

Efeito larvicida do óleo essencial das folhas de *Ruta graveolens* LINNEAU no controle de *Aedes aegypti* (LINNAEU, 1762) (Diptera: Culicidae)

Larvicidal effect of the essential oil from the leaves of *Ruta graveolens* LINNEAU in control of *Aedes aegypti* (LINNAEU, 1762) (Diptera: Culicidae)

Efecto larvicida del aceite esencial de las hojas de *Ruta graveolens* LINNEAU en el control de *Aedes aegypti* (LINNAEU, 1762) (Diptera: Culicidae)

Recebido: 30/08/2021 | Revisado: 07/09/2021 | Aceito: 13/09/2021 | Publicado: 14/09/2021

José Fábio França Orlanda

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6402-6192>

Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão, Brasil

E-mail: fabio.franca@uemasul.edu.br

Adenilde Nascimento Mouchrek

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3270-1437>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: adenild@bol.com.br

Resumo

Na busca pelo controle químico alternativo contra o *Aedes aegypti*, muitas pesquisas são desenvolvidas e incentivadas de modo a encontrar novas substâncias bioinseticidas de origem vegetal. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito larvicida do óleo essencial da arruda (*Ruta graveolens* Linneau) sobre as larvas do terceiro estágio do *Aedes aegypti*. A identificação dos componentes químicos presentes no óleo essencial de *R. graveolens* Linneau foi realizada por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG/MS). A atividade larvicida foi determinada empregando os métodos de Reed-Muench e Pizzi em larvas do *Aedes aegypti*. Os resultados demonstraram que o óleo essencial de arruda apresentou a maior atividade larvicida, na concentração de $61,641 \pm 1,72 \mu\text{g mL}^{-1}$. A eficiência da mortalidade do *Aedes aegypti* pode estar relacionada à presença de 2-nonanona e 2-undecanona (metilcetonas) no óleo essencial de arruda, componentes importantes de reconhecida eficácia como inseticida. Dessa forma pode-se verificar que o óleo essencial em estudo apresenta compostos químicos com efeito larvicida contra o *A. aegypti*.

Palavras-chave: *Ruta graveolens* Linneau; Óleo essencial; Atividade larvicida; *Aedes aegypti*.

Abstract

In the search for an alternative chemical control against *Aedes aegypti*, many researches are developed and encouraged in order to find new bioinsecticide substances of plant origin. Thus, the objective of this work was to evaluate the larvicidal effect of the essential oil of rue (*Ruta graveolens* Linneau) on third instar *Aedes aegypti* larvae. The identification of chemical components present in the essential oil of *R. graveolens* Linneau was performed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). Larvicidal activity was determined using the Reed-Muench and Pizzi methods in *Aedes aegypti* larvae. The results showed that the essential oil of rue had the highest larvicidal activity, at a concentration of $61,641 \pm 1,72 \mu\text{g mL}^{-1}$. The mortality efficiency of *Aedes aegypti* may be related to the presence of 2-nonanone and 2-undecanone (methylketones) in the rue essential oil, important components of recognized efficacy as an insecticide. Thus, it can be seen that the essential oil under study has chemical compounds with a larvicidal effect against *A. aegypti*.

Keywords: *Ruta graveolens* Linneau; Essential oil; Larvicidal activity; *Aedes aegypti*.

Resumen

En la búsqueda de un control químico alternativo contra *Aedes aegypti*, se desarrollan y fomentan muchas investigaciones para encontrar nuevas sustancias bioinsecticidas de origen vegetal. Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto larvicida del aceite esencial de ruda (*Ruta graveolens* Linneau) en larvas de *Aedes aegypti* de tercer estadio. La identificación de los componentes químicos presentes en el aceite esencial de *R. graveolens* Linneau se realizó mediante cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC/MS). La actividad larvicida se determinó mediante los métodos Reed-Muench y Pizzi en larvas de *Aedes aegypti*. Los resultados mostraron que el aceite esencial de ruda tuvo la mayor actividad larvicida, a una concentración de $61,641 \pm 1,72 \mu\text{g mL}^{-1}$. La eficiencia de mortalidad de *Aedes aegypti* puede estar relacionada con la presencia de 2-nonanona y 2-undecanona (metilcetonas) en el aceite esencial de ruda, componentes importantes de reconocida eficacia como insecticida. Así, se puede observar que el aceite esencial en estudio tiene compuestos químicos con efecto larvicida contra *A. aegypti*.

