

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO ANALÍTICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DA
MISTURA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DA *Pimenta dioica* Lindl E DOS
GALHOS DE *Aniba duckei* Kostermans FRENTE AO MOQUISTO *Aedes aegypti*
(Linnaeus, 1762)

ALDEMIR DA GUIA SCHALCHER PEREIRA

São Luís

2009

ALDEMIR DA GUIA SCHALCHER PEREIRA

**ESTUDO ANALÍTICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DA
MISTURA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DA *Pimenta dioica* Lindl E DOS
GALHOS DE *Aniba duckei* Kostermans FRENTE AO MOQUISTO *Aedes aegypti*
(Linnaeus, 1762)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Química da Universidade
Federal do Maranhão para obtenção do título de
Mestre em Química (Química Analítica).

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho

São Luís

2009

Pereira, Aldemir da Guia Schalcher

Estudo analítico e avaliação da atividade larvícida da mistura dos óleos essenciais das folhas da *Pimenta dioica* Lindl e dos galhos de *Aniba duckei* Kostermans frente ao mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) / Aldemir da Guia Schalcher Pereira – São Luís, 2009.

89 f.

Impresso por Computador (Fotocópia)

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Química, 2009.

1. Óleo essencial natural – Análise físico-química 2. *Pimenta dioica* Lindl 3. Eugenol 4. *Aniba duckei* Kostermans 5. Atividade larvícida 6. *Aedes aegypti* I. Título

CDU 543.2: 665.5

**ESTUDO ANALÍTICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DA
MISTURA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DA *Pimenta dioica* Lindl E
DOS GALHOS DE *Aniba duckei* Kostermans FRENTE AO MOQUISTO *Aedes
Aegypti* (LINNAEUS, 1762)**

ALDEMIR DA GUIA SCHALCHER PEREIRA

Aprovada em 15/09/2009

BANCA EXAMINADORA



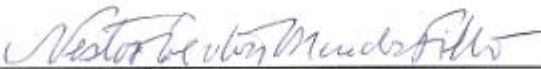
Prof. Dr. Victor Elias Moucherek Filho (Orientador, UFMA)

Doutor em Química Analítica



Prof. Dr. Joelkson Diniz Ribeiro (ICRIM-MA)

Doutor em Química Analítica



Prof. Dr. Nestor Everton Mendes Filho (UFMA)

Doutor em Química Analítica

Dedico este trabalho

A **Deus**, único Ser capaz de nos proteger a todo e qualquer instante, sempre nos dando forças nas horas mais difíceis e me presenteando com os meus Pais, que tanto amo.

A minha querida mãe **Maria Cecília Schalcher Pereira**, (in memoriam) a homenagem da mais profunda gratidão por ter sido a mulher mais forte que já conheci, pelo amor, carinho e dedicação ensinamento de vida. Obrigado mãe por ter feito parte de minha vida e por ter contribuído em realizar mais um sonho.

Ao meu pai, **Manoel da Guia Pereira**, por ser um homem forte e dedicado à família e sempre presente, e pelo exemplo de vida honrada.

À minha amada e admirável esposa, **Flávia Brandão Bessa**, pelo amor e pela verdadeira razão deste trabalho.

A minha irmã **Amélia Júlia Schalcher Pereira** (in memoriam), com os meus mais nobres sentimentos.

Ao meu irmão e colega de curso, **Alvaro Itauna Schalcher Pereira** pela amizade e companheirismo nos momentos mais difíceis e nas grandes alegrias vivenciadas em nossa vida acadêmica.

A minha querida sogra **Telma Fernandes Brandão** “**Nossa Mãe**” pela paciência e importantes contribuições prestadas durante toda a trajetória.

Ao meu sogro **Anibal Vieira da Silva Bessa**, pela amizade e incentivo.

Aos meus irmãos queridos **Alvimar de Jesus**, **Amélia Cecília** e **Amélia da Guia**, que me deram força e apoio nas horas mais difíceis para superar as adversidades ao longo dessa caminhada.

Aos meus sobrinhos, **Adilson Luis**, **Anderson Luis**, **Luis Eduardo**, **Karoline de Jesus** e **André Vitor**, fontes constantes de alegrias.

Agradeço profundamente a todas as pessoas que entraram em minha vida e me ajudaram para a concretização desse sonho. Também expresso minhas gratidões aos meus *preciosos* amigos, **Gilvan Pereira de Figueredo**, **Valdez Diniz Júnior**, **Inaldo dos Santos Pereira Alves**, **Rondineli Seba Salomão**, **Paulo Batalha Gonçalves** e **Waléria Ferreira Rabêlo** pela convivência e amizade que durante anos proporcionaram momentos de alegrias e prazer a toda a trajetória e pelo enorme apoio e contribuições à minha jornada.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar ao todo poderoso **Deus**, que nos dá o dom da vida e concebe maravilhas inexplicáveis.

Aos meus pais, que um dia sonharam comigo e me deram a vida, agradeço de coração por ter me ensinado que vale a pena acreditar e lutar pelos nossos sonhos.

Ao **Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho**, pela orientação deste trabalho, pela amizade, paciência, compreensão e ensinamentos compartilhados durante estes já vários anos de convívio.

Aos **Prof. Dr. Odair dos Santos Monteiro e Prof^a. Dr^a. Adenilde Ribeiro Nascimento**, pela amizade, discussão e colaboração prestada na realização deste trabalho.

Agradeço a minha querida esposa **Flávia Brandão Bessa** pelo amor, pela paciência, pela compreensão, pelo carisma e disponibilidade em poder me ajudar e ter acompanhado todos os meus trabalhos e entre outros de estar sempre ao meu lado dando apoio quando mais precisei durante toda essa jornada para conclusão do mestrado.

Aos amigos dos Laboratórios de Microbiologia e de Bromatologia do Programa de Controle de Qualidade de Alimentos, em especialmente meus amigos **Marlucy Bezerra Oliveira** e aos **Ms. Silvio Carvalho Marinho** e **Ms. Manacés Cunha Sousa** pelos cuidados e atenção dispensada.

Aos amigos do Laboratório de Biodiesel da Universidade Federal do Maranhão, em especial **Angêla, Cássio, Djavana, Kiany, Mauro e Sergiane**, pela paciência, e, acima de tudo, pela amizade.

À **Dierberger Indústria de Óleos Essenciais S.A.**, pelo fornecimento dos padrões utilizados neste trabalho.

Às auxiliares de serviços gerais do Pavilhão Tecnológico, **D. Dica, Ana Sheila e D. Conceição**, pela colaboração prestada.

Aos parceiros da UNICAMP.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que agora, por total incompetência de minha memória, deixei de mencionar.

