooperação internacional, deve ser mantido sistema de comunicações apto a facilitar o intercâmbio rápido e seguro de informações com órgãos de outros países.

## CAPÍTULO VIII

### DISPOSIÇÕES FINAIS

Art. 79. Aplicam-se subsidiariamente a esta Lei as disposições do Código Penal e do Código de Processo Penal.

Art. 79-A. Para o cumprimento do disposto nesta Lei, os órgãos ambientais integrantes do SISNAMA, responsáveis pela execução de programas e projetos e pelo controle e fiscalização dos estabelecimentos e das atividades suscetíveis

de degradarem a qualidade ambiental, ficam autorizados a celebrar, com força de título executivo extrajudicial, termo de compromisso com pessoas físicas ou jurídicas responsáveis pela construção, instalação, ampliação e funcionamento de estabelecimentos e atividades utilizadores de recursos ambientais, considerados efetiva ou potencialmente poluidores. (Incluído pela Medida Provisória nº 2.163-41, de 23.8.2001)

§ 1º O termo de compromisso a que se refere este artigo destinar-se-á, exclusivamente, a permitir que as pessoas físicas e jurídicas mencionadas no **caput** possam promover as necessárias correções de suas atividades, para o atendimento das exigências impostas pelas autoridades ambientais competentes, sendo obrigatório que o respectivo instrumento disponha sobre: (Incluído pela Medida Provisória nº 2.163-41, de 23.8.2001)

I - o nome, a qualificação e o endereço das partes compromissadas e dos respectivos representantes legais; (Incluído pela Medida Provisória nº 2.163-41, de 23.8.2001)

II - o prazo de vigência do compromisso, que, em função da complexidade das obrigações nele fixadas, poderá variar entre o mínimo de noventa dias e o máximo de três anos, com possibilidade de prorrogação por igual período; (Incluído pela Medida Provisória nº 2.163-41, de 23.8.2001)

III - a descrição detalhada de seu objeto, o valor do investimento previsto e o cronograma físico de execução e de implantação das obras e serviços exigidos, com metas trimestrais a serem atingidas; (Incluído pela Medida Provisória nº 2.163-41, de 23.8.2001)

IV - as multas que podem ser aplicadas à pessoa física ou jurídica compromissada e os casos de rescisão, em decorrência do não-cumprimento das obrigações nele pactuadas; (Incluído pela Medida Provisória nº 2.163-41, de 23.8.2001)

V - o valor da multa de que trata o inciso IV não poderá ser superior ao valor do investimento previsto; (Incluído pela Medida Provisória nº 2.163-41, de 23.8.2001)

VI - o foro competente para dirimir litígios entre as partes. (Incluído pela Medida Provisória nº 2.163-41, de 23.8.2001)

§ 2º No tocante aos empreendimentos em curso até o dia 30 de março de 1998, envolvendo construção, instalação, ampliação e funcionamento de estabelecimentos e atividades utilizadores de recursos ambientais, considerados efetiva ou potencialmente poluidores, a assinatura do termo de compromisso deverá ser requerida pelas pessoas físicas e jurídicas interessadas, até o dia 31 de dezembro de 1998, mediante requerimento escrito protocolizado junto aos órgãos competentes do SISNAMA, devendo ser firmado pelo dirigente máximo do estabelecimento. (Incluído pela Medida Provisória nº 2.163-41, de 23.8.2001)

§ 3º Da data da protocolização do requerimento previsto no § 2º e enquanto perdurar a vigência do correspondente termo de compromisso, ficarão suspensas, em relação aos fatos que deram causa à celebração do instrumento, a aplicação de sanções administrativas contra a pessoa física ou jurídica que o houver firmado. (Incluído pela Medida Provisória nº 2.163-41, de 23.8.2001)

§ 4º A celebração do termo de compromisso de que trata este artigo não impede a execução de eventuais multas aplicadas antes da protocolização do requerimento. (Incluído pela Medida Provisória nº 2.163-41, de 23.8.2001)

§ 5º Considera-se rescindido de pleno direito o termo de compromisso, quando descumprida qualquer de suas cláusulas, ressalvado o caso fortuito ou de força maior. (Incluído pela Medida Provisória nº 2.163-41, de 23.8.2001)

§ 6º O termo de compromisso deverá ser firmado em até noventa dias, contados da protocolização do requerimento. (Incluído pela Medida Provisória nº 2.163-41, de 23.8.2001)

§ 7º O requerimento de celebração do termo de compromisso deverá conter as informações necessárias à verificação da sua viabilidade técnica e jurídica, sob pena de indeferimento do plano. (Incluído pela Medida Provisória nº 2.163-41, de 23.8.2001)

§ 8º Sob pena de ineficácia, os termos de compromisso deverão ser publicados no órgão oficial competente, mediante extrato. (Incluído pela Medida Provisória nº 2.163-41, de 23.8.2001)

Art. 80. O Poder Executivo regulamentará esta Lei no prazo de noventa dias a contar de sua publicação.

Art. 81. (VETADO)

Art. 82. Revogam-se as disposições em contrário.

Brasília, 12 de fevereiro de 1998; 177º da Independência e 110º da República.

FERNANDO HENRIQUE CARDOSO  
*Gustavo Krause*

Este texto não substitui o publicado no D.O.U. de 13.2.1998 e retificado no DOU de 17.2.1998

## ANEXO 2

### DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências.

**O PRESIDENTE DA REPÚBLICA**, no uso das atribuições que lhe confere o art. 84, incisos IV e VI, alínea "a", da Constituição, e tendo em vista o disposto no art. 25 da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008,

**DECRETA:**

#### CAPITULO I

#### DAS DISPOSIÇÕES PRELIMINARES E GERAIS

Art. 1º As atividades e projetos que envolvam a criação e utilização de animais de laboratório pertencentes ao filo **Chordata**, subfilo **Vertebrata**, exceto o homem, destinados ao ensino e à pesquisa científica ficam restritas ao âmbito de entidades de direito público ou privado, que serão responsáveis pela obediência aos preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, deste Decreto e de normas complementares, bem como pelas eventuais conseqüências ou efeitos advindos de seu descumprimento.

§ 1º As atividades e projetos de que trata este artigo são vedados a pessoas físicas em atuação autônoma e independente, ainda que mantenham vínculo empregatício ou qualquer outro com pessoas jurídicas.

§ 2º As instituições interessadas em realizar atividade prevista neste Decreto deverão requerer seu credenciamento junto ao Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal - CONCEA.

Art. 2º Além das definições previstas na Lei nº 11.794, de 2008, considera-se, para os efeitos deste Decreto:

I - subfilo **Vertebrata**: animais cordados que têm, como características exclusivas, um encéfalo grande encerrado numa caixa craniana e uma coluna vertebral, excluindo os primatas humanos;

II - métodos alternativos: procedimentos validados e internacionalmente aceitos que garantam resultados semelhantes e com reprodutibilidade para atingir, sempre que possível, a mesma meta dos procedimentos substituídos por metodologias que:

- a) não utilizem animais;
- b) usem espécies de ordens inferiores;
- c) empreguem menor número de animais;
- d) utilizem sistemas orgânicos **ex vivos**; ou
- e) diminuam ou eliminem o desconforto;

III - atividades de pesquisa científica - todas aquelas relacionadas com ciência básica, ciência aplicada, desenvolvimento tecnológico, produção e controle de qualidade de drogas, medicamentos, alimentos, imunobiológicos, instrumentos, ou quaisquer outros testados em animais, conforme definido em regulamento próprio.

Parágrafo único. O termo pesquisa científica adotado neste Decreto inclui as atividades de desenvolvimento tecnológico, de acordo com a definição constante do § 2º do art. 1º da Lei nº 11.794, de 2008, e a do inciso III deste artigo.

## CAPÍTULO II

### DO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CONCEA

#### Seção I

##### Da Natureza e Finalidade

Art. 3º O CONCEA, órgão integrante da estrutura do Ministério da Ciência e Tecnologia, é instância colegiada multidisciplinar de caráter normativo, consultivo, deliberativo e recursal, para coordenar os procedimentos de uso científico de animais.

#### Seção II

##### Das Atribuições

Art. 4º Compete ao CONCEA:

I - formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária e ética de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica;

II - credenciar instituições para criação ou utilização de animais com finalidade de ensino ou pesquisa científica;

III - monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino ou pesquisa científica;

IV - estabelecer e rever, periodicamente, as normas para uso e cuidados com animais para ensino e pesquisa científica, em consonância com as convenções internacionais das quais o Brasil seja signatário;

V - estabelecer e rever, periodicamente, normas técnicas para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal, bem como sobre as condições de trabalho em tais instalações;

VI - estabelecer e rever, periodicamente, normas para credenciamento de instituições que criem ou utilizem animais para ensino e pesquisa;

VII - manter cadastro atualizado de protocolos experimentais ou pedagógicos, aplicáveis aos procedimentos de ensino e projetos de pesquisa científica realizados ou em andamento no País, assim como dos pesquisadores, a partir de informações remetidas pelas Comissões de Ética no Uso de Animais - CEUAs, de que trata o art. 8º da Lei nº 11.794, de 2008;

VIII - elaborar e submeter ao Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, para aprovação, o seu regimento interno;

IX - assessorar o Poder Executivo a respeito das atividades de ensino e pesquisa científica tratadas na Lei nº 11.794, de 2008;

X - administrar, por sua Secretaria-Executiva, o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais – CIUCA, de que trata o art. 41, destinado ao



registro obrigatório das instituições que exerçam atividades de criação ou utilização de animais em ensino ou pesquisa científica;

XI - apreciar e decidir recursos interpostos contra decisões das CEUAs, bem como de sua Secretaria-Executiva; e

XII - aplicar as sanções previstas nos arts. 17 e 18 da Lei nº 11.794, de 2008.

Art. 5º Cabe ao Presidente do CONCEA, entre outras atribuições a serem definidas no regimento interno:

I - representar o CONCEA;

II - convocar as reuniões do CONCEA e aprovar as respectivas pautas propostas pela Secretaria-Executiva;

III - presidir, com direito a voto de qualidade, a reunião plenária do CONCEA;

IV - convidar a participar das reuniões e debates, consultado o CONCEA, sem direito a voto, pessoas que possam contribuir para as discussões dos assuntos tratados;

V - delegar suas atribuições.