Palabras clave: *Ruta graveolens* Linneau; Aceite esencial; Actividad larvicida; *Aedes aegypti*.

1. Introdução

As doenças transmitidas por mosquitos são responsáveis por elevados índices de morbidade e mortalidade no Brasil. O *Aedes aegypti* (Linnaeu, 1762) (Diptera, Culicidae) é atualmente o mosquito que apresenta a maior dispersão em áreas urbanas no mundo e um dos maiores problemas para a saúde pública (Marques, et al., 2021; Nasser, et al., 2021).

O mosquito é definido como doméstico, antropofílico, comportamento sinantrópico e com atividade hematofágica diurna. A transmissão do vírus ocorre por meio da picada de uma fêmea adulta infectada, sendo que uma única fêmea consegue transmitir o vírus da dengue até 12 vezes ou mais, ao longo de sua vida (Benelli & Mehlhorn, 2016).

As estratégias de controle estão baseadas no controle do vetor, empregando produtos químicos sintéticos e biológicos, integrados com programas de manejo ambiental que utilizam principalmente inseticidas químicos, onde se destacam os organofosforados e piretróides (Silva, et al., 2019). Entretanto, o frequente emprego de inseticidas químicos no controle de vetores pode favorecer o desenvolvimento de resistência dos insetos, contribuindo para o aumento das populações de mosquitos. A perspectiva de controle desse vetor, esbarra na sua grande capacidade adaptativa às condições adversas, como o desenvolvimento em águas poluídas, e a quiescência dos ovos em ambientes inóspitos (Govindarajan, et al., 2013).

Na busca por melhores alternativas no controle da dengue encontra-se a utilização de plantas com atividade inseticida. É uma alternativa bastante estudada nas últimas décadas, principalmente, pelo seu menor impacto à saúde humana e ao ambiente, além de representar um método de fácil obtenção (Pandiyan, et al., 2019; Pavela, et al., 2018).

A família Rutaceae compreende cerca de 150 gêneros e mais de 1600 espécies de portes variados, amplamente distribuídos pelas regiões tropicais e temperadas do globo (Albarici, et al., 2013; Pirani & Groppo, 2010). Esta família é conhecida por apresentar uma grande diversidade de metabólitos secundários fortemente aromáticos devido à presença de óleos essenciais, o que tem atraído à atenção de vários grupos de pesquisadores devido à importância química e biológica de muitos destes metabólitos (Attia, et al., 2018; Orlanda & Nascimento, 2015).

Dentre os representantes desta família produtora de óleo essencial, destaca-se a *Ruta graveolens* Linnaeu, conhecida popularmente como arruda, arruda-fedorenta, ruta-de-cheiro-forte, arruda-doméstica e arruda-dos-jardins, largamente utilizada como recurso medicinal pela população local em todo o Brasil (Al-Qurainy, et al., 2011). Ensaio farmacológicos comprovaram seu efeito como antimicrobiano, anti-helmíntica, febrífuga, emenagoga, abortiva, antiparasitária, espasmolítica, fotossensibilizante, cicatrizante, anti-inflamatória, antirreumática e antiulcerogênica, anti-helmíntica, sudorífera, vermífuga e repelente (Orlanda & Nascimento, 2015; Mejri, et al., 2010; Yamashita, et al., 2010).

Devido à grande necessidade de um controle mais efetivo sobre os vetores do vírus da dengue, é necessário mais estudos sejam conduzidos para o desenvolvimento de inseticidas naturais que não afetem o meio ambiente. Com isso, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial larvicida do óleo essencial de arruda contra larvas de *Aedes aegypti*.

2. Metodologia

2.1 Material vegetal

As folhas de *Ruta graveolens* Linnaeu foram coletadas no sítio localizado na Maioba, Município de Paço de Lumiar (Maranhão), em 2018. O material foi identificado e uma exsiccata de número 01/2018 foi depositada no Herbário da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão (UEMASUL).