“Explicar a emoção de ser palmeirense, a um palmeirense, é totalmente desnecessário. E a quem não é palmeirense... é totalmente impossível!”

Joelmir Beting

“Quando achamos que sabemos todas as respostas, vem a vida e muda todas as perguntas.”

Sócrates

RESUMO

Na procura pelo controle químico alternativo contra *Aedes aegypti* L., diversas pesquisas são desenvolvidas e estimuladas no intuito de se descobrirem novas substâncias inseticidas de origem vegetal e neste contexto os óleos essenciais têm se mostrado bastantes promissores. Extraíu-se os óleos essenciais das espécies *Pimenta dioica* Lindl (folhas) e da *Aniba duckei* Kostermans (galhos), pelo método de hidrodestilação, utilizando um sistema Clevenger e promoveu-se sua mistura em partes iguais. Neste trabalho, o efeito larvicida da mistura dos óleos essenciais extraídos das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl e dos galhos de *Aniba duckei* Kostermans foram avaliados frente ao mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1792). Da mistura de óleos essenciais obtida foram realizadas análises das constantes físico-químicas de densidade ($0,904 \text{ g mL}^{-1}$), índice de refração ($N_D 25^\circ = 1,379$), solubilidade em etanol a 70% (1:2), cor (amarela) e aparência (límpido). Os seus componentes foram identificados por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM). Identificou-se e quantificou-se pelo método da normalização os componentes, mircenol (2,36%), limoneno (1,00%), linalol (63,04%), mircenol (1,13%), alilfenol (1,40%) e eugenol (31,07%). A mistura dos óleos essenciais e os padrões de eugenol e linalol foram testados em cinco concentrações: 50, 70, 100, 130 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A CL_{50} da mistura de óleos essenciais e os limites de confiança a 95% de probabilidade foram calculados pelos métodos de Reed-Muench e Pizzi, respectivamente. A atividade larvicida foi verificada baseada na percentagem de larvas mortas; a ação foi avaliada 24h após o tratamento. A mistura de óleos essenciais tiveram atividade larvicida, com CL_{50} de $113,95 (\pm 2,11) \mu\text{g mL}^{-1}$ e os padrões de eugenol $90,86 (\pm 0,03) \mu\text{g mL}^{-1}$ e linalol $305,42 (\pm 0,03) \mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados indicam que a mistura dos óleos essenciais avaliada é composta por substâncias que juntamente com os componentes majoritários eugenol e linalol propiciaram maior efeito larvicida frente ao mosquito *Aedes aegypti* L.

Palavras-Chave: Óleo essencial. *Pimenta dioica*. Eugenol. Linalol. *Aniba duckei* Kostermans. Atividade larvicida. *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

In the search for alternative chemical control against *Aedes aegypti* L., various studies are developed and encouraged in order to find new substances insecticidal plant and in this context essential oils have been shown to be very promising. Extracted from the essential oils of species *Pimenta dioica* (leaves) and *Aniba duckei* Kostermans (stems) by means of hydrodistillation using a Clevenger system and promoted its mixture of equal parts. In this study, the larvicidal effect of the mixture of essential oils extracted from leaves of *Pimenta dioica* species Lindl and branches of *Aniba duckei* Kostermans were evaluated against the mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1792). The blend of essential oils obtained were carried out analysis of constant physical and chemical density (0.904 g mL⁻¹), refractive index (ND 25 = 1.379), solubility in 70% ethanol (1:2), color (yellow) and appearance (clear). Its components were identified by Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS). We identified and quantified by the method of standard components, myrcene (2.36%), limonene (1.00%), linalool (63.04%), myrcenol (1.13%), alilfenol (1, 40%) and eugenol (31.07%). The blend of essential oils and patterns of eugenol and linalool were tested in five concentrations: 20, 50, 70, 90 and 100 µg mL⁻¹. The LC₅₀ of the mixture of essential oils and the limits of confidence at 95% probability were calculated by the methods of Reed-Muench and Pizzi, respectively. The larvicidal activity was observed based on the percentage of dead larvae, the action was assessed 24h after treatment. The blend of essential oils had larvicidal activity with LC₅₀ of 113,95 (±2.11) µg mL⁻¹ and the patterns of eugenol 90,86 (±0,03) µg mL⁻¹ and linalool 305,42 (±0,03) µg mL⁻¹. The results indicate that the mixture of essential oils evaluated, is composed of substances that together with the major components eugenol and linalool provided greater larvicidal effect against the mosquito *Aedes aegypti* L.

Keywords: Essential oil. Leaves. *Pimenta dioica*. Eugenol. Linalol. *Aniba duckei* Kostermans (branches). Larvicidal activity. *Aedes aegypti*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Pimenta dioica</i> Lindl: árvore, frutos e folhas.....	9
Figura 2	Fórmula estrutural do eugenol.....	9
Figura 3	Árvore do <i>Aniba duckei</i> Kostermans.....	13
Figura 4	Tronco do <i>Aniba duckei</i> Kostermans.....	13
Figura 5	Fórmula estrutural plana do linalol.....	15
Figura 6	Mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	18
Figura 7	Distribuição do <i>Aedes aegypti</i> no mundo em 2008 (países ou áreas de risco).....	19
Figura 8	Locais de reprodução dos ovos do <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	21
Figura 9	Ovos do <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	22
Figura 10	Obtenção dos ovos do <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762) e eclosão das larvas.....	23
Figura 11	Larvas do <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	23
Figura 12	Pupa do <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	24
Figura 13	Sorotipos DEN-1, DEN-2, DEN3 e DEN-4 do <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	28
Figura 14	Taxa de Incidência do dengue no Brasil e Regiões entre os anos de 1990 e 2008.....	29
Figura 15	Espectros de absorção no UV-Vis. (A) padrão de eugenol; (B) mistura etanol/água a 60%; (C) mistura de óleos essenciais; (D) padrão de linalol.....	41
Figura 16	Cromatograma da mistura de óleos essenciais.....	42
Figura 17	Espectro de massa do β -mirceno.....	43
Figura 18	Espectros de massas do Limoneno.....	44
Figura 19	Ocorrência da reação de <i>retro</i> -Diels-Alder na fragmentação do limoneno	44
Figura 20	Espectro de massa do Linalol.....	45
Figura 21	Espectro de massa do Mircenol.....	46
Figura 22	Espectro de massa do Aliffenol.....	46
Figura 23	Espectro de massa do Eugenol.....	47