Art. 6º Cabe ao Secretário-Executivo do CONCEA, entre outras atribuições a serem definidas no regimento interno:

I - garantir a publicidade e o acesso aos atos do CONCEA;

II - determinar a prestação de informações e franquear acesso a documentos, solicitados pelos órgãos de registro e fiscalização.

Art. 7º Cabe ao Coordenador do CONCEA, entre outras atribuições a serem definidas no regimento interno:

I - presidir a reunião plenária do CONCEA, na ausência do seu Presidente e do Secretário-Executivo do Ministério da Ciência e Tecnologia; e

II - exercer as atribuições delegadas pelo Presidente do CONCEA.

Art. 8º Cabe aos membros do CONCEA:

I - comparecer, participar e votar nas reuniões do CONCEA;

II - propor a convocação de reuniões extraordinárias do CONCEA, na forma do regimento interno;

III - examinar e relatar expedientes que lhe forem distribuídos;

IV - submeter pleitos e assuntos para a pauta das reuniões do CONCEA.

### Seção III

#### Da Composição

Art. 9º O CONCEA será presidido pelo Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia e constituído por cidadãos brasileiros, com grau acadêmico de doutor ou equivalente, nas áreas de ciências agrárias e biológicas, saúde humana e animal, biotecnologia, bioquímica ou ética, de notória atuação e saber científicos e com destacada atividade profissional nestas áreas, sendo:

I - um representante de cada um dos seguintes órgãos ou entidades, indicados pelos respectivos titulares:

a) Ministério da Ciência e Tecnologia;

b) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq;

c) Ministério da Educação;

d) Ministério do Meio Ambiente;

e) Ministério da Saúde;

f) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

- g) Conselho de Reitores das Universidades do Brasil - CRUB;
  - h) Academia Brasileira de Ciências - ABC;
  - i) Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência - SBPC;
  - j) Federação das Sociedades de Biologia Experimental - FESBE;
  - l) Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório - SBCAL, nova denominação do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;
  - m) Federação Brasileira de Indústria Farmacêutica - FEBRAFARMA, nova denominação da Federação Nacional da Indústria Farmacêutica;
- II - dois representantes das sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País.

Parágrafo único. Cada membro efetivo terá um suplente, que participará dos trabalhos na ausência do titular.

Art. 10. No exercício da presidência do CONCEA, o Ministro de Estado de Ciência e Tecnologia será substituído, nos seus impedimentos ou afastamentos, pelo Secretário-Executivo do respectivo Ministério e, nos casos dos impedimentos destes, pelo Coordenador do CONCEA.

Parágrafo único. Nos casos em que o Coordenador do CONCEA exercer a presidência do Conselho, o seu suplente terá direito a voto.

Art. 11. Os representantes de que trata o inciso II do art. 9º serão escolhidos pelo Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, a partir de lista tríplice elaborada por comissão **ad hoc**, integrada por três membros externos ao CONCEA, constituída por cidadãos brasileiros, com grau acadêmico de doutor ou equivalente e comprovada experiência profissional de, no mínimo, cinco anos em atividades relacionadas à utilização ética de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica.

Art. 12. Os representantes de que trata o inciso I do art. 9º, e seus suplentes, serão indicados pelos titulares dos respectivos órgãos no prazo de trinta dias da data da comunicação do Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, que os designará em ato próprio.

Art. 13. A designação de qualquer membro do CONCEA em razão de vacância obedecerá aos mesmos procedimentos da designação ordinária.

Art. 14. Os membros do CONCEA de que tratam os incisos I e II do art. 9º terão mandato de dois anos, podendo ser renovado na forma do regimento interno.

Parágrafo único. A contagem do período do mandato de membro suplente é contínua, ainda que assuma o mandato de titular.

Art. 15. As despesas com transporte, alimentação e hospedagem dos membros do CONCEA para participar das reuniões ordinárias ou extraordinárias serão de responsabilidade do Ministério da Ciência e Tecnologia.

Parágrafo único. Os membros do CONCEA não serão remunerados, sendo os serviços por eles prestados considerados, para todos os efeitos, de relevante serviço público.

Art. 16. Os membros do CONCEA devem pautar a sua atuação pela observância estrita dos conceitos ético-profissionais, sendo vedado participar do julgamento de questões com as quais tenham envolvimento de ordem profissional ou pessoal, sob pena de perda de mandato.

§ 1º O membro do CONCEA, ao ser empossado, assinará declaração de conduta, explicitando eventual conflito de interesse, na forma do regimento interno.

§ 2º O membro do CONCEA deverá manifestar seu eventual impedimento nos processos a ele distribuídos para análise, quando do seu recebimento, ou, quando não for o relator, no momento das deliberações nas reuniões das câmaras ou do plenário.

§ 3º Poderá argüir o impedimento o membro do CONCEA ou aquele legitimado como interessado, nos termos do art. 9º da Lei nº 9.784, de 29 de janeiro de 1999.

§ 4º A argüição de impedimento será formalizada em petição fundamentada e devidamente instruída, e será decidida pelo plenário do CONCEA.

§ 5º É nula a decisão técnica tomada com voto de membro impedido.

§ 6º No caso do § 5º, o plenário do CONCEA proferirá nova decisão, na qual regulará expressamente o objeto da decisão viciada e os efeitos dela decorrentes, desde a sua publicação.

Art. 17. O CONCEA contará com um Coordenador, que será escolhido e designado pelo Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, entre os membros que o integram, para mandato de dois anos, renovável por igual período.

§ 1º O Coordenador do CONCEA será escolhido a partir de lista tríplice elaborada pelos membros do CONCEA.

§ 2º A lista tríplice para indicação do primeiro Coordenador do CONCEA será elaborada a partir dos votos dos Conselheiros presentes, a serem obtidos na segunda sessão ordinária imediatamente posterior à instalação do Conselho.

§ 3º Para compor a lista tríplice, serão indicados os membros que obtiverem as três maiores pontuações de votos entre os membros presentes do CONCEA.

Art. 18. O CONCEA constituirá câmaras permanentes nas áreas definidas pelo regimento interno, para análise prévia dos temas a serem submetidos ao plenário, bem como câmaras temporárias quando necessário.

#### Seção IV

##### Da Estrutura Administrativa

Art. 19. O CONCEA contará com uma Secretaria-Executiva, cabendo ao Ministério da Ciência e Tecnologia a ela prestar o apoio técnico e administrativo.

Parágrafo único. O Secretário-Executivo do CONCEA será nomeado pelo Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia.

Art. 20. Cabe à Secretaria-Executiva do CONCEA, entre outras atribuições a serem definidas no regimento interno:

I - prestar apoio técnico e administrativo necessários à execução dos trabalhos do CONCEA, inclusive de suas câmaras permanentes e temporárias;

II - receber, instruir e fazer tramitar os pleitos submetidos à deliberação do CONCEA;

III - encaminhar as deliberações do CONCEA aos órgãos governamentais responsáveis pela sua implementação e providenciar a devida publicidade;

IV - atualizar e promover os credenciamentos dos institutos no CIUCA, de acordo com as normas e determinações do CONCEA;

V - implementar as deliberações do CONCEA;

VI - promover a instrução e a tramitação dos processos a serem submetidos à deliberação do CONCEA;

VII - dar suporte às instituições credenciadas;

VIII - emitir, de acordo com deliberação do CONCEA e em nome deste Conselho, comprovante de registro atualizado de credenciamento;

IX - administrar o cadastro das instituições e dos protocolos experimentais ou pedagógicos, aplicáveis aos procedimentos de ensino e de pesquisa científica, assim como dos pesquisadores, de que trata o inciso VII do art. 4º;

X - analisar as solicitações de credenciamento, emitindo nota técnica para apreciação do CONCEA ou de suas câmaras permanentes ou temporárias;

XI - conceder as licenças, de acordo com as estipulações previstas em portaria do Ministério da Ciência e Tecnologia, para as atividades destinadas à criação de animais, ao ensino, à pesquisa científica de que trata o art. 11 da Lei nº 11.794, de 2008, observadas as normas do CONCEA;

XII - dar publicidade aos atos do CONCEA, na forma do regimento interno;  
e

XIII - publicar as licenças concedidas.

Art. 21. O funcionamento e a organização da Secretaria-Executiva do CONCEA serão definidos no regimento interno.

#### Seção V

##### Das Reuniões e Deliberações

Art. 22. O membro suplente terá direito a voz e, na ausência do respectivo titular, a voto nas deliberações.

Art. 23. As deliberações do plenário do CONCEA só poderão ocorrer com a presença mínima de oito membros votantes.

Parágrafo único. As decisões do CONCEA serão tomadas com votos favoráveis da maioria absoluta dos membros presentes, salvo as hipóteses específicas previstas neste Decreto.

Art. 24. Perderá seu mandato o membro que:

I - violar o disposto no art. 16;

II - não comparecer a três reuniões ordinárias consecutivas do plenário do CONCEA, sem justificativa.

Art. 25. O CONCEA reunir-se-á, em caráter ordinário, uma vez a cada trimestre e, extraordinariamente, a qualquer momento, mediante convocação de seu Presidente ou por solicitação fundamentada subscrita pela maioria absoluta dos seus membros.

Parágrafo único. A periodicidade das reuniões ordinárias poderá, em caráter excepcional, ser alterada por deliberação do CONCEA.

Art. 26. Os órgãos e entidades integrantes da administração pública federal poderão solicitar participação em reuniões do CONCEA para tratar de assuntos de seu especial interesse, sem direito a voto.

Parágrafo único. A solicitação à Secretaria-Executiva do CONCEA deverá ser acompanhada de justificativa que demonstre a motivação do pedido, para posterior submissão e deliberação do Conselho.

Art. 27. Poderão ser convidados a participar das reuniões, em caráter excepcional, representantes da comunidade científica, do setor público e de entidades da sociedade civil, sem direito a voto.

Art. 28. Das deliberações das CEUAs e da Secretaria-Executiva do CONCEA cabe recurso ao CONCEA, cuja decisão será tomada pela maioria absoluta de seus membros.

Art. 29. Poderá solicitar o credenciamento de que trata o inciso II do art. 4º, a instituição de natureza pública ou privada que atenda aos seguintes requisitos, entre outros que poderão ser exigidos pelo CONCEA:

I - comprovação de que tenha sido constituída sob as leis brasileiras;

II - apresente comprovada qualificação técnica para o desempenho de atividades de que trata a Lei nº 11.794, de 2008; e

III - comprove ter disponível estrutura física adequada e pessoal qualificado para o manuseio, ensino e pesquisa científica com a utilização ou criação de animais.