2.2 Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial foi extraído a partir do material vegetal fresco submetido à hidrodestilação, em aparelho tipo Clevenger durante 4 horas na proporção de 1:10 (m/v), segundo Viuda-Martos, et al. (2011). A fase orgânica foi separada, seca

com sulfato de sódio anidro e o óleo conservado sob refrigeração a 10 ± 1 °C. O rendimento da extração foi calculado relacionando-se a massa de óleo obtida e a massa de material vegetal utilizado na hidrodestilação (em média 30 g).

2.3 Análise cromatográfica

A análise da composição química do óleo essencial foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplada à espectrometria de massas Shimadzu modelo QP-5000, equipado com uma coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com fase estacionária contendo 5% difenil e 95% dimetil polisiloxano. O gás de arraste foi o hélio, usado à pressão constante de 80 Kpa e fluxo constante de 1 mL/min. Alíquotas de 0,3 µL das amostras foram injetadas no modo split, com razão de divisão 1:10, com fonte de ionização a 70 eV. As condições de operação do equipamento foram as seguintes: temperatura do injetor: 280 °C; programação de temperatura do forno: 40 °C (5,0 min.) - 240 °C (4 °C min.⁻¹) - 240 °C - 300 °C (8 °C min.⁻¹, 7,5 min.) e linha de transferência 280 °C. O detector de massas é do tipo quadrupolo linear e varredura de 0,5 seg scan⁻¹.

A identificação química de cada substância foi determinada através dos seus tempos de retenção, índice de Kovats por comparação com os dados disponíveis no banco espectrais disponíveis no programa AMDIS (Automated Mass spectral Deconvolution Mass & Identification System) e informações comprovadas com dados da literatura (Adams, 2007).

2.4 Ensaios de atividade larvicida contra *Aedes aegypti*

A atividade larvicida foi realizada empregando 10 larvas do mosquito *Aedes aegypti* no terceiro estágio e 25 mL de solução de óleo essencial de arruda nas concentrações de 20 a 120 µg mL⁻¹. O óleo essencial foi dissolvido em 0,3 mL de dimetilsulfóxido e aferição do volume final com água deionizada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, seguindo o esquema fatorial 1 x 6 (óleo essencial x concentrações) totalizando 60 tratamentos e cinco repetições por tratamento, de modo que para cada tratamento utilizaram-se 100 larvas (20 larvas por repetição) a 28 ± 1 °C, $80 \pm 5\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 h. Após 24 h de exposição das larvas aos tratamentos, o número de larvas mortas foi registrado sendo consideradas mortas aquelas que não apresentavam movimento ou não respondiam aos estímulos com a pipeta de Pasteur. O dimetilsulfóxido foi utilizado como controle negativo na mesma concentração utilizada para dissolução da amostra e o organofosforado temefós na concentração de 100 mg L⁻¹ como controle positivo.

2.5 Análise Estatística

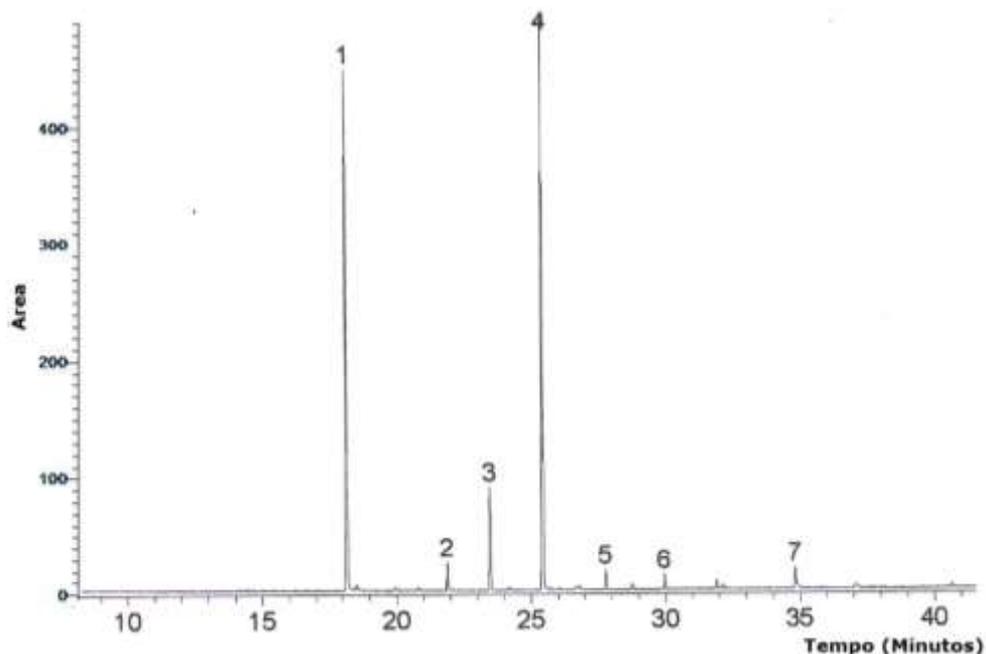
Os dados foram submetidos à análise conforme o método de Reed & Muench (1938) e Colegate & Molyneux (1993). O intervalo de confiança foi calculado empregando o método de Pizzi (1950), em que se constrói um gráfico do percentual de mortos contra logaritmo (log) da dose. O valor de “R” foi determinado pela diferença entre o log da dose que mata 75% das larvas e o log da dose que mata 25% das larvas. No cálculo da variável “h” foi realizado pela média das diferenças dos valores de log das doses. Com esses dados foi calculado o log do erro padrão (SE), através da seguinte fórmula: $(SE)^2 = 0,79 \times h \times R/20$. O valor do intervalo de confiança é igual 2×10^{SE} .