Figura 24	Taxa de Mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> – expostas a cinco concentrações diferentes do óleo essencial de <i>Pimenta dioica</i> Lindl, após 24 horas – versus o logaritmo de cada dose aplicada.....	48
Figura 25	Estimativa da CL_{50} da mistura dos óleos essenciais da <i>Pimenta dioica</i> Lindl e da <i>Aniba duckei</i> Kostermans pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL_{50} é o ponto de intersecção das duas curvas.....	49
Figura 26	Taxa de Mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> expostas a cinco concentrações diferentes do padrão de linalol, após 24 horas.....	51
Figura 27	Estimativa da CL_{50} do padrão de linalol pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL_{50} é o ponto de intersecção das duas curvas.....	52
Figura 28	Taxa de Mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> expostas a cinco concentrações diferentes do padrão de eugenol, após 24 horas.....	54
Figura 29	Estimativa da CL_{50} do padrão de eugenol pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL_{50} é o ponto de intersecção das duas curvas.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros físico-químicos das espécies <i>Pimenta dioica</i> Lindl e <i>Aniba duckei</i> Kostermans comparadas com a mistura de óleos essenciais.....	40
Tabela 2	Composição química da mistura de óleos essenciais.....	43
Tabela 3	Mortalidade das larvas do <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição em várias concentrações da mistura dos óleos essenciais extraído das folhas da espécie <i>Pimenta dioica</i> Lindl e galhos <i>Aniba duckei</i> Kostermans.....	47
Tabela 4	Mortalidade das larvas do <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição em várias concentrações do padrão de linalol.....	50
Tabela 5	Mortalidade das larvas do <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição em várias concentrações do padrão de eugenol.....	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CG	Cromatografia Gasosa
CG – EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CL ₅₀	Concentração Letal a 50%
EM	Espectrometria de Massas
SNC	Sistema Nervoso Central
LPQA	Laboratório de Pesquisa em Química Analítica
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
UV	Ultravioleta
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Performance
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
HUFSCar	Herbário da Universidade Federal de São Carlos
IAC	Instituto Agrônomo de Campinas
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry

SUMÁRIO

	p.
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	viii
Capítulo 1	
INTRODUÇÃO.....	1
Capítulo 2	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Considerações sobre óleos essenciais.....	3
2.2 <i>Pimenta dioica</i> Lindl (Pimenta da Jamaica).....	8
2.3 <i>Aniba duckei</i> Kostermans (Pau Rosa).....	12
2.4 Técnicas analíticas.....	16
2.5 Métodos de quantificação.....	17
2.6 Aspectos sobre o mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	17
2.6.1 O ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	21
2.6.2 O Dengue.....	25
Capítulo 3	
OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
Capítulo 4	
PARTE EXPERIMENTAL.....	32
4.1 Origem, coleta e preparo da amostra vegetal.....	32
4.2 Moagem do material vegetal.....	33
4.3 Extração do óleo essencial.....	33
4.4 Características físico-químicos do óleo essencial.....	34
4.4.1 Densidade.....	34
4.4.2 Solubilidade em etanol (70%).....	34
4.4.3 Índice de refração.....	34
4.4.4 Cor.....	34

4.4.5	Aparência.....	35
4.5	Análises químicas da mistura de óleos essenciais.....	35
4.5.1	Análise por espectrofotometria no UV-Vis.....	35
4.5.2	Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas.....	35
4.6	Padrões de eugenol e linalol.....	35
4.7	Obtenção e cultivo das larvas.....	36
4.8	Teste de toxicidade.....	37
4.9	Análise estatística.....	37
	Capítulo 5	
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1	Características físicas da mistura dos óleos essenciais.....	39
5.2	Caracterização química.....	40
5.2.1	Análises espectrofotométricos da mistura de óleos essenciais na região do ultravioleta – visível.....	40
5.2.2	Análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas....	42
5.3	Atividade larvicida da mistura dos óleos essenciais.....	47
	Capítulo 6	
	CONCLUSÃO.....	57
	Capítulo 7	
	PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	58
	Capítulo 8	
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
	APÊNDICE.....	68

Capítulo 1

Introdução

O *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é atualmente o mosquito que apresenta maior dispersão em áreas urbanas do planeta. Ele é um dos agentes (juntamente com *Aedes albopictus*) transmissores do dengue, doença considerada pela Organização Mundial de Saúde como um dos principais problemas de saúde pública no mundo (com grande incidência nas regiões tropicais do globo) (WHO, 2009).

Trata-se de uma espécie de grande importância para a medicina, pois, é o vetor de quatro sorotipos do flavivírus causador do dengue clássico e da febre hemorrágica do dengue. Portanto, é urgente que o controle da densidade populacional do *Aedes aegypti* ocorra para que o dengue não assuma proporções de uma epidemia, pois não existe vacina para a doença, e a melhor forma de combatê-la é atacar o vetor, principalmente eliminando os locais onde ocorre a oviposição e o desenvolvimento das larvas (BRASIL, 2009a).

Atualmente o controle é feito por meio de aplicações de inseticidas organofosforados (GUALTIERE *et al.*, 1997). Porém, o uso frequente e em doses cada vez maiores desses produtos, têm selecionado populações resistentes do mosquito (CARVALHO e SILVA, 2000).

Com o surgimento de formas resistentes do mosquito aos inseticidas convencionais utilizados, tem crescido a busca por extratos vegetais e substâncias naturais que sejam efetivas no combate ao mosquito adulto e/ou à larva de *Aedes aegypti* e que sejam isentas de toxicidade para o ambiente.

Nesse contexto a procura por compostos larvicidas advindos de espécies vegetais, como os óleos essenciais extraídos de certas plantas, tem se intensificado.

Esses óleos de plantas, chamados “óleos essenciais”, são misturas químicas complexas, formadas às vezes por mais de cem componentes, responsáveis, entre outras coisas, pelo seu aroma. Diferentes partes das plantas têm sido usadas para obtenção do óleo essencial: flores, folhas, sementes, raízes, frutos, cascas, rizomas e tubérculos (ARIDOGAN *et al.*, 2002).

Uma das espécies vegetais utilizada neste trabalho, a *Pimenta dioica* Lindl é conhecida da comunidade científica e alguns estudos realizados com os óleos essenciais extraídos (tanto das folhas quanto dos frutos) têm mostrado resultados interessantes. A exemplo cita-se o seu efeito analgésico, antipirético e antibacteriano, bem como o eugenol seu constituinte majoritário. (LOPEZ *et al.*, 1998).

Contudo, não há relatos na literatura científica quanto ao uso do óleo essencial dessa espécie como agente larvicida, apesar de alguns estudos similares indicarem compostos de origem botânica com esse tipo de atividade e potencial para uso no controle de vetores (GONZAGA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2004; POHLIT *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2002).