## Seção VI

### Da Tramitação dos Recursos e Processos

Art. 30. Os requerimentos de credenciamento das instituições no CONCEA serão encaminhados à sua Secretaria-Executiva, sendo seu procedimento definido pelo Conselho.

Art. 31. Os demais processos e recursos submetidos ao CONCEA obedecerão ao trâmite definido nesta Seção.

Art. 32. O requerimento será protocolado na Secretaria-Executiva do CONCEA, autuado e devidamente instruído.

Art. 33. O processo será distribuído, por sorteio, a um dos membros de determinada câmara, para relatoria e elaboração de parecer.

Art. 34. O parecer será submetido a uma ou mais câmaras permanentes ou temporárias para formação e aprovação do parecer final.

Art. 35. O parecer final, após sua aprovação nas câmaras permanentes ou temporárias para as quais o processo foi distribuído, será encaminhado ao plenário do CONCEA para deliberação.

Art. 36. O voto vencido de membro de câmara permanente ou temporária deverá ser apresentado de forma expressa e fundamentada e será consignado como voto divergente no parecer final para apreciação e deliberação do plenário.

Art. 37. Os processos para apuração de infração administrativa seguirão o rito deste artigo.

§ 1º Após autuado e instruído pela Secretaria-Executiva do CONCEA, o processo será distribuído, por sorteio, a um relator, que abrirá prazo de vinte dias para defesa do representado.

§ 2º Decorrido o prazo previsto no § 1º, com ou sem manifestação do representado, o relator poderá requerer novas diligências à Secretaria-Executiva do CONCEA e, após, remeter os autos à Consultoria Jurídica do Ministério da Ciência e Tecnologia, para parecer.

§ 3º Após o parecer da Consultoria Jurídica, o relator abrirá prazo de vinte dias para alegações finais do representado.

§ 4º Decorrido o prazo previsto no § 3º, com ou sem manifestação do representado, o relator apresentará o processo, em até vinte dias, para inclusão na pauta da próxima reunião do Plenário.

§ 5º A decisão pela aplicação das sanções previstas nos arts. 17 e 18 da Lei nº 11.794, de 2008, só poderá ser tomada com o voto favorável da maioria absoluta dos membros do CONCEA.

Art. 38. O CONCEA adotará as providências necessárias para resguardar as informações sigilosas, de interesse comercial, apontadas pelo proponente e assim consideradas pelo Conselho, desde que sobre essas informações não recaiam interesses particulares ou coletivos constitucionalmente garantidos.

§ 1º A fim de que seja resguardado o sigilo a que se refere o **caput**, o requerente deverá dirigir ao Presidente do CONCEA solicitação expressa e

fundamentada, contendo a especificação das informações cujo sigilo pretende resguardar.

§ 2º O pedido será decidido por despacho fundamentado, contra o qual caberá recurso ao plenário, em procedimento a ser estabelecido no regimento interno do CONCEA, garantido o sigilo requerido até decisão final em contrário.

§ 3º O requerente poderá optar por desistir do pleito, caso tenha seu pedido de sigilo indeferido definitivamente, hipótese em que será vedado ao CONCEA dar publicidade à informação objeto do pretendido sigilo.

Art. 39. Os órgãos e entidades de registro e fiscalização requisitarão acesso a determinada informação sigilosa, desde que indispensável ao exercício de suas funções, em petição que fundamentará o pedido e indicará o agente que a ela terá acesso.

Art. 40. Os demais casos não previstos neste Capítulo serão definidos pelo regimento interno do CONCEA.

### CAPÍTULO III

#### DO CADASTRO DAS INSTITUIÇÕES DE USO CIENTÍFICO DE ANIMAIS - CIUCA

Art. 41. Fica criado o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, a ser implementado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia e administrado pela Secretaria-Executiva do CONCEA, conforme normas expedidas por aquele Ministério, e destinado ao registro:

I - das instituições para criação ou utilização de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica;

II - dos protocolos experimentais ou pedagógicos, aplicáveis aos procedimentos de ensino e projetos de pesquisa científica realizados ou em andamento no País, assim como dos pesquisadores, a partir de informações remetidas pelas CEUAs; e

III - das solicitações de credenciamento no CONCEA.

Art. 42. A instituição de direito público ou privado que pretender realizar pesquisa científica ou apenas desenvolvimento tecnológico, em laboratórios de experimentação animal, o que engloba, no âmbito experimental, a construção e manutenção de laboratórios ou biotérios, a manipulação, o transporte, a transferência, o armazenamento, eutanásia, ou qualquer uso de animais com finalidade didática, de pesquisa científica ou desenvolvimento tecnológico, deverá requerer junto ao CONCEA o seu credenciamento.

Parágrafo único. O CONCEA estabelecerá os critérios e procedimentos para requerimento, emissão, revisão, extensão, suspensão e cancelamento do credenciamento.

### CAPÍTULO IV

#### DAS COMISSÕES DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUAs

Art. 43. As CEUAs deverão ser compostas por membros titulares e respectivos suplentes, designados pelos representantes legais das instituições, e serão constituídas por cidadãos brasileiros de reconhecida competência técnica e notório saber, de nível superior, graduado ou pós-graduado, e com destacada atividade profissional em áreas relacionadas ao escopo da Lei nº 11.794, de 2008.

Art. 44. Compete às CEUAs, no âmbito das instituições onde constituídas:

I - cumprir e fazer cumprir, no âmbito de suas atribuições, o disposto na Lei nº 11.794, de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais para ensino e pesquisa, especialmente nas resoluções do CONCEA;

II - examinar previamente os protocolos experimentais ou pedagógicos aplicáveis aos procedimentos de ensino e projetos de pesquisa científica a serem realizados na instituição à qual esteja vinculada, para determinar sua compatibilidade com a legislação aplicável;

III - manter cadastro atualizado dos protocolos experimentais ou pedagógicos, aplicáveis aos procedimentos de ensino e projetos de pesquisa científica realizados, ou em andamento, na instituição, enviando cópia ao CONCEA;

IV - manter cadastro dos pesquisadores e docentes que desenvolvam protocolos experimentais ou pedagógicos, aplicáveis aos procedimentos de ensino e projetos de pesquisa científica, enviando cópia ao CONCEA;

V - expedir, no âmbito de suas atribuições, certificados que se fizerem necessários perante órgãos de financiamento de pesquisa, periódicos científicos, CONCEA ou outras entidades ligadas ao objeto deste Decreto;

VI - notificar imediatamente ao CONCEA e às autoridades sanitárias a ocorrência de qualquer acidente com os animais nas instituições credenciadas, fornecendo informações que permitam ações saneadoras;

VII - estabelecer programas preventivos e de inspeção para garantir o funcionamento e a adequação das instalações sob sua responsabilidade, dentro dos padrões e normas definidas pelo CONCEA;

VIII - manter registro do acompanhamento individual de cada atividade ou projeto em desenvolvimento que envolva ensino ou pesquisa científica realizados, ou em andamento, na instituição, e dos pesquisadores que realizem procedimentos de ensino e pesquisa científica; e

§ 1º Constatado qualquer procedimento em descumprimento às disposições da Lei nº 11.794, de 2008, na execução de atividade de ensino ou pesquisa científica, a respectiva CEUA determinará a paralisação de sua execução, até que a irregularidade seja sanada, sem prejuízo da aplicação de outras sanções cabíveis.

§ 2º Quando se configurar a hipótese prevista no § 1º, a omissão da CEUA acarretará sanções à instituição, nos termos dos arts. 17 a 20 da Lei nº 11.794, de 2008.

§ 3º Das decisões proferidas pelas CEUAs cabe recurso, sem efeito suspensivo, ao CONCEA.

§ 4º Os membros das CEUAs responderão pelos prejuízos que, por dolo, causarem às pesquisas ou ao desenvolvimento de protocolos relacionados à pesquisa científica em andamento.

§ 5º Os membros das CEUAs estão obrigados a resguardar o segredo industrial, sob pena de responsabilidade.

Art. 45. Os demais casos não previstos neste Capítulo serão definidos pelo regimento interno do CONCEA.

## CAPÍTULO V

### DAS INFRAÇÕES ADMINISTRATIVAS

Art. 46. Considera-se infração administrativa toda ação ou omissão, de pessoa física ou jurídica, que viole as normas previstas na Lei nº 11.794, de 2008, neste Decreto e demais disposições legais pertinentes, em especial:

I - criar ou utilizar animais em atividades de ensino e pesquisa científica como pessoa física em atuação autônoma;

II - criar ou utilizar animais em atividades de ensino e pesquisa científica sem estar credenciado no CONCEA ou em desacordo com as normas por ele expedidas;

III - deixar de oferecer cuidados especiais aos animais antes, durante e após as intervenções recomendadas nos protocolos dos experimentos que constituem a pesquisa ou programa de aprendizado, conforme estabelecido pelo CONCEA;

IV - deixar de submeter o animal a eutanásia, sob estrita obediência às prescrições pertinentes a cada espécie, conforme as diretrizes do Ministério da Ciência e Tecnologia, sempre que, encerrado o experimento ou em qualquer de suas fases, for tecnicamente recomendado aquele procedimento ou quando ocorrer intenso sofrimento, ressalvada a hipótese do § 2º do art. 14 da Lei nº 11.794, de 2008;

V - realizar experimentos que possam causar dor ou angústia sem sedação, analgesia ou anestesia adequadas, ressalvada a hipótese do inciso VI;

VI - realizar experimentos cujo objetivo seja o estudo dos processos relacionados à dor e à angústia sem autorização específica da CEUA;

VII - utilizar bloqueadores neuromusculares ou relaxantes musculares em substituição a substâncias sedativas, analgésicas ou anestésicas;

VIII - reutilizar o mesmo animal depois de alcançado o objetivo principal do projeto de pesquisa;

IX - realizar trabalhos de criação e experimentação de animais em sistemas fechados em desacordo com as condições e normas de segurança recomendadas pelos organismos internacionais aos quais o Brasil se vincula;

X - realizar, em programa de ensino, vários procedimentos traumáticos num mesmo animal, sem que todos os procedimentos sejam executados durante os efeitos de um único anestésico ou sem que o animal seja sacrificado antes de recobrar o sentido;

XI - realizar pesquisa científica ou atividade de ensino reguladas por este Decreto sem supervisão de profissional de nível superior, graduado ou pós-graduado na área biomédica, conforme norma do CONCEA, vinculado a entidade de ensino ou pesquisa por ele credenciada;

XII - exercer as atividades previstas no art. 11 da Lei nº 11.794, de 2008, sem a competente licença do Ministério da Ciência e Tecnologia.