3. Resultados e Discussão

Os resultados demonstraram que a hidrodestilação das partes aéreas frescas de *Ruta graveolens* L. forneceu um óleo essencial de coloração verde-claro, odor forte, menos denso que a água e rendimento de 1,29% (CV=13,90%; n = 10). Estes resultados diferem dos obtidos por Gina et al. (2008) e De Feo et al. (2002), que obtiveram rendimento de 0,1 e 0,74% do óleo essencial de arruda empregando hidrodestilação das partes aéreas (caule e folhas) da planta, por um período de 4 horas de extração, respectivamente.

A análise por GC-MS permitiu a identificação de sete componentes, dispostos em ordem crescente de eluição utilizando coluna capilar HB-5MS, correspondendo a 100,0% da composição química do óleo (Figura 1).

Figura 1. Cromatograma do óleo essencial de *Ruta graveolens* L.



Fonte: Autores.

O óleo essencial de arruda apresentou natureza metilcetônica ou monoterpênóides, contendo 2-nonona, 2-decanona, 2-undecanona e 2-dodecanona, correspondendo por aproximadamente 89,94% do total. Outros compostos encontrados em menores concentrações foram acetato de octila (7,31%), ftalato de etila (1,73%) e acetato de pentadecanila (1,02%), como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Componentes químicos identificados através do espectro de massas do óleo essencial de *Ruta graveolens* L.

Pico ¹	t _{RET} ² (Minutos)	Nome do Composto ³	%A ⁴
1	18,15	2-Nonanona	39,17
2	21,89	2-Decanona	2,03
3	23,48	Acetato de octila	7,31
4	25,45	2-Undecanona	47,21
5	27,79	2-Dodecanona	1,53
6	29,97	Acetato de pentadecanila	1,02
7	34,83	Ftalato de etila	1,73

¹Número do pico pela ordem de eluição da coluna; ²t_{RET} = Tempo de retenção do composto na coluna em minutos; ³Nome mais comum do composto identificado; ⁴%A = Porcentagem de área normalizada a qual indica a distribuição relativa dos compostos na amostra.

Os compostos 2-nonanona e 2-undecanona (metilcetonas) identificados no óleo essencial, segundo a literatura apresentam propriedades biológicas comprovadas como: bactericida, fungicida, aleloquímicos, antioxidante, alelopático,

expectorantes, antivirais, descongestionantes hepáticos, estimulantes da circulação e do sistema nervoso central (SNC), repelente e inseticida (De Feo, et al., 2002; Bernardo, et al., 2002; Rustaiyan, et al.; 2002).

Estudos realizados por Gina et al. (2008), o óleo essencial de arruda apresentou quatorze componentes químicos, 83,4% dos compostos identificados como compostos alifáticos, principalmente cetonas. Neste estudo foram encontrados a série 2-ona desde C-8 a C-13, com predominância de membros ímpares, o mais abundante 2-undecanona (43,0%) e 2-nonanona (33,5%). Em menor concentração foram identificados os hidrocarbonetos insaturados: geijereno (0,2%) e pregeijereno (6,0%), os compostos aromáticos: trans-anetol (3,5%) e isomaturina (1,3%).