Significativamente para o Brasil, pesquisas nesta área têm grande significado. No País o dengue causa morte de várias pessoas todos os anos ou a incapacidade de trabalho por um período de aproximadamente 10 dias devido aos sintomas geralmente severos. Isto representa uma perda de milhões de reais tanto no investimento para erradicação da doença no Brasil, como na contagem dos dias de trabalho parado (SILVA, 2006).

Tendo em vista os prejuízos causados pelo dengue no País, torna-se de suma importância a descoberta de novos métodos de combate ao seu vetor. Dessa forma, pelo fato de muitas plantas, por natureza, serem tóxicas para mosquitos, os óleos essenciais podem representar uma saída eficiente para esse problema.

Nesse contexto procurou-se avaliar a atividade larvicida do óleo essencial extraído de uma planta da flora brasileira frente ao mosquito *Aedes aegypti*.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1 Considerações sobre Óleos Essenciais

De acordo com MOUCHREK FILHO (2000), o termo “óleo essencial”¹ é empregado para designar líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte – quase sempre agradável, extraídos de plantas por algum processo específico, sendo o mais freqüente a destilação por arraste de vapor d’água².

A International Organization for Standardization – ISO, define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d’água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (Rutaceae). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos voláteis³, óleos etéreos ou essências. Tais denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas, como, por exemplo, a de possuírem aparência oleosa e aroma agradável, serem líquidos voláteis e solúveis em solventes apolares (como o éter). Em água, eles apresentam solubilidade limitada, mas o suficiente para aromatizar suas soluções aquosas, que, nesse caso, são denominadas hidrolatos (TELES, 2003).

¹ Segundo BURT (2004) esse termo é derivado do nome inventado no século XVI pelo suíço Paracelsus von Hohenheim; foi esse cientista quem nomeou o componente efetivo da droga *Quinta essentia*.

² Para extração industrial, segundo Simões e Spitzer (2003), o método utilizado é a extração por CO₂ supercrítico, no qual nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando o óleo mais puro que aqueles obtidos por outros métodos.

³ Sua principal característica, de acordo com SIMÕES *et al.* (1999), é a volatilidade, diferenciando-se assim, dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes.

É interessante destacar que os óleos essenciais diferem-se quimicamente dos óleos vegetais e dos minerais. Os primeiros são misturas de terpenos e oxigenados, juntos com outros tipos de compostos orgânicos. Os óleos vegetais são ésteres da glicerina com ácidos graxos de longas cadeias. Os últimos óleos citados são parafinas líquidas misturadas a outros hidrocarbonetos de peso molecular elevado.

Simões e Spitzer (2003) afirmam que além dos óleos obtidos de plantas (fitogênicos), produtos sintéticos são encontrados no mercado. Esses óleos sintéticos podem ser imitações dos óleos naturais ou composições de fantasia. A identificação dessa natureza se torna importante na indústria farmacêutica pelo fato de somente os óleos de origem natural serem permitidos pelas farmacopéias (exceções são aqueles óleos que contêm somente uma substância como é o caso do óleo essencial de baunilha, que possui a vanilina).

A constituição química dos óleos essenciais é muito complexa chegando alguns a centenas de compostos com funções orgânicas diferentes. A esse respeito SIMÕES e SPITZER (2003) esclarecem que os constituintes dos óleos variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos contendo enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços).

Os referidos autores explanam que embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleo essencial, sua composição pode variar segundo a localização na planta. Dessa maneira, óleos essenciais obtidos de diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar composição química, características físico-químicas e odores bem distintos.

Cabe ressaltar que a composição química de um óleo essencial extraído de uma mesma espécie vegetal pode variar significativamente, de acordo com, por exemplo, a época de coleta, condições climáticas, tipo de solo, quimiotipos⁴ e ciclo vegetativo. (SIMÕES e SPITZER, 2003)

Quanto aos métodos de extração dos óleos essenciais eles variam de acordo com a região da planta em que ele se encontra, bem como com a proposta de utilização dos mesmos. Os mais comuns são⁵: enfloração (enfleurage) arraste por vapor d'água, extração com solventes orgânicos, prensagem (ou expressão) e extração por CO₂ supercrítico (MOUCHREK FILHO, 2000).

Em relação à importância econômica dessas substâncias, segundo TELES (2003) os óleos essenciais são largamente utilizados em muitas indústrias para conferir aromas especiais em inúmeros produtos, tais como perfumes, cosméticos, sabonetes, condimentos etc. Eles são empregados também para mascarar odores desagradáveis em ambientes de trabalho e instalações sanitárias, além de serem usados como insumos em diversos produtos em indústrias de plásticos, tintas, borrachas, inseticidas, entre outras.

TELES (2003) ainda relata sobre os problemas relativos à qualidade de óleos essenciais e esclarece que eles podem ter origem na variabilidade da sua composição química, na adulteração ou falsificação ou, ainda, na identificação incorreta do produto e sua origem. Geralmente, os produtores de grande parte dos óleos essenciais comercializados não apresentam nem a identificação correta da planta da qual o produto foi obtido (incluindo o nome científico) e, tampouco, a procedência da amostra vegetal.

⁴ Vegetais botanicamente idênticos, mas que diferem quimicamente.

⁵BURT (2004) relata que o primeiro autêntico escrito acerca da obtenção de óleo essencial foi por destilação e atribuído ao físico catalão Villanova (que viveu cerca de 1235-1311).

Dessa forma, a adulteração de óleos essenciais que já é conhecida desde a Antiguidade, torna-se evidente até o presente século, devido, principalmente, à grande variedade de estratégias sofisticadas de falsificações, sendo cada vez mais difícil detectá-las.

Sendo assim, de acordo com CHAAR (2000), foram desenvolvidos diversos métodos no intuito de avaliar a qualidade, não somente de matérias-primas que contêm óleos essenciais, como também dos próprios óleos. Dentre os métodos estão os organolépticos, o controle de pureza, a análise qualitativa dos componentes, a análise do teor de óleo volátil em drogas vegetais e os métodos cromatográficos.

A análise química de separação e identificação dos constituintes dos óleos é feita por meio de técnicas cromatográficas – Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), e por técnicas espectrométricas – dentre as quais as mais freqüentes são a Espectroscopia de Ultravioleta (UV), Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN ^1H e ^{13}C) e Espectrometria de Massas (EM). O uso de bibliotecas e bancos de dados informatizados, contendo informações existentes na literatura a respeito de um grande número de substâncias já conhecidas é amplamente utilizado (TELES, 2003; MOUCHREK FILHO, 2001).