Art. 47. Qualquer pessoa, constatando a ocorrência de infração administrativa prevista neste Decreto, poderá dirigir representação ao órgão ou entidade de fiscalização competente, para efeito do exercício de poder de polícia.



Art. 48. São competentes para lavrar auto de infração e remetê-lo ao CONCEA, os órgãos de fiscalização dos Ministérios previstos no art. 21 da Lei nº 11.794, de 2008, nas respectivas áreas de competências, sem prejuízo das atribuições das CEUAs.

Parágrafo único. Quando a infração puder configurar crime ou contravenção, ou lesão à Fazenda Pública ou ao consumidor, a autoridade fiscalizadora, além da obrigação do **caput**, representará junto ao órgão competente para apuração das responsabilidades administrativa e penal.

## CAPÍTULO VI

### DAS SANÇÕES ADMINISTRATIVAS

Art. 49. As infrações administrativas, independentemente das medidas cautelares cabíveis, serão punidas com as seguintes sanções:

I - aplicáveis a pessoas jurídicas:

- a) advertência;
- b) multa de R\$ 5.000,00 (cinco mil reais) a R\$ 20.000,00 (vinte mil reais);
- c) interdição temporária;
- d) suspensão de financiamentos provenientes de fontes oficiais de crédito e fomento científico;

e) interdição definitiva;

II - aplicáveis a pessoas físicas:

- a) advertência;
- b) multa de R\$ 1.000,00 (mil reais) a R\$ 5.000,00 (cinco mil reais);
- c) suspensão temporária;
- d) interdição definitiva para o exercício da atividade regulada pela Lei nº 11.794, de 2008.

Art. 50. Para a imposição da pena e sua graduação, o CONCEA levará em conta:

I - a gravidade da infração;

II - os antecedentes do infrator quanto ao cumprimento da Lei nº 11.794, de 2008, deste Decreto e das normas expedidas pelo CONCEA;

III - as circunstâncias agravantes;

IV - as circunstâncias atenuantes;

V - os danos advindos da infração.

Parágrafo único. Para o efeito do inciso I do **caput**, as infrações previstas neste Decreto serão classificadas em leves, graves e gravíssimas, segundo os seguintes critérios:

I - o grau de sofrimento gerado no animal;

II - os meios utilizados para consecução da infração;

III - as conseqüências, efetivas ou potenciais, para a saúde animal;

IV - a culpabilidade do infrator.

Art. 51. A advertência será aplicada somente nas infrações de natureza leve.

Art. 52. A multa será aplicada obedecendo a seguinte graduação:

I - para pessoas jurídicas:

- a) de R\$ 5.000,00 (cinco mil reais) a R\$ 10.000,00 (dez mil reais) nas infrações de natureza leve;

b) de R\$ 10.001,00 (dez mil e um reais) a R\$ 15.000,00 (quinze mil reais) nas infrações de natureza grave;

c) de R\$ 15.001,00 (quinze mil e um reais) a R\$ 20.000,00 (vinte mil reais) nas infrações de natureza gravíssima;

II - para pessoas físicas:

a) de R\$ 1.000,00 (mil reais) a R\$ 2.000,00 (dois mil reais) nas infrações de natureza leve;

b) de R\$ 2.001,00 (dois mil e um reais) a R\$ 4.000,00 (quatro mil reais) nas infrações de natureza grave;

c) de R\$ 4.001,00 (quatro mil e um reais) a R\$ 5.000,00 (cinco mil reais) nas infrações de natureza gravíssima.

§ 2º As multas poderão ser aplicadas cumulativamente com as demais sanções previstas neste Decreto.

Art. 53. Os recursos arrecadados com a aplicação de multas serão destinados ao CONCEA, para promoção e incentivo da utilização ética de animais em atividades de ensino e pesquisa científica.

Art. 54. Os órgãos e entidades fiscalizadores da administração pública federal poderão celebrar convênios com os Estados, Distrito Federal e Municípios, para a execução de serviços relacionados à atividade de fiscalização prevista neste Decreto.

Art. 55. As sanções previstas nas alíneas “c” e “d” do inciso I e na alínea “c” do inciso II do art. 49 serão aplicadas somente nas infrações de natureza grave ou gravíssima.

Art. 56. As sanções previstas na alínea “e” do inciso I e na alínea “d” do inciso II do art. 49 serão aplicadas somente nas infrações de natureza gravíssima.

Art. 57. Se o infrator cometer, simultaneamente, duas ou mais infrações, ser-lhe-ão aplicadas, cumulativamente, as sanções cominadas a cada uma delas.

## CAPÍTULO VII

### DAS DISPOSIÇÕES FINAIS E TRANSITÓRIAS

Art. 58. Em casos de interesse ou calamidade pública, assim declarado em ato do Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, poderão ser dispensadas exigências previstas neste Decreto.

Parágrafo único. Para os efeitos deste Decreto, considera-se interesse público os fatos relacionados à saúde pública, à nutrição, à defesa do meio ambiente, bem como aqueles de primordial importância para o desenvolvimento tecnológico ou socioeconômico do País.

Art. 59. O CONCEA, no prazo de até noventa dias de sua instalação, definirá proposta para seu regimento interno, a ser submetida à aprovação do Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia.

Art. 60. O credenciamento e o licenciamento de que tratam o inciso II do art. 5º e o art. 11 da Lei nº 11.794, de 2008, respectivamente, só serão exigíveis após a sua implementação pelos órgãos competentes.

Art. 61. Este Decreto entra em vigor na data de sua publicação.

Brasília, 15 de julho de 2009; 188º da Independência e 121º da República.

LUIZ INÁCIO LULA DA SILVA  
*Sergio Machado Rezende*

Este texto não substitui o publicado no DOU de 16.7.2009

## ANEXO 3

### LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008.

Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

**O PRESIDENTE DA REPÚBLICA** Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

#### CAPÍTULO I

#### DAS DISPOSIÇÕES PRELIMINARES

Art. 1º A criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional, obedece aos critérios estabelecidos nesta Lei.

§ 1º A utilização de animais em atividades educacionais fica restrita a:

I – estabelecimentos de ensino superior;

II – estabelecimentos de educação profissional técnica de nível médio da área biomédica.

§ 2º São consideradas como atividades de pesquisa científica todas aquelas relacionadas com ciência básica, ciência aplicada, desenvolvimento tecnológico, produção e controle da qualidade de drogas, medicamentos, alimentos, imunobiológicos, instrumentos, ou quaisquer outros testados em animais, conforme definido em regulamento próprio.

§ 3º Não são consideradas como atividades de pesquisa as práticas zootécnicas relacionadas à agropecuária.

Art. 2º O disposto nesta Lei aplica-se aos animais das espécies classificadas como filo **Chordata**, subfilo **Vertebrata**, observada a legislação ambiental.

Art. 3º Para as finalidades desta Lei entende-se por:

I – filo **Chordata**: animais que possuem, como características exclusivas, ao menos na fase embrionária, a presença de notocorda, fendas branquiais na faringe e tubo nervoso dorsal único;

II – subfilo **Vertebrata**: animais cordados que têm, como características exclusivas, um encéfalo grande encerrado numa caixa craniana e uma coluna vertebral;

III – experimentos: procedimentos efetuados em animais vivos, visando à elucidação de fenômenos fisiológicos ou patológicos, mediante técnicas específicas e preestabelecidas;

IV – morte por meios humanitários: a morte de um animal em condições que envolvam, segundo as espécies, um mínimo de sofrimento físico ou mental.

Parágrafo único. Não se considera experimento:

I – a profilaxia e o tratamento veterinário do animal que deles necessite;

II – o anilhamento, a tatuagem, a marcação ou a aplicação de outro método com finalidade de identificação do animal, desde que cause apenas dor ou aflição momentânea ou dano passageiro;

III – as intervenções não-experimentais relacionadas às práticas agropecuárias.

## CAPÍTULO II

### DO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA

Art. 4º Fica criado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Art. 5º Compete ao CONCEA:

I – formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica;

II – credenciar instituições para criação ou utilização de animais em ensino e pesquisa científica;

III – monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa;

IV – estabelecer e rever, periodicamente, as normas para uso e cuidados com animais para ensino e pesquisa, em consonância com as convenções internacionais das quais o Brasil seja signatário;

V – estabelecer e rever, periodicamente, normas técnicas para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal, bem como sobre as condições de trabalho em tais instalações;

VI – estabelecer e rever, periodicamente, normas para credenciamento de instituições que criem ou utilizem animais para ensino e pesquisa;

VII – manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados ou em andamento no País, assim como dos pesquisadores, a partir de informações remetidas pelas Comissões de Ética no Uso de Animais - CEUAs, de que trata o art. 8º desta Lei;

VIII – apreciar e decidir recursos interpostos contra decisões das CEUAs;

IX – elaborar e submeter ao Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, para aprovação, o seu regimento interno;

X – assessorar o Poder Executivo a respeito das atividades de ensino e pesquisa tratadas nesta Lei.

Art. 6º O CONCEA é constituído por:

I – Plenário;

II – Câmaras Permanentes e Temporárias;

III – Secretaria-Executiva.

§ 1º As Câmaras Permanentes e Temporárias do CONCEA serão definidas no regimento interno.

§ 2º A Secretaria-Executiva é responsável pelo expediente do CONCEA e terá o apoio administrativo do Ministério da Ciência e Tecnologia.

§ 3º O CONCEA poderá valer-se de consultores **ad hoc** de reconhecida competência técnica e científica, para instruir quaisquer processos de sua pauta de trabalhos.

Art. 7º O CONCEA será presidido pelo Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia e integrado por:

I – 1 (um) representante de cada órgão e entidade a seguir indicados:

a) Ministério da Ciência e Tecnologia;

b) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;

c) Ministério da Educação;

d) Ministério do Meio Ambiente;

e) Ministério da Saúde;

f) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

g) Conselho de Reitores das Universidades do Brasil – CRUB;

h) Academia Brasileira de Ciências;

i) Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência;

j) Federação das Sociedades de Biologia Experimental;

l) Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;

m) Federação Nacional da Indústria Farmacêutica;

II – 2 (dois) representantes das sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País.