Segundo De Feo et al. (2002) e Rustaiyan (2002), a composição química de óleo essencial de arruda que cresce nos Andes Venezuelanos (Mérida), apresentou como compostos majoritários o 2-undecanona (43,0%) e 2-nonanona (33,5%). O óleo venezuelano não apresentou compostos terpênicos e somente a presença de compostos alifáticos (83,4%), principalmente os cetônicos (toda a série 2-ona a partir de C-8 até C-13) com pequenas quantidades de álcoois, aldeídos, ésteres, hidrocarbonetos insaturados (geijereno e pregeijereno - 6,2%) e aromáticos (trans-anetol e isomaturina - 4,8%).

Conforme os dados mostrados na Tabela 2, verificou-se que o óleo essencial na concentração de 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou a menor atividade larvicida, correspondendo a 10,0% de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti*. A partir da concentração de 70,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o ensaio biológico ficou constante, provocando a morte de 100,0% dos indivíduos testados. A inexistência de mortalidade em todos os grupos controles indica que o dimetilsulfóxido utilizado para diluir o óleo, não afetou o desenvolvimento larval.

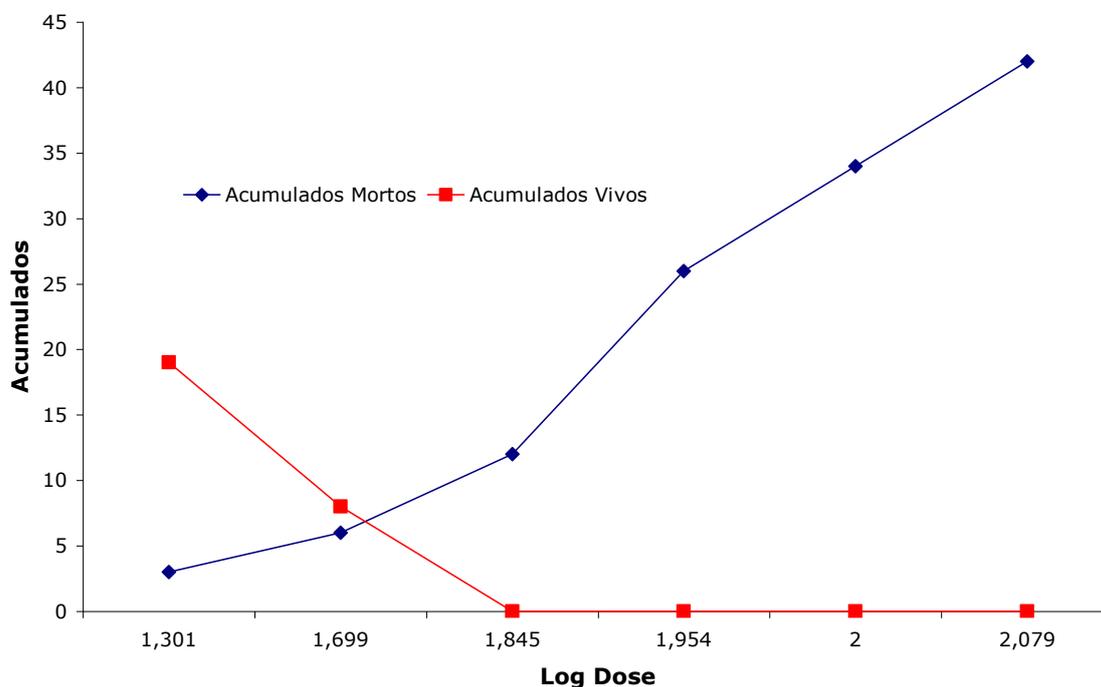
Tabela 2. Mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição em diferentes concentrações de óleo essencial de arruda.