Sobre a utilização dos óleos essenciais como agentes medicinais, ela vem ganhando destaque desde o final do século XX, estando em voga em termos científicos. Entretanto, SIANI *et al.* (2000) ponderam que essa importância é fato conhecido desde a Antiguidade, quando diversos povos, incluindo gregos, egípcios e romanos, praticavam cultos religiosos associados à cura de males e à busca de bem estar físico, através dos aromas obtidos de partes específicas de certos vegetais.

De acordo com MONTEIRO (2008) a maior parte dos trabalhos sobre atividades biológicas atribuídas aos óleos essenciais, descritos na literatura especializada, versam sobre sua ação antimicrobiana (bactericida e antifúngica, sobretudo). SIANI *et al.* (2000) relatam que essa capacidade, de certa maneira, representa uma extensão do próprio papel que os óleos exercem nas plantas, defendendo-as de bactérias e fungos fitopatogênicos.

Por outro lado, alguns estudos apontam compostos de origem botânica com atividade larvicida e potencial uso no controle de vetores (GONZAGA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2004; POHLIT *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2005; PIZARRO *et al.*, 1999).

Como o *Aedes aegypti* é um mosquito com características domiciliar e peridomiciliar, o uso de agentes tóxicos aéreos para o controle do mosquito nem sempre é eficiente, uma vez que a maioria dos mosquitos adultos esconde-se no interior das casas. A única maneira de se reduzir a densidade dos mosquitos a um nível onde as epidemias do dengue não ocorram é atacando os locais de reprodução (GLUBER, 1989).

O controle ideal é feito com o uso de larvicidas nestes locais de reprodução. Normalmente são usados inseticidas e larvicidas organofosforados. O uso de produtos naturais é uma alternativa para o controle químico convencional. Em termos, várias plantas têm mostrado atividade pesticida, como um mecanismo de defesa contra predação ou infecção (GONZAGA *et al.*, 2008; SILVA, 2006).

2.2 *Pimenta dioica* Lindl (Pimenta da Jamaica)

A escolha da espécie *Pimenta dioica* Lindl deveu-se pelo fato de que não foi encontrada na literatura científica referência sobre a atividade larvicida do óleo extraído das folhas desta espécie (e nem dos frutos), motivo pelo qual resolvemos testá-lo.

A espécie vegetal *Pimenta dioica* Lindl, conhecida popularmente como pimenta da Jamaica⁶ (ou allspice), pertence à família Mirtaceae que compreende cerca de 140 gêneros e 3.000 espécies, distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e Austrália temperada (SOUSA, 2003).

CORRÊA (1984) diz que a planta (Figura 1) é originária da Índia e América Central e que se trata de uma árvore que pode atingir 10 metros de altura, fortemente aromática em todas as suas partes, com numerosas folhas pecioladas, elíptico-alongadas, flores numerosas, fruto baga, globoso, piriforme, contendo duas sementes, raras vezes uma.

DUKE (2002) relata que esta espécie vegetal tem larga aplicação medicinal em vários países, sobretudo da América Central. Na Jamaica os frutos são utilizados no tratamento de resfriados, hemorragias e estomatites. Na Costa Rica, as folhas são usadas como carminativas e estomáquicas, além de serem excelentes para diabetes. Na Guatemala aplica-se externamente em escoriações e dores reumáticas. Em Cuba é utilizada como bebida refrescante, chá depurativo e estimulante tônico. Nesse país o óleo essencial do fruto é usado ainda no tratamento de diarreia, dispepsia e flatulência.

⁶ GUENTHER (1950) explana que na Jamaica, a árvore não é plantada, ela é cultivada de forma espontânea por pássaros e morcegos que apreciam seu fruto e por isso, em vôo, deixam cair as sementes que vão formar a vegetação. Estas novas plantas desenvolvem-se sobre extensas áreas, formando florestas inteiras com, inclusive, árvores de pimenta em algumas regiões montanhosas.



Figura 1. *Pimenta dioica* Lindl: árvore, frutos e folhas.
Fonte: UCLA (2009); Mouchrek Filho (2000).

De acordo com GUENTHER (1950) existem dois tipos de óleo de *Pimenta dioica* Lindl no mercado: o óleo destilado dos frutos, com fino odor e sabor, característico de pimenta e o óleo obtido das folhas.

O referido autor relata que o fruto seco contém 2 a 5% de óleo essencial e a quantidade do óleo no fruto depende do período de colheita. O pó contém eugenol (65 a 85%, componente majoritário – Figura 2), éter metil eugenol, cariofileno, felandreno, cineol, ácido palmítico, óleos fixos, resinas, açúcares, amido, ácido málico, oxalato de cálcio e taninos.

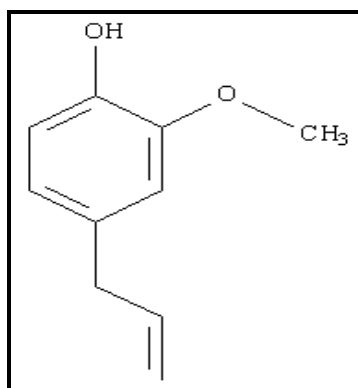


Figura 2. Fórmula estrutural do eugenol.

Estudos fitoquímicos de suas folhas não detectaram a presença de alcalóides e sim de compostos tanínicos e grande quantidade de óleo essencial (MOUCHREK FILHO, 2000).

A respeito do eugenol é importante frisar que por ser ele o componente majoritário do óleo da *Pimenta dioica* Lindl (tanto de folhas como de frutos) é o responsável principal por muitas de suas atividades – sobretudo antimicrobianas e antioxidantes (COSTA SOBRINHO, 2008).

O eugenol apresenta fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$ e massa molecular 164 (sua nomenclatura IUPAC é 4-alil-2-metoxifenol).

A literatura descreve que esse constituinte da *Pimenta dioica* Lindl é muito utilizado como agente antimicrobiano (COSTA SOBRINHO, 2008; MARINHO, 2005; NACIMENTO, 2004; MONTEIRO, 2004; VÁZQUEZ *et al.*, 2001), atrativo de insetos (MONTEIRO, 2008; SOUSA, 2003; REBÊLO, 2001), preparo de compósitos dentais e de cimentos ortopédicos de ossos (ROJO *et al.*, 2006), anti-séptico, antiinflamatório (KOBAYSAHI, 1997), antiespasmódico (MYINTE *et al.*, 1996), antialérgico (KIM, 1996), na composição de cosméticos (TOURIYA *et al.*, 1995), antioxidante (COSTA, 1994), no tratamento da AIDS (KAEMPGEN, 1990) e como flavorizante (CRAVEIRO *et al.*, 1981).