§ 1º Nos seus impedimentos, o Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia será substituído, na Presidência do CONCEA, pelo Secretário-Executivo do respectivo Ministério.

§ 2º O Presidente do CONCEA terá o voto de qualidade.

§ 3º Os membros do CONCEA não serão remunerados, sendo os serviços por eles prestados considerados, para todos os efeitos, de relevante serviço público

### CAPÍTULO III

#### DAS COMISSÕES DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUAs

Art. 8º É condição indispensável para o credenciamento das instituições com atividades de ensino ou pesquisa com animais a constituição prévia de Comissões de Ética no Uso de Animais – CEUAs.

Art. 9º As CEUAs são integradas por:

I – médicos veterinários e biólogos;

II – docentes e pesquisadores na área específica;

III – 1 (um) representante de sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País, na forma do Regulamento.

Art. 10. Compete às CEUAs:

I – cumprir e fazer cumprir, no âmbito de suas atribuições, o disposto nesta Lei e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais para ensino e pesquisa, especialmente nas resoluções do CONCEA;

II – examinar previamente os procedimentos de ensino e pesquisa a serem realizados na instituição à qual esteja vinculada, para determinar sua compatibilidade com a legislação aplicável;

III – manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados, ou em andamento, na instituição, enviando cópia ao CONCEA;

IV – manter cadastro dos pesquisadores que realizem procedimentos de ensino e pesquisa, enviando cópia ao CONCEA;

V – expedir, no âmbito de suas atribuições, certificados que se fizerem necessários perante órgãos de financiamento de pesquisa, periódicos científicos ou outros;

VI – notificar imediatamente ao CONCEA e às autoridades sanitárias a ocorrência de qualquer acidente com os animais nas instituições credenciadas, fornecendo informações que permitam ações saneadoras.

§ 1º Constatado qualquer procedimento em descumprimento às disposições desta Lei na execução de atividade de ensino e pesquisa, a respectiva CEUA determinará a paralisação de sua execução, até que a irregularidade seja sanada, sem prejuízo da aplicação de outras sanções cabíveis.

§ 2º Quando se configurar a hipótese prevista no § 1º deste artigo, a omissão da CEUA acarretará sanções à instituição, nos termos dos arts. 17 e 20 desta Lei.

§ 3º Das decisões proferidas pelas CEUAs cabe recurso, sem efeito suspensivo, ao CONCEA.

§ 4º Os membros das CEUAs responderão pelos prejuízos que, por dolo, causarem às pesquisas em andamento.

§ 5º Os membros das CEUAs estão obrigados a resguardar o segredo industrial, sob pena de responsabilidade.

## CAPÍTULO IV

### DAS CONDIÇÕES DE CRIAÇÃO E USO DE ANIMAIS PARA ENSINO E PESQUISA CIENTÍFICA

Art. 11. Compete ao Ministério da Ciência e Tecnologia licenciar as atividades destinadas à criação de animais, ao ensino e à pesquisa científica de que trata esta Lei.

§ 1º (VETADO)

§ 2º (VETADO)

§ 3º (VETADO)

Art. 12. A criação ou a utilização de animais para pesquisa ficam restritas, exclusivamente, às instituições credenciadas no CONCEA.

Art. 13. Qualquer instituição legalmente estabelecida em território nacional que crie ou utilize animais para ensino e pesquisa deverá requerer credenciamento no CONCEA, para uso de animais, desde que, previamente, crie a CEUA.

§ 1º A critério da instituição e mediante autorização do CONCEA, é admitida a criação de mais de uma CEUA por instituição.

§ 2º Na hipótese prevista no § 1º deste artigo, cada CEUA definirá os laboratórios de experimentação animal, biotérios e centros de criação sob seu controle.

Art. 14. O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos dos experimentos que constituem a pesquisa ou programa de aprendizado quando, antes, durante e após o experimento, receber cuidados especiais, conforme estabelecido pelo CONCEA.

§ 1º O animal será submetido a eutanásia, sob estrita obediência às prescrições pertinentes a cada espécie, conforme as diretrizes do Ministério da Ciência e Tecnologia, sempre que, encerrado o experimento ou em qualquer de

suas fases, for tecnicamente recomendado aquele procedimento ou quando ocorrer intenso sofrimento.

§ 2º Excepcionalmente, quando os animais utilizados em experiências ou demonstrações não forem submetidos a eutanásia, poderão sair do biotério após a intervenção, ouvida a respectiva CEUA quanto aos critérios vigentes de segurança, desde que destinados a pessoas idôneas ou entidades protetoras de animais devidamente legalizadas, que por eles queiram responsabilizar-se.

§ 3º Sempre que possível, as práticas de ensino deverão ser fotografadas, filmadas ou gravadas, de forma a permitir sua reprodução para ilustração de práticas futuras, evitando-se a repetição desnecessária de procedimentos didáticos com animais.

§ 4º O número de animais a serem utilizados para a execução de um projeto e o tempo de duração de cada experimento será o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo, poupando-se, ao máximo, o animal de sofrimento.

§ 5º Experimentos que possam causar dor ou angústia desenvolver-se-ão sob sedação, analgesia ou anestesia adequadas.

§ 6º Experimentos cujo objetivo seja o estudo dos processos relacionados à dor e à angústia exigem autorização específica da CEUA, em obediência a normas estabelecidas pelo CONCEA.

§ 7º É vedado o uso de bloqueadores neuromusculares ou de relaxantes musculares em substituição a substâncias sedativas, analgésicas ou anestésicas.

§ 8º É vedada a reutilização do mesmo animal depois de alcançado o objetivo principal do projeto de pesquisa.

§ 9º Em programa de ensino, sempre que forem empregados procedimentos traumáticos, vários procedimentos poderão ser realizados num mesmo animal, desde que todos sejam executados durante a vigência de um único anestésico e que o animal seja sacrificado antes de recobrar a consciência.

§ 10. Para a realização de trabalhos de criação e experimentação de animais em sistemas fechados, serão consideradas as condições e normas de segurança recomendadas pelos organismos internacionais aos quais o Brasil se vincula.

Art. 15. O CONCEA, levando em conta a relação entre o nível de sofrimento para o animal e os resultados práticos que se esperam obter, poderá restringir ou proibir experimentos que importem em elevado grau de agressão.

Art. 16. Todo projeto de pesquisa científica ou atividade de ensino será supervisionado por profissional de nível superior, graduado ou pós-graduado na área biomédica, vinculado a entidade de ensino ou pesquisa credenciada pelo CONCEA.

## CAPÍTULO V

### DAS PENALIDADES

Art. 17. As instituições que executem atividades reguladas por esta Lei estão sujeitas, em caso de transgressão às suas disposições e ao seu regulamento, às penalidades administrativas de:

I – advertência;



II – multa de R\$ 5.000,00 (cinco mil reais) a R\$ 20.000,00 (vinte mil reais);

III – interdição temporária;

IV – suspensão de financiamentos provenientes de fontes oficiais de crédito e fomento científico;

V – interdição definitiva.

Parágrafo único. A interdição por prazo superior a 30 (trinta) dias somente poderá ser determinada em ato do Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, ouvido o CONCEA.

Art. 18. Qualquer pessoa que execute de forma indevida atividades reguladas por esta Lei ou participe de procedimentos não autorizados pelo CONCEA será passível das seguintes penalidades administrativas:

I – advertência;

II – multa de R\$ 1.000,00 (mil reais) a R\$ 5.000,00 (cinco mil reais);

III – suspensão temporária;

IV – interdição definitiva para o exercício da atividade regulada nesta

Lei.

Art. 19. As penalidades previstas nos arts. 17 e 18 desta Lei serão aplicadas de acordo com a gravidade da infração, os danos que dela provierem, as circunstâncias agravantes ou atenuantes e os antecedentes do infrator.

Art. 20. As sanções previstas nos arts. 17 e 18 desta Lei serão aplicadas pelo CONCEA, sem prejuízo de correspondente responsabilidade penal.

Art. 21. A fiscalização das atividades reguladas por esta Lei fica a cargo dos órgãos dos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, da Saúde, da Educação, da Ciência e Tecnologia e do Meio Ambiente, nas respectivas áreas de competência.

## CAPÍTULO VI

### DISPOSIÇÕES GERAIS E TRANSITÓRIAS

Art. 22. As instituições que criem ou utilizem animais para ensino ou pesquisa existentes no País antes da data de vigência desta Lei deverão:

I – criar a CEUA, no prazo máximo de 90 (noventa) dias, após a regulamentação referida no art. 25 desta Lei;

II – compatibilizar suas instalações físicas, no prazo máximo de 5 (cinco) anos, a partir da entrada em vigor das normas estabelecidas pelo CONCEA, com base no inciso V do **caput** do art. 5º desta Lei.

Art. 23. O CONCEA, mediante resolução, recomendará às agências de amparo e fomento à pesquisa científica o indeferimento de projetos por qualquer dos seguintes motivos:

I – que estejam sendo realizados sem a aprovação da CEUA;

II – cuja realização tenha sido suspensa pela CEUA.

Art. 24. Os recursos orçamentários necessários ao funcionamento do CONCEA serão previstos nas dotações do Ministério da Ciência e Tecnologia.

Art. 25. Esta Lei será regulamentada no prazo de 180 (cento e oitenta) dias.

Art. 26. Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 27. Revoga-se a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979.

Brasília, 8 de outubro de 2008; 187<sup>o</sup> da Independência e 120<sup>o</sup> da República.

LUIZ INÁCIO LULA DA SILVA

*Tarso Genro*

*Reinhold Stephanes*

*José Gomes Temporão*

*Miguel Jorge*

*Luiz Antonio Rodrigues Elias*

*Carlos Minc*

Este texto não substitui o publicado no DOU de 9.10.2008

## ANEXO 4

### Assembléia Legislativa do Estado do Paraná Constituição Estadual

#### Lei nº 14037, de 20 de Março de 2003

A Assembléia Legislativa do Estado do Paraná aprovou e eu promulgo, nos termos do § 7º do Artigo 71 da Constituição Estadual, a seguinte Lei: (Projeto de Lei nº 207/2002, vetado e as razões de veto não mantidas pela Assembléia Legislativa)

**Art. 1º.** Institui o "Código Estadual de Proteção aos Animais" estabelecendo normas para a proteção dos animais no Estado do Paraná, visando compatibilizar o desenvolvimento sócio-econômico com a preservação ambiental.