Dose ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Log dose	Mortos	Vivos	Acumulados mortos	Acumulados vivos	Mortalidade (%)
20,0	1,3010	1	9	3	19	10,0
50,0	1,6989	7	3	6	8	70,0
70,0	1,8451	10	0	12	0	100,0
90,0	1,9542	10	0	26	0	100,0
100,0	2,0000	10	0	34	0	100,0
120,0	2,0791	10	0	42	0	100,0
CN	-	0	10	-	-	0
CP	-	10	0	-	-	100,0

Número de larvas (n = 10), CN = Controle Negativo e CP = Controle Positivo. Fonte: Autores.

O óleo essencial das folhas da arruda exibiu atividade larvicida significativa. A concentração letal 50% (CL_{50}), concentração onde cinquenta por cento das larvas testadas morrem, foi calculada através da intersecção das curvas de indivíduos acumulados mortos e indivíduos acumulados vivos, tendo como resultado a concentração de 61,641 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com um intervalo de confiança de 1,72 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $CL_{50} = 61,641 \pm 1,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 2). Em estudos realizados por Cheng et al (2003), os valores de $CL_{50} < 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados ativos e bastante promissor para redução do crescimento larval.

Figura 2. Estimativa da CL₅₀ do óleo essencial de arruda pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada.



Fonte: Autores.

A eficiência na mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* pode estar relacionada com a presença de 2-nonanona e 2-undecanona (metil-cetonas) no óleo essencial de arruda, principais componentes majoritários de reconhecida eficácia como inseticida. Além disso, temos que considerar o provável efeito sinérgico ou antagônico resultante de outros componentes em menor concentração. Conforme Mendes et al. (2020), a mortalidade pode estar relacionada com o efeito de contato do óleo essencial com o tegumento do inseto, com atuação sobre as enzimas digestivas e neurológicas, provocando tremores, paralisia e morte.

A atividade larvicida do óleo essencial de *Ruta graveolens* L. frente as larvas de *A. aegypti* é eficiente em baixas concentrações, principalmente ao comparar os resultados obtidos por Tabanca et al. (2015), que obteve valor de CL₅₀ de 21,25 mg L⁻¹ e CL₉₀ 34,35 mg L⁻¹.

Dessa forma, os resultados sugerem que o óleo essencial em estudo é um promissor agente larvicida sobre *A. aegypti*, devido ao efeito sinérgico entre os seus constituintes e facilidade de obtenção.

4. Conclusão

Os bioensaios larvicidas do óleo essencial de *Ruta graveolens* L. sobre *Aedes aegypti* apresentaram a concentração letal média (CL₅₀) no valor de 61,641 µg mL⁻¹, atribuídos ao efeito sinérgico do 2-nonanona e 2-undecanona (metilcetonas) com os demais componentes. Os resultados obtidos são promissores demonstrando ser uma alternativa viável no controle ao vetor da dengue, diminuindo o impacto sobre o ambiente e a saúde da população.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e a Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelo suporte financeiro.