Existem outros trabalhos versando sobre a importante atividade biológica do eugenol, que isoladamente já se descobriu ser bastante efetiva. Contudo ainda são poucos os trabalhos publicados a respeito do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl. A maioria, contudo converge para algumas conclusões comuns, a mais importante é de que é o eugenol o componente majoritário e principal responsável por muitas de suas propriedades anti-sépticas sobre vários microrganismos, corroborando esta afirmação seguem algumas pesquisas com esse enfoque.

RODRÍGUEZ *et al.* (1997) avaliaram a atividade biológica de um creme do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl como repelente de insetos em tropas do exército cubano. Encontraram significativa diferença entre o grupo testado com o creme e outro com um creme placebo. Para o creme com o óleo essencial eles encontraram 100% de repelência por um tempo maior quando comparado com outros repelentes não naturais encontrados no mercado. Devido aos excelentes resultados os autores sugeriram que o creme da *Pimenta dioica* Lindl pode ser empregado profilaticamente para evitar enfermidades transmitidas por mosquito, como o dengue hemorrágico, por exemplo. Neste mesmo trabalho eles comentam que outros investigadores encontraram atividade do óleo da pimenta sobre fungos e leveduras.

LOPEZ *et al.* (1998) estudaram o extrato da *Pimenta dioica* Lindl e comprovaram seus efeitos analgésico e antipirético em ratos e coelhos de laboratório. A toxicidade aguda oral também foi testada usando os mesmos seres vivos. Para os autores o eugenol encontrado em grandes quantidades nas folhas da planta, que atua inibindo a liberação de prostaglandinas, pode ser o maior responsável por estas atividades, além disso, o ensaio toxicológico permitiu classificar o extrato como não tóxico.

Na Universidade Federal do Maranhão (UFMA) há um grupo de pesquisa em *Pimenta dioica* Lindl. Monografias, dissertações de mestrado e teses de doutorado já foram elaboradas, e ainda estão sendo realizadas, pesquisando a composição do óleo essencial e de sua atividade sobre microrganismos (MARINHO, 2005; NASCIMENTO, 2004; MONTEIRO, 2004; SOUSA, 2003⁷). Atualmente até a ação como aditivo em combustíveis está sendo pesquisa por mestrando e graduandos dessa Instituição, reafirmando o interesse desse grupo pelas muitas propriedades úteis já descobertas e ainda as que estão por serem descobertas.

⁷Em todos esses trabalhos utilizaram-se frutos. Apesar de ter menor concentração de eugenol, o óleo das folhas apresenta um melhor rendimento na extração e está disponível o ano inteiro, o que não acontece com os frutos disponíveis apenas na época da frutificação.

2.3 *Aniba duckei* **Kostermans (Pau Rosa)**

A família Lauraceae é considerada uma das mais primitivas pertencentes à divisão Manoliophyta. Tal fato se deve às suas características morfológicas e anatômicas que as aproximam de outras famílias como Calycanthaceae, Idiospermaceae e Hernandiaceae (CRONQUIST, 1988). As Lauraceae apresentam-se amplamente distribuída através das regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo formadas por 49 gêneros e espécies variando entre 2500 a 3000, (WERFF, H, 1996).

Os primeiros registros relativos à utilização das espécies desta família datam de 2.800 a.C, sendo originários da Grécia antiga. Isso influenciou o nome de muitos gêneros que fazem uma alusão àquela época. *Laurus* L., por exemplo, vem do celta “lauer” que significa verde ou ainda “laus” que significa louvor e o gênero *Phoebe*, tem o seu nome relacionado ao deus Apolo. Outras espécies utilizadas desde a Grécia antiga são as pertencentes ao gênero *Cinnamomum* Schaeffer, que significa “caneleira” em grego (BARROSO, G. M, COE-TEIXEIRA, B, 1980).

As Lauraceae destacam-se entre as demais famílias pela sua importância econômica. Algumas espécies têm sido utilizadas pelas indústrias para a fabricação de diversos produtos, porém, a maioria das espécies tem seu uso restrito às comunidades tradicionais que detêm o conhecimento empírico da utilização dessas plantas (MARQUES, C. A, 2001).

Sua árvore (Figura 3) pode atingir até 30 metros de altura e seu tronco diâmetro de um metro (Figura 4). Tem casca pardo-avermelhada (daí o nome pau rosa), folhas semicoriáceas, lisas e inflorescência em panículas multifloras delicadas. As flores são ferrugíneas e o fruto é uma drupa, de 2 a 3 centímetros de comprimento, com cúpula bastante espessa. O tipo de vegetação onde ocorre é de floresta tropical úmida e terra firme. Possui reprodução anual, porém bastante irregular, apresentando crescimento lento e madeira de alta densidade com reconhecido valor comercial (BIOSAPIENS, 2004).



Figura 3. Árvore do *Aniba duckei* Kostermans
Fonte: WIKIMEDIA, 2008.



Figura 4. Tronco do *Aniba duckei* Kostermans
Fonte: WIKIMEDIA, 2008.

Dessa forma, Kalil Filho (2000) destaca que pesquisadores brasileiros estão analisando formas de produção do óleo que não comprometam o ambiente e ao mesmo tempo garantam a qualidade dos produtos, inclusive produzindo o óleo a partir de folhas e galhos finos, não sendo necessário, portanto, o corte das árvores.

A ameaça de extinção dessa espécie conduziu a controles crescentes regulamentados e vigiados por órgãos governamentais no Brasil, conscientizando, orientando tecnicamente na extração do óleo utilizando galhos e folhas ao invés de sacrificar a árvore, estudos com outras plantas com teor de linalol, reflorescimento desenvolvendo o cultivo como uns dos meios de alcançar produção de óleo sustentável (CRAVEIRO, A.A, 1981).

No Brasil, ocorre ao oeste do Amapá, ao longo de ambos os lados do Rio Amazonas, tendo grandes concentrações em Curuá-Uma (perto de Santarém) para a fronteira peruana, ao sul e do rio Trombetas para a Colômbia, ao norte. Também é encontrado ao redor de Belém e na Ilha de Marajó (SUDAM, 1972).

O *Aniba duckei* Kostermans apresenta diferenças morfológicas e na composição do óleo essencial em relação à espécie nativa da Guiana Francesa, *Aniba roseaodora* ducke. É sabido que a característica da árvore do *Aniba duckei* Kostermans é de grande porte, podendo atingir trinta metros de altura e o tronco é a parte usada para a extração do óleo essencial por possuir componente principal fonte natural do óleo tão rico no monoterpeno linalol (KALIL FILHO, 2000).