**Art. 2º.** É vedado:

**I** - ofender ou agredir fisicamente os animais, sujeitando-os a qualquer tipo de experiência capaz de causar-lhes sofrimento, humilhação ou dano, ou que, de alguma forma, provoque condições inaceitáveis para sua existência;

**II** - manter animais em local desprovido de asseio, ou que não lhes permita a movimentação e o descanso, ou que os prive de ar e luminosidade;

**III** - obrigar animais a trabalhos extenuantes ou para cuja execução seja necessária uma força superior à que possuem;

**IV** - impingir morte lenta ou dolorosa a animais cujo sacrifício seja necessário para o consumo. O sacrifício de animais somente será permitido nos moldes preconizados pela Organização Mundial de Saúde;

**V** - exercer a venda ambulante de animais para menores desacompanhados por responsável legal;

**VI** - enclausurar animais com outros que os molestem ou aterrorizam;

## CAPÍTULO II

### Dos animais silvestres

#### Seção I

##### Fauna nativa

**Art. 3º.** Consideram-se espécies da fauna nativa do Paraná as que sejam originárias deste estado e vivam de forma selvagem, inclusive as que estejam em processo de migração. Peixes e animais marinhos da costa paranaense fazem parte deste grupo.

**Art. 4º.** Os animais silvestres de qualquer espécie, em qualquer fase do seu desenvolvimento, bem como os seus ninhos, ovos e abrigos são considerados bens de interesse comum do Estado do Paraná, respeitados os limites que a legislação estabelece.

#### Seção II

##### Fauna exótica

**Art. 5º.** A fauna exótica compreende as espécies animais não originárias do Estado do Paraná que vivam em estado selvagem.

**Art. 6º.** Nenhuma espécie poderá ser introduzida no Estado do Paraná sem prévia autorização do órgão competente.

**Art. 7º.** Todo vendedor de animais pertencentes à fauna exótica deverá possuir certificado de origem desses animais e licença de importação fornecida por autoridade competente.

**Parágrafo único.** No caso do vendedor ou possuidor não apresentar a licença de importação, o animal será confiscado e encaminhado à entidade designada pela comissão composta conforme art. 24 deste código, que tomará as providências cabíveis.

### **Seção III**

#### **Da pesca**

**Art. 8º.** São de domínio público todos os animais e vegetação que se encontram nas águas dominiais.

**Art. 9º.** Toda alteração no regime dos cursos de água, devida a obras, implicará medidas de proteção que serão determinadas e fiscalizadas por entidade estadual competente.

## **CAPÍTULO III**

### **Dos animais domésticos**

#### **Seção I**

##### **Dos animais de carga**

**Art. 10.** Será permitida a tração animal de veículos ou instrumentos agrícolas e industriais, somente pelas espécies bovinas, eqüinas ou muares.

**Art. 11.** É vedado:

- I - atrelar animais de diferentes espécies no mesmo veículo;
- II - utilizar animal cego, enfermo, extenuado ou desferrado em serviço, bem como castiga-lo;
- III - fazer o animal viajar a pé por mais de 10(dez) quilômetros sem lhe dar descanso;
- IV - fazer o animal trabalhar por mais de 06(seis) horas seguidas sem lhe dar água e alimento.

#### **Seção II**

**Art. 12.** Todo veículo de transporte de animais deverá estar em condições de lhes oferecer proteção e conforto adequados.

**Art. 13.** É vedado:

- I - transportar animais em via terrestre por mais de 12 horas seguidas sem o devido descanso;
- II - transportar animais sem a documentação exigida por lei;
- III - transportar animal fraco, ferido ou em adiantado estado de gestação.

## **CAPÍTULO IV**

### **Dos sistemas intensivos de economia agropecuária**

**Art. 14.** Consideram-se sistema de economia agropecuária aqueles que se baseiam na criação de animais em confinamento e no uso de tecnologia visando economia de espaço e trabalho e rápido ganho de peso.

**Art. 15.** Será passível de punição toda empresa que utilizar um sistema intensivo de economia agropecuária que não cumpra os seguintes requisitos:

**I** - os animais deverão receber água e alimento, atendendo-se também, suas necessidades psicológicas, de acordo com a evolução da ciência, observadas as exigências peculiares a cada espécie;

**II** - os animais deverão ter liberdade de movimentos de acordo com suas características morfológicas;

**III** - as instalações deverão proporcionar adequadas condições ambientais de higiene, circulação de ar e temperatura.

## **CAPÍTULO V**

### **Do abate de animais**

**Art. 16.** Todos os frigoríficos, matadouros e abatedouros do Estado do Paraná deverão utilizar-se de métodos científicos, modernos de insensibilização, aplicados antes da sangria, por instrumentos de percussão mecânica, processamento químico, elétrico ou decorrentes do desenvolvimento tecnológico.

**Art. 17.** É vedado:

**I** - o emprego de qualquer método considerado cruel para o abate;

**II** - o abate de fêmeas em período de gestação e de nascituros (até a idade de três meses de vida), exceto em caso de doença, com propósito de evitar o sofrimento do animal.

## **TÍTULO II**

### **CAPÍTULO I**

#### **Dos animais de laboratório**

##### **Seção I**

##### **Da vivissecção**

**Art. 18.** Consideram-se vivissecção os experimentos realizados com animais vivos em centros de pesquisa.

**Art. 19.** Os centros de pesquisa deverão ser devidamente registrados no órgão competente e supervisionados por profissionais de nível superior, nas áreas afins.

**Art. 20.** O diretor do centro de pesquisa, antes de proceder a qualquer experimento com animal vivo, deverá relatar ao órgão competente a natureza do experimento, a quantidade e a espécie dos animais utilizados e o nível de dor que os mesmos sofrerão.

**Art. 21.** Será proibida a prática de vivissecção sem uso de anestésico, bem como a sua realização em estabelecimentos escolares de ensino fundamental e médio.

**§ 1º.** Os relaxantes musculares, parciais ou totais, não serão considerados anestésicos.

**§ 2º.** Será obrigatória a presença de anestesista quando da realização do experimento de vivissecção.

**Art. 22.** Com relação ao experimento de vivissecção é proibido:

**I** - realizar experiências cujos resultados já sejam conhecidos ou destinados a demonstração didática que já tenham sido firmadas ou ilustradas;

**II** - realizar experimentos que visem demonstrar os efeitos de drogas venenosas ou tóxicas, como também aqueles que conduzam o animal ao estresse, à inanição ou à perda da vontade de viver;

**III** - realizar experiência com fins comerciais ou de qualquer outra ordem, e que não tenha cunho eminentemente científico;

**IV** - utilizar animal já submetido a outro experimento ou realizar experiência prolongada com o mesmo animal.

**Art. 23.** É proibido importar ou exportar animal para pesquisas científicas e médicas.

**Art. 24.** Nos locais onde esteja autorizada a vivisseção, deverá constituir-se uma comissão de ética, composta por, no mínimo, 03(três) médicos veterinários, sendo um, necessariamente, representante de entidade pública, sistema SEAGRI.

**Art. 25.** Além do disposto no parágrafo único, do art. 7º deste regulamento, competirá à comissão de ética:

**I** - fiscalizar a habilitação e a capacidade do pessoal encarregado de prestar assistência aos animais;

**II** - verificar se estão sendo respeitados os procedimentos para prevenir dor e sofrimento dos animais, tais como a aplicação de anestésicos ou analgésicos;

**III** - denunciar ao órgão competente qualquer desobediência a esta lei.

**Art. 26.** Todos os centros de pesquisa deverão possuir os recursos humanos e materiais necessários a fim de poder zelar pela saúde e bem-estar dos animais.

**Art. 27.** Somente os animais criados nos centros de pesquisa poderão ser utilizados em experimentos.

## **Seção II**

### **Das disposições finais**

**Art. 28.** As penalidades e multas referentes às infrações definidas nesta lei serão estabelecidas pelo Poder Executivo, em espécie.

**Art. 29.** O Poder Executivo definirá o órgão estadual encarregado de fiscalizar o cumprimento das disposições desta lei, atendendo o disposto no art. 24 deste código.

**Art. 30.** O Poder Executivo regulamentará esta lei no prazo de 30(trinta) dias da data de sua publicação.

**Art. 31.** Esta lei entrará em vigor na data de sua publicação.  
Palácio Dezenove de Dezembro, em 20 de março de 2003.

*Hermas Brandão*  
*Presidente*

## ANEXO 5

### CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA RESOLUÇÃO Nº 714, DE 20 DE JUNHO DE 2002

Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências.

O CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA - CFMV, no uso da atribuição que lhe são conferidas pelo art. 16, alínea "f" da Lei nº 5.517/68, de 23 de outubro de 1968 e, Considerando a crescente preocupação da sociedade quanto à eutanásia dos animais e a necessidade de uniformização de metodologias junto à classe medicoveterinária; Considerando a diversidade de espécies envolvidas e a multiplicidade de métodos aplicados; Considerando que a eutanásia é um procedimento amplamente utilizado e necessário, e que sua aplicação pressupõe a observância de parâmetros éticos específicos,  
**RESOLVE:**

Art. 1º Instituir normas reguladoras de procedimentos relativos à eutanásia em animais.

#### **CAPÍTULO I DAS NORMAS GERAIS**

Art. 2º A eutanásia deve ser indicada quando o bem-estar do animal estiver ameaçado, sendo um meio de eliminar a dor, o distresse ou o sofrimento dos animais, os quais não podem ser aliviados por meio de analgésicos, de sedativos ou de outros tratamentos, ou, ainda, quando o animal constituir ameaça à saúde pública ou animal, ou for objeto de ensino ou pesquisa.

Parágrafo único. É obrigatória a participação do Médico Veterinário como responsável pela eutanásia em todas as pesquisas que envolvam animais.

Art. 3º O Médico Veterinário responsável pela eutanásia deverá:

- I - possuir prontuário com o(s) método(s) e técnica(s) empregados, mantendo estas informações disponíveis para utilização dos CRMVs;
- II - atentar para os riscos inerentes ao método escolhido para a eutanásia;
- III - pressupor a necessidade de um rodízio profissional, quando houver rotina de procedimentos de eutanásia, com a finalidade de evitar o desgaste emocional decorrente destes procedimentos;
- IV - permitir que o proprietário do animal assista à eutanásia, sempre que este assim o desejar.

Art. 4º Os animais deverão ser submetidos à eutanásia em ambiente tranquilo e adequado, longe de outros animais e do alojamento dos mesmos.