Referências

- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Four ed. Allured, Carol Stream, Illinois, 2007.
- Albarici, T. R., Vieira, P. C., Fernandes, J. B., Silva, M. F. G., & Pirani, J. R. (2010). Cumarinas e alcaloides de *Rauia resinosa* (Rutaceae). *Química Nova*, 33(1), 2130-2134.
- Al-Qurainy, A., Khan, S., Ali, M. A., Fahad, M., Al-Hemaid, M. T., & Ashraf, M. (2011). Authentication of *Ruta graveolens* and its adulterant using internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA. *Pakistan Journal of Botany*, 43(3), 1613-1620.
- Attia, E. Z., El-Baky, R. M. A., Desoukey, S. Y., Mohamed, M. A. E. H., Bishr, M. M., & Kamel, M. S. (2018). Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils of *Ruta graveolens* plants treated with salicylic acid under drought stress conditions. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 254-264.
- Benelli, G., & Mehlhorn, H. (2016). Declining malaria, rising of dengue and Zika virus: insights for mosquito vector control. *Parasitology Research*, 115(5), 1747-1754.
- Bernardo, L. C., De Oliveira, M. B., Da Silva, C. R., Dantas, F. J., De Matros, J. C., Caldeira, A. A., Moura, R. S., & Bernardo Filho, M. (2002). Biological effects of rutin on the survival of *Escherichia coli* AB1157 and on the electrophoretic mobility of plasmid PUC9.1 DNA. *Cellular and Molecular Biology*, 48(5), 517-520.
- Cheng, S. S., Changa, H., Changa, S., Tsaib, K., & Chenc, K. (2003). Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technology*, 89, 99-102.
- Colegate, S. M., & Molyneux, R. J. *Bioactive natural products: detection, isolation, an structural determination*. Boca Raton: CRC, 1993.
- De Feo, V., De Simone, F., & Senatore, F. (2002). Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*, 61, 573-578.
- Gina, M., Rojas, L., & Usubillaga, A. (2008) Estudio del aceite esencial de *Ruta graveolens* L. que crece en el Estado Mérida, Venezuela. *Revista de Faculdade de Farmácia*, 50(1),7-9.
- Govindarajan, M., Sivakumar, R., Rajeswary, M., & Yogalakshmi K. (2013). Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). *Experimental Parasitology*, 134, 7-11.
- Marques, D. M., Rocha, J. F., Almeida, T. S., & Mota, F. M. (2021). Essential oils of caatinga plants with deleterary action for *Aedes aegypti*: a review. *South African Journal of Botany*, 143, 69-78.
- Mejri, J., Abderrabba, M., & Mejri, M. (2010). Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis* L: influence of drying, hydro-distillation duration and plant parts. *Industrial Crops and Products*, 32: 671-673.
- Mendes, L. A., Martins, G. F., Valbon, W. R., Souza, T. D. S., Menini, L., Ferreira, A., & Ferreira, M. F. S. (2017). Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. *Industrial Crops & Products*, 108, 684-689.
- Nasser, S., Costa, M. P. M. da, Ferreira, I. L. M., & Lima, J. B. P. (2021). k-Carrageenan-*Bacillus thuringiensis* israelensis hydrogels: a promising material to combat larvae of the *Aedes aegypti* mosquito. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 1-8.
- Orlanda, J. F. F., & Nascimento, A. R. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) volatile oils, from São Luís, Maranhão, Brazil. *South African Journal of Botany*, 99, 103-106.
- Pandiyam, N., Mathew, N., & Munusamy, S. (2019). Larvicidal activity of selected essential oil in synergized combinations against *Aedes aegypti* G. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 549-556.
- Pavela, R., Maggi, F., Lupidi, G., Mbuntcha, H., Woguem, V., Womeni, H. M., Barboni, L., Tapondjou, L. A., & Benelli, G. (2018). *Clausena anisata* and *Dysphania ambrosioides* essential oils: from ethno-medicine to modern uses as effective insecticides. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(11), 10493-10503.
- Pirani, J. R., & Groppo, M. Em catálogo de espécies de plantas e fungos do Brasil. Forzza, R. C., et al. Jardim Botânico do Rio de Janeiro: 2010, 592-1600.
- Pizzi, M. (1950). Sampling variation of the fifty percent end-point, determined by the Reed-Muench (Behrens) Method. *Human Biology*, 22, 151-190.
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent end-points. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 27, 493-497.
- Rustaiyan, A., Khossravi, M., & Sultani-Lotfabadif, Y. M. (2002). Constituents of the essential oil of *Ruta chalepensis* from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 14, 378-379.
- Silva, P. T., Santos, H. S., Teixeira, A. M. R., Bandeira, P. N., Holanda, C. L., Vale, J. P. C., Pereira, E. J. P., Menezes, J. E. S. A., Rodrigues, T. H. S., Souza, E. B., Silva, H. C., & Santiago, G. M. P. (2019). Seasonal variation in the chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oils from *Vitex gardneriana* Schauer. *South African Journal of Botany*, 124, 329-332.
- Tabanca, N., Demirci, B., Kiyani, H., Ali, A., Bernier, U., Wedge, D. E., Khan, I., & Başer, K. (2012) Repellent and larvicidal activity of *Ruta graveolens* essential oil and its major individual constituents against *Aedes aegypti*. *Planta Medica*, 78, 90.
- Viuda-Martos, M., Mohamady, M. A., Fernández-López, J., Abd ElRazik, K. A., Omer, E. A., & Pérez-Alvarez, J. A. (2011). *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*, 22, 1715-1722.
- Yamashita, O. M., Fernandes Neto, E., Campos, O. R. & Guimarães, S. C. (2010). Fatores que afetam a germinação de sementes e emergência de plântulas de arruda (*Ruta graveolens* L.). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 11(2), 202-208.