O óleo essencial dessa espécie, segundo Chaar (2000), caracteriza-se por seu forte odor, incoloração, densidade inferior à da água, solubilidade em solventes orgânicos usuais e álcool 70°GL. De grande valor no mercado internacional (devido seu uso como fixador em perfumes como, por exemplo, o famoso Chanel número 5), é em grande parte o linalol (Figura 5), composto normalmente encontrado sob a forma de uma mistura de isômeros de posição da primeira dupla ligação e opticamente ativo (CAMPOS, 2003).

Os compostos terpênicos mais freqüentes nos óleos essenciais são os monoterpenos (aproximadamente 90% dos óleos essenciais) ele se divide em três sob grupos monocíclicos, bicíclicos e acíclicos o “qual faz parte do linalol”.

De grande valor no mercado internacional (devido seu uso como fixador em perfumes como, por exemplo, o famoso Chanel número 5), é em grande parte o linalol ($C_{10}H_{18}O$, massa molecular 154 g/mol), composto normalmente encontrado sob a forma de uma mistura de isômeros de posição da primeira dupla ligação e opticamente ativo (KALIL FILHO, 2000).

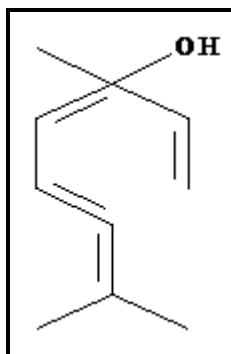


Figura 5. Fórmula estrutural plana do linalol

No que diz respeito a testes de atividade antibacteriana, Hammer *et al.* (1999) analisaram 52 óleos essenciais, dentre os quais o pau rosa, frente a dez diferentes bactérias, incluindo *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumoniae*. Os autores apontaram que o poder de inibição do óleo desta planta conforme todos os microrganismos testados foi eficiente, sobretudo, para esses dois gêneros.

Santos (2004), em seu estudo acerca do pau rosa, descreve que o óleo essencial da espécie apresentou excelente ação antibacteriana frente *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp.* Entretanto, a referida autora verificou que esse mesmo óleo quando testado frente *Pseudomonas aeruginosa* não proporcionou atividade, o que pode ser atribuído ao fato dessa bactéria ser mais resistente. Ademais, o acetato de linalila não apresentou nenhuma inibição frente essas bactérias.

Chaar e Albuquerque (2004) estão a demonstrar a atividade larvicida deste óleo no combate à larva do mosquito da dengue, *Aedes aegypti*. Em seu estudo os autores verificaram que o hidrolato de pau rosa pode ser o responsável e apontam o linalol como principal causador desse tipo de atividade.

Nascimento (2004) demonstrou que o óleo de pau rosa apresentou grande atividade antibacteriana, principalmente frente às bactérias *Salmonella sp.* e *Staphylococcus coagulase* positiva, mostrando dessa forma que esse óleo pode ser utilizado para esse propósito.

2.4 Técnicas analíticas

A avaliação quantitativa e qualitativa envolve a utilização de diversas técnicas básicas, que sofreram algumas alterações nos últimos anos, devidas essencialmente à revolução da informática (programa de computadores, níveis de automação, forma de integração dos dados obtidos) e da sofisticação dos experimentos que podem ser realizados, resultando na dedução de uma estrutura coerente. Dentre estas podemos citar: a Cromatografia Gasosa, Espectroscopia Eletrônica de Ultravioleta (UV), Espectroscopia Vibracional de Infravermelho (IV) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), (CHAAR, J da S, 2000, MOUCHREK FILHO, V. E, 2000).

Durante o desenvolvimento da química várias técnicas analíticas foram desenvolvidas, desempenhando importantíssimo papel na análise das mais variadas matrizes. Na análise de óleos essenciais estas técnicas auxiliam na verificação de sua qualidade, quantificação de componentes majoritários ou não, e até na separação destes componentes para sua utilização individual.

Com o desenvolvimento tecnológico estas técnicas foram se aperfeiçoando cada vez mais, chegando hoje em dia, a equipamentos acoplados a computadores que conseguem sensibilidades no nível de ppm (parte por milhão) para os mais variados fins. A avaliação quantitativa e qualitativa dos óleos essenciais envolve a utilização de diversas técnicas básicas, que passam desde a dedução de uma estrutura coerente para um dado composto de interesse, até sua quantificação. Dentre as mais utilizadas podemos citar: a Cromatografia Gasosa (CG), (FALKENBERG et al., 1999), Espectroscopia Eletrônica de Ultravioleta (UV), (SILVERSTEIN et al., 2007), Espectroscopia Vibracional de Infravermelho (IV) (CRACKER; SIMON, 1987) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), (ADAMS, 2007).

2.5 Métodos de quantificação

Na análise quantitativa são necessárias precauções em todas as etapas para minimizar ou evitar erros. A alíquota a ser analisada deve ser representativa da amostra. Em cromatografia, a etapa de separação dos componentes da amostra no cromatógrafo pode acarretar erros como: adsorção irreversível de parte da amostra na fase estacionária ou suporte, resposta do detector afetada por alterações de temperatura e vazão de gás, quantidade de amostra injetada fora da faixa linear do detector etc. (RODRIGUEZ, 1996).

A concentração de uma substância na amostra pode ser determinada por um dos seguintes métodos: método do padrão externo, método da adição padrão, método do padrão interno e método da normalização. No presente trabalho, utilizou-se o método da normalização. Neste método, faz-se a integração eletrônica das áreas dos picos cromatográficos utilizando um software do equipamento CG-EM (Varian 2100). A normalização é muito usada em técnicas analíticas, principalmente em amostras complexas, como é o caso dos óleos essenciais e, também, quando a concentração do analito é muito baixa e existem efeitos de diluição em matrizes (PINO; ROSADO; GONZALEZ, 1989).

2.6 Aspectos sobre o mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus 1792) (Diptera: Culicidae) (Figura 6) é o principal responsável pela transmissão da febre amarela urbana e do dengue em todo o mundo. É doméstico e antropofílico, com atividade hematofágica diurna e utiliza-se preferencialmente de depósitos artificiais de água limpa para colocar seus ovos (CDC, 2009; TAUIL, 2001).

Embora oriundo do Velho Mundo, esse mosquito acompanhou o homem em sua longa e ininterrupta migração pelo globo, e permaneceu onde as alterações antrópicas propiciaram a sua proliferação. Hoje, o *Aedes aegypti* é considerado um mosquito cosmopolita, com ocorrência em regiões tropicais e subtropicais (CDC, 2009; CONSOLI e OLIVEIRA, 1994).



Figura 6. Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).