Art. 5º A eutanásia deverá ser realizada segundo legislação municipal, estadual e federal, no que se refere à compra e armazenamento de drogas, saúde ocupacional e a eliminação de cadáveres e carcaças.

Art. 6º Quando forem utilizadas substâncias químicas que deixem ou possam deixar resíduos é terminantemente proibida a utilização da carcaça para alimentação.

Art. 7º Os procedimentos de eutanásia, se mal empregados, estão sujeitos à legislação federal de crimes ambientais.

## **CAPÍTULO II DOS PROCEDIMENTOS**

Art. 8º A escolha do método dependerá da espécie animal envolvida, dos meios disponíveis para a contenção dos animais, da habilidade técnica do executor, do número de animais e, no caso de experimentação animal, do protocolo de estudo, devendo ainda o método ser:

I - compatível com os fins desejados;

II - seguro para quem o executa, causando o mínimo de estresse no operador, no observador e no animal;

III - realizado com o maior grau de confiabilidade possível, comprovando-se sempre a morte do animal, com a declaração do óbito pelo Médico Veterinário.

Art. 9º Em situações onde se fizer necessária a indicação da eutanásia de um número significativo de animais, como por exemplo, rebanhos, Centros de Controle de Zoonoses, seja por questões de saúde pública ou por questões adversas aqui não contempladas, a prática da eutanásia deverá adaptar-se a esta condição, seguindo sempre os métodos indicados para a espécie em questão.

Art. 10. Os procedimentos de eutanásia são de exclusiva responsabilidade do médico veterinário.

Art. 11. Nas situações em que o objeto da eutanásia for o ovo embrionado, a morte do embrião deverá ser comprovada antes da manipulação ou eliminação do mesmo.

## **CAPÍTULO III DOS MÉTODOS RECOMENDADOS**

Art. 12. Os agentes e métodos de eutanásia, recomendados e aceitos sob restrição, seguem as recomendações propostas e atualizadas de diversas linhas de trabalho consultadas-, entre elas a Associação Americana de Medicina Veterinária

(AVMA), estando adequados à realidade nacional, e encontram-se listados, por espécie, no anexo I desta Resolução.

§ 1º Métodos recomendados são aqueles que produzem consistentemente uma morte humanitária, quando usados como métodos únicos de eutanásia.

§ 2º Métodos aceitos sob restrição são aqueles que, por sua natureza técnica ou por possuírem um maior potencial de erro por parte do executor ou por apresentarem problemas de segurança, podem não produzir consistentemente uma morte humanitária, ou ainda por se constituírem em métodos não bem documentados na literatura científica. Tais métodos devem ser empregados somente diante da total impossibilidade do uso dos métodos recomendados constantes do anexo I desta Resolução.

Art. 13. Outros métodos de eutanásia não contemplados no ANEXO I poderão ser permitidos, desde que realizados sob autorização do CRMV ou CFMV.

Art. 14. São considerados métodos inaceitáveis:

I - Embolia Gasosa;

II - Traumatismo Craniano;



- III - Incineração in vivo;  
 IV - Hidrato de Cloral (para pequenos animais);  
 V - Clorofórmio;  
 VI - Gás Cianídrico e Cianuretos;  
 VII - Descompressão;  
 VIII - Afogamento;  
 IX - Exsanguinação (sem sedação prévia);  
 X - Imersão em Formol;  
 XI - Bloqueadores Neuromusculares (uso isolado de nicotina, sulfato de magnésio, cloreto de potássio e todos os curarizantes);  
 XII - Estricnina.

Parágrafo único. A utilização dos métodos deste artigo constitui-se em infração ética.

Art. 15. Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação, revogadas as disposições em contrário.

## ANEXO I

<b>Espécie</b>	<b>Recomendados</b>	<b>Aceitos sob Restrição</b>
Anfíbios	Barbitúricos, anestésicos inaláveis (em algumas espécies), Dióxido de Carbono (CO <sup>2</sup> ), Monóxido de Carbono (CO), metano sulfonato de tricaina (TMS, MS222), hidrocloreto de benzocaína, dupla secção da medula espinhal	Pistola de ar comprimido, pistola, atordoamento e decapitação, decapitação e secção da medula espinhal
Animais selvagens de vida livre	Barbitúricos intra-venosos (IV) ou intra-peritoniais (IP), anestésicos inaláveis, cloreto de potássio com anestesia geral prévia.	CO <sup>2</sup> , CO, Nitrogênio (N <sup>2</sup> ), argônio, pistola de ar comprimido, pistola, armadilhas (testadas cientificamente)
Animais de zoológicos	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO <sup>2</sup> , CO, cloreto de potássio com anestesia geral prévia	N <sup>2</sup> , argônio, pistola de ar comprimido, pistola
Aves	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO <sup>2</sup> , CO, pistola	N <sup>2</sup> , argônio, deslocamento cervical, decapitação
Cães	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO <sup>2</sup> , CO, cloreto de potássio com anestesia geral prévia	N <sup>2</sup> , argônio, pistola de ar comprimido, eletrocussão com sedação prévia
Cavalos	Barbitúricos, cloreto de potássio com anestesia geral prévia, pistola de ar comprimido	Hidrato cloral, (IV, após sedação), pistola, eletrocussão com sedação prévia
Coelhos	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO <sup>2</sup> , CO, cloreto de potássio com anestesia geral	N <sup>2</sup> , argônio, deslocamento cervical (<1kg), decapitação, pistola de ar

	prévia	comprimido
Gatos	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO <sup>2</sup> , CO, cloreto de potássio com anestesia geral prévia	N <sup>2</sup> , argônio
Mamíferos marinhos	Barbitúricos, hidrocloreto de etorfina	Pistola (cetáceos <4m de comprimento)
Peixes	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO <sup>2</sup> , triclaína metano sulfonato (TMS, MS222), hidrocloreto de benzocaína, 2-fenoxietanol	Decapitação e secção da medula espinhal, atordoamento e decapitação ou secção da medula espinhal
Primatas não-humanos	Barbitúricos	Anestésicos inaláveis, CO <sup>2</sup> , CO, N <sup>2</sup> , argônio
Répteis	Barbitúricos, anestésicos inaláveis (em algumas espécies), CO <sup>2</sup> (em algumas espécies)	Pistola de ar comprimido, pistola, decapitação e secção da medula espinhal, atordoamento e decapitação
Roedores e outros pequenos mamíferos	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO <sup>2</sup> , CO, cloreto de potássio com anestesia geral prévia	Metoxiflurano, N <sup>2</sup> , argônio, deslocamento cervical (ratos <200g), decapitação
Ruminantes	Barbitúricos, cloreto de potássio com anestesia geral prévia, pistola de ar comprimido	Hidrato cloral (IV, após sedação), pistola, eletrocussão, com sedação prévia
Suínos	Barbitúricos, CO <sup>2</sup> , cloreto de potássio com anestesia geral prévia, pistola de ar comprimido	Anestésicos inaláveis, CO, hidrato cloral, (IV após sedação), pistola, eletrocussão com sedação prévia, pancada na cabeça (< 3 semanas de idade)
Visões, raposas, e outros mamíferos criados para extração do pêlo	Barbitúricos, anestésicos inaláveis, CO <sup>2</sup> (visões requerem altas concentrações para eutanásia sem agentes suplementares), CO, cloreto de potássio, com anestesia geral prévia	N <sup>2</sup> , argônio, eletrocussão, com sedação prévia seguida de deslocamento cervical.

## ANEXO 6

### CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA

#### RESOLUÇÃO Nº 879, DE 15 DE FEVEREIRO DE 2008

Dispõe sobre o uso de animais no ensino e na pesquisa e regulamenta as Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs) no âmbito da Medicina Veterinária e da Zootecnia brasileiras e dá outras providências.

O CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA – CFMV, no uso das atribuições que lhe são conferidas pelo artigo 16, alínea “f” da Lei nº 5.517, de 23 de outubro de 1968, c/c com os artigos 2º, 4º, 6º, incisos VIII e XIII, Artigo 13, incisos XXI e XXII e Artigo 25 da Resolução nº 722, de 16 de agosto de 2002, considerando a necessidade de disciplinar, uniformizar e normatizar o uso científico de animais sencientes no ensino e na pesquisa médico-veterinária e zootécnica, em nível nacional; considerando a necessidade de adequar ou criar comissões de ética no uso de animais nas instituições de ensino superior e de pesquisa no âmbito da Medicina Veterinária e da Zootecnia; considerando que a formação do médico veterinário e do zootecnista lhes imputa o zelo pelo bem-estar animal; com o intuito de atender às necessidades físicas, mentais, etológicas e sanitárias dos mesmos; considerando a necessidade da aplicação das Cinco Liberdades do bem-estar animal no ensino e na experimentação; considerando a necessidade de adotar o Princípio dos “3 R’s”, substituir, reduzir e refinar, no uso de animais no ensino e na experimentação, RESOLVE:

#### CAPÍTULO I

##### DAS DISPOSIÇÕES PRELIMINARES

Art. 1º Instituir, no âmbito do Conselho Federal de Medicina Veterinária, normas regulatórias que balizem o uso científico e didático de animais e a atuação das Comissões de Ética no Uso de Animais em ensino e experimentação (CEUAs) pelas Instituições de Ensino Superior (IES) e de Pesquisa em áreas de interesse da Medicina Veterinária e da Zootecnia.

#### CAPÍTULO II

##### DO BEM-ESTAR ANIMAL NA EXPERIMENTAÇÃO E ENSINO

Art. 2º Qualquer procedimento que cause dor no ser humano causará dor em outras espécies de vertebrados, tendo em vista que os animais são seres sencientes, experimentam dor, prazer, felicidade, medo, frustração e ansiedade. Art. 3º As atividades científicas e de ensino envolvendo animais devem ser realizadas apenas com a finalidade de:

- I – obter informações significativas ao entendimento de ecossistemas, animais e seres humanos;
- II – realizar experimentos científicos que visam desenvolver novas técnicas de diagnóstico e tratamento de doenças do homem e dos animais;

III – melhorar os sistemas de produção animal;

IV – fortalecer os métodos educativos.

Art. 4º O uso de animais em atividades de ensino deve observar as seguintes exigências:

I – não utilizar animais se houver método substitutivo;

II – não utilizar métodos que induzam o sofrimento;

III – não reutilizar animais em procedimentos clínicos e cirúrgicos, ainda que praticados simultaneamente;

IV – utilizar animais em boas condições de saúde.