Fonte: INFO-E (2009)

A ocorrência do *Aedes aegypti* L. se dá principalmente nas regiões tropicais. Dados de novembro de 2008 indicavam as áreas de maior risco (em amarelo no mapa da Figura 7): América Central, América do Sul (exceto Chile, Uruguai e sul da Argentina), América do Norte (México), África, Austrália (norte), Caribe (exceto Ilhas Cayman), China (sul), Ilhas do Pacífico, Índia, Sudeste Asiático e Taiwan⁸ (CDC, 2009). Nos Estados Unidos a ocorrência de dengue é incomum, mas em 1995 foram registrados casos de transmissão no Texas. O mosquito *Aedes aegypti* está distribuído na maior parte do Brasil e a região Nordeste está mais suscetível a ocorrência de epidemias do dengue.

⁸ O contorno das linhas das isotermas de janeiro e julho indicam os limites geográficos potenciais dos Hemisférios Norte e Sul do planeta para sobrevivência do *Aedes aegypti* ao longo do ano (WHO, 2009).



Figura 7. Distribuição do *Aedes aegypti* no mundo em 2008 (países ou áreas de risco).
Fonte: WHO (2009).

O mosquito *Aedes aegypti* L., encontrou no mundo moderno condições muito favoráveis para uma rápida expansão, pela urbanização acelerada que criou cidades com deficiências de abastecimento de água e de limpeza urbana; pela intensa utilização de materiais não-biodegradáveis, como recipientes descartáveis de plástico e vidro; e pelas mudanças climáticas. Com essas condições, espalhou-se por uma área onde vivem cerca de 3,5 bilhões de pessoas em todo o mundo (FUNASA, 2002).

No Brasil o mosquito está restrito às vilas e cidades, sempre ligado ao peridomicílio e ao domicílio humano. Nas cidades brasileiras é encontrado nos locais de maior concentração humana e raramente em ambientes semi-silvestres ou onde a população humana é mais escassa (NEVES, 2000).

Os resultados obtidos no Brasil e o próprio panorama internacional, onde inexistem evidências da viabilidade de uma política de erradicação do vetor, em curto prazo, levaram o Ministério da Saúde a fazer uma nova avaliação dos avanços e das limitações, com o objetivo de estabelecer um novo programa que incorporasse elementos como a mobilização social e a participação comunitária, indispensáveis para responder de forma adequada a um vetor altamente domiciliado (FUNASA, 2002).

Atualmente, muitas pesquisas sobre a atividade larvica de óleos essenciais têm sido publicadas, porém, quase nenhum discute a relação entre essa atividade e a composição química dos óleos essenciais (SILVA, 2006).

Em trabalho recente TELES (2009) testou a atividade do óleo essencial de *Aniba duckei* Kostermans (pau rosa) e ao investigar a CL_{50} o óleo essencial apresentou CL_{50} de 250,61 ($\pm 2,20$) $\mu\text{g mL}^{-1}$ (sem atividade larvica conforme descrito por CHENG et al., 2003).

CHENG et al. (2009) investigaram a composição química e a atividade larvica do óleo essencial extraído das folhas de duas espécies de eucalipto contra as espécies de mosquito *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Os resultados foram satisfatórios: os valores para as CL_{50} foram de 31,0 e 55,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra as larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus*, respectivamente.

PORTO et al. (2008) estudando o óleo extraído das folhas de *Anacardium humile* frente larvas de *Aedes aegypti* apontaram CL_{50} de 20,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ demonstrando atividade larvica.

RODRIGUES et al. (2007) promoveram o estudo químico e avaliação da atividade larvica sobre *Aedes aegypti* de óleos essenciais (folhas e talos) de *Stemodia maritima* L. (conhecida popularmente por “melosa”) e encontraram CL_{50} de 22,93 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo dos talos.

FURTADO et al. (2005) ao analisarem amostras de dez tipos de óleos essenciais contra o mosquito verificaram que o óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* Baker induziu a maior atividade larvica, com CL_{50} de 15,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto o de *Ocimum gratissimum* L. apresentou a menor atividade com CL_{50} de 95,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A partir do exposto, verifica-se que a procura por larvicidas naturais para o *Aedes aegypti*, tem motivado pesquisadores do mundo inteiro a realizar diversos trabalhos e, portanto, este trabalho é uma contribuição nesse sentido (os produtos naturais com esta finalidade diminuem o impacto que atualmente os inseticidas sintéticos causam à saúde da população e ao ambiente).

O uso freqüente e em doses cada vez maiores desses produtos, a exemplo do temefós, têm selecionado populações resistentes do mosquito. Reafirma-se que diversas pesquisas são desenvolvidas no sentido de encontrar substância de origem vegetal, como alternativa para o controle do dengue. Os óleos essenciais, produzidos no metabolismo secundário das plantas, têm apresentado atividades inseticidas, larvicidas, fumigantes, deterrentes e outras (SILVA, 2006).

Partindo do princípio de que o óleo essencial é um produto natural e, portanto, menos nocivo à saúde das pessoas e dos animais domésticos, pode se afirmar que o óleo essencial da espécie estudada poderá ser futuramente usado como larvicida em possíveis locais de crescimento de larvas do *Aedes aegypti*.

2.6.1 O ciclo de vida do *Aedes aegypti*

O conhecimento do ciclo de vida do mosquito contribui para melhoria das formas de combate a esse vetor. O *Aedes aegypti* é uma espécie doméstica, que se reproduz, preferencialmente, em água parada e limpa, acumulada em recipientes fabricados pelo homem, como latas, pneus, vasos etc., (Figura 8) dentro ou perto das habitações. Seu ciclo de vida compreende quatro estágios: OVO – LARVA – PUPA – ADULTO (SILVA 2006).



Figura 8. Locais de reprodução dos ovos do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).
Fonte: FIOCRUZ (2009)

a) O ovo

O ovo do *Aedes aegypti* (Figura 9), mede aproximadamente 1mm de comprimento, com contorno alongado e fusiforme e é depositado individualmente, nas paredes dos depósitos que servem como criadouros, próximos à lâmina da água; no momento da postura os ovos são brancos, mas nas primeiras 24 horas adquirem a cor negra; a formação do embrião se completa em 48 horas; são capazes de resistir a longos períodos de dessecação (SILVA 2006).



Figura 9. Ovos do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).
Fonte: FIOCRUZ (2009).

De acordo com dados da FUNASA (2002), ovos com até 450 dias, sofrem eclosão, quando colocados em contato com a água (Figura 10). A capacidade de resistência dos ovos é um sério obstáculo para sua erradicação. Esta condição permite que os ovos sejam transportados a grandes distâncias, em recipientes secos, tornando-se assim, o principal meio de dispersão