Art. 5º As atividades de ensino e experimentação devem garantir o bem-estar dos animais utilizados, proporcionando uma vida digna e respeitando a satisfação das suas necessidades físicas, mentais e naturais.

Art. 6º Nas atividades de ensino e experimentação deve-se aplicar os princípios de substituição, redução e refinamento no uso de animais, com o fim de evitar mortes, estresse e sofrimento desnecessários.

§1º Sendo possível alcançar de outra forma o objetivo proposto deve-se substituir o uso de animais no ensino e na experimentação por outro método.

§2º Deve ser reduzido ao mínimo possível o número de animais utilizados nas atividades didáticas e científicas.

§3º Durante os procedimentos didáticos e científicos, deve ser evitado a ocorrência de dor e minimizado o estresse e o desconforto dos animais.

Art. 7º O preceito das Cinco Liberdades do bem-estar animal deve ser adotado com a finalidade de manter os animais:

I – livres de fome, sede e desnutrição;

II – livres de desconforto;

III – livres de dor, injúrias e doenças;

IV – livres para expressar o comportamento natural da espécie;

V – livres de medo e estresse.

### CAPÍTULO III

#### DAS COMISSÕES DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAs)

##### Seção I

##### Definição e Normas das CEUAs

Art. 8º A CEUA é um órgão de assessoria institucional autônomo, colegiado, multidisciplinar e deliberativo do ponto de vista ético em questões relativas ao uso de animais no ensino e na experimentação.

Art. 9º Toda Instituição de Ensino e/ou Pesquisa deve criar e manter uma Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) que deverá ser registrada e atualizada no CFMV.

§ 1º A organização e criação das CEUAs serão de responsabilidade da Instituição mantenedora, respeitadas as normas desta Resolução.

§ 2º Caberá a Comissão de Ética, Bioética e Bem-Estar Animal (CEBEA) do Conselho Federal de Medicina Veterinária coordenar as atividades de orientação, avaliação e aprovação dos documentos institucionais, bem como o registro das CEUAs junto ao CFMV.

Art. 10. A instituição interessada em habilitar-se para registro da CEUA deverá encaminhar ao CFMV requerimento instruído com os seguintes documentos:

I – formulário de cadastro da CEUA no CFMV anexo I desta Resolução;

II – cópia do Regimento Interno da CEUA acompanhado de documento comprobatório, emitido por instância acadêmica e/ou administrativa com poder institucional de decisão;

III – composição dos membros da CEUA, número do respectivo registro profissional, quando se aplicar, e mandatos correspondentes com os respectivos períodos de vigência;

IV – modelo do Protocolo utilizado pela CEUA junto a Instituição mantenedora.

Art. 11. Todas as atividades didáticas e científicas que envolvam o uso de animais deverão ser submetidas à aprovação prévia da CEUA.

O inciso “III” do art. 10. está com a redação dada pelo art. 1º da Resolução nº 937, de 26-02-2010, publicada no DOU de 02-03-2010, Seção 1, pág. 141. Seção II

#### Da Competência das CEUAs

Art. 12. Compete a CEUA:

I – cumprir e fazer cumprir, no âmbito de suas atribuições, o disposto nesta Resolução e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em pesquisa;

II – examinar previamente os protocolos de pesquisa e ensino em animais a serem realizados na instituição, com base no ordenamento jurídico brasileiro e na legislação específica do CFMV, nos aspectos éticos e do mérito científico;

III – expedir atestado com lavra de aprovado, reprovado, ou em pendência, sobre protocolos de pesquisa e ensino que envolvam a utilização de animais;

IV – acompanhar a evolução do protocolo de pesquisa ou ensino, bem como vistoriar as instalações onde se realiza o projeto e o alojamento dos animais;

V – receber denúncias de maus tratos relativas aos animais da Instituição;

VI – decidir pela continuidade, modificação ou suspensão do protocolo, ao observar ou receber denúncias de irregularidades no decorrer do projeto;

VII – manter cadastro atualizado dos protocolos de pesquisa e ensino e dos respectivos pesquisadores da instituição;

VIII – desempenhar papel consultivo e educativo fomentando a reflexão em torno da ética na ciência e orientando os pesquisadores sobre procedimentos de pesquisa, bem como sobre as instalações necessárias para a manutenção dos animais em experimentação;

IX – encaminhar relatório técnico anual para a Comissão de Ética, Bioética e Bem-Estar Animal do CFMV para atualização do cadastro nacional dos protocolos de ensino e pesquisa em animais;

X – resguardar o sigilo científico e industrial dos procedimentos, sob pena de ser imputada responsabilidade aos membros da CEUA;

XI – exercer independência e autonomia na análise de protocolos de pesquisa e na tomada de decisões, garantidas pela Instituição na qual atua.

#### Seção III

##### Da Composição das CEUAs

Art. 13. A CEUA será composta por um número mínimo de 7 (sete) membros, incluindo a participação de Profissionais, Pesquisadores e/ou Professores e representantes da sociedade. Excetuando-se o Presidente, sua composição deve contemplar:

I – 50% de profissionais das áreas de ciências agrárias e/ou biomédicas, sendo pelo menos 1 (um) Médico Veterinário; II – 50% dos demais membros serão constituídos por representantes da sociedade civil e de profissionais das ciências exatas e humanas, sendo pelo menos um representante de associações de proteção e bem-estar animal, legalmente constituída, e um discente de

graduação ou pós-graduação, quando se tratar de Instituições de Ensino Superior.

Parágrafo único. De acordo com a necessidade e interesse da CEUA, poderão ser convidados consultores ad hoc para análise de projetos específicos.

#### Seção IV

##### Do Protocolo

Art. 14. O protocolo a ser submetido a CEUA deve conter no mínimo os seguintes aspectos:

I – composição, capacitação e atribuições específicas da equipe envolvida;

II – título do projeto ou plano de aula(s);

III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do proprietário ou responsável pelo(s) animal(is), quando for o caso;

IV – tempo previsto de duração do projeto de pesquisa ou da atividade de ensino a ser executada;

V – nível de abrangência do projeto: iniciação científica, mestrado, doutorado, pós-doutorado, outros;

VI – atividade de ensino: graduação, especialização, pós-graduação, outros;

VII – originalidade, justificativa e relevância do projeto de pesquisa ou da atividade de ensino;

VIII – informações relativas aos animais:

a) grau de severidade envolvido: brando, moderado e substancial;

b) características: espécie, raça ou linhagem, idade, sexo, peso;

c) número amostral e justificativa;

d) tempo de utilização na pesquisa ou procedimento didático;

e) condições de alojamento e de alimentação;

f) grau de intensidade previsto de estresse e/ou dor e medidas para minimização destes;

g) previsão de enriquecimento ambiental;

h) destino do animal após sua utilização;

i) declaração do pesquisador da inexistência de alternativas ao procedimento proposto;

j) termo de responsabilidade do pesquisador responsável, quando for o caso de se aplicar:

1) cirurgia(s);

2) métodos de anestesia e analgesia;

3) descrição de acesso restrito a água e alimento;

4) substâncias administradas: doses e vias de aplicação;

5) exposições a elementos físicos e atmosféricos;

6) extração de material e/ou fluidos: vias e quantidades;

7) método de contenção mecânica;

8) método de eutanásia. Art. 15. O CFMV procederá ao registro da CEUA habilitada de acordo com os seguintes critérios:

§ 1º O registro será feito em um banco de dados específico mantido no sistema operacional do CFMV, no qual constará numeração sequencial incluindo o ano de registro, dados institucionais, identificação do coordenador e mandato correspondente da CEUA.

§ 2º O CFMV expedirá um certificado de registro institucional, contendo o número do registro.

§ 3º O CFMV acompanhará as atividades das CEUAs registradas, podendo para tanto solicitar informações e proceder visitas periódicas.

§ 4º Em casos específicos e devidamente justificados, o CFMV poderá promover o descredenciamento da CEUA.

## CAPÍTULO IV

### DA COMISSÃO DE ÉTICA, BIOÉTICA E BEM-ESTAR ANIMAL (CEBEA)

#### Definição e competências

Art. 16. A Comissão de Ética, Bioética e Bem-Estar Animal (CEBEA) é uma instância consultiva e de assessoramento técnico do Conselho Federal de Medicina

Veterinária (CFMV), designada para proceder ao estudo e apreciação de matérias específicas, conforme previsto na Resolução 487, de 18 de abril de 1986.

Art. 17. É de competência da CEBEA a análise de aspectos éticos relacionados com o uso científico e didático de animais, coordenar o registro e atividades das CEUAs, elaborar e/ou atualizar normas específicas que visem o bemestar animal e assessorar o CFMV em áreas de interesse da Medicina Veterinária e Zootecnia.

## CAPÍTULO V

### DAS DISPOSIÇÕES GERAIS E TRANSITÓRIAS

Art. 18. A obediência aos preceitos desta Resolução não isenta o profissional de cumprir as exigências e regulamentações específicas relacionadas ao uso de animais em pesquisa e ensino em outras esferas competentes;

O art. 15 e seus §§ 1º, 2º, 3º e 4º foram acrescentados pelo art. 2º da Resolução nº 938, de 26-02-2010, publicada no DOU de 05-03-2010, Seção 1, pág. 186;

O CAPÍTULO IV e seus arts. 15 e 16 foram acrescentados pelo art. 3º da Resolução nº 938, de 26-02-2010, publicada no DOU de 05-03-2010, Seção 1, pág. 186;

O CAPÍTULO V está com a redação dada pelo art. 3º da Resolução nº 938, de 26-02-2010, publicada no DOU de 05-03-2010, Seção 1, pág. 186;

O art. 18 está com a redação dada pelo art. 1º da Resolução nº 938, de 26-02-2010, publicada no DOU de 05-03-2010, Seção 1, pág. 186. Art. 19. As Instituições de Ensino e Pesquisa que utilizem animais terão o prazo máximo de 180 (cento e oitenta) dias, após a publicação desta Resolução, para promoverem a adequação ou criação da respectiva CEUA;

Art. 20. Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação no DOU, revogadas as disposições em contrário.

Méd.Vet. Benedito Fortes de Arruda  
Presidente  
CRMV-GO nº 0272

Méd.Vet. Eduardo Luiz Silva Costa  
Secretário-Geral  
CRMV-SE nº 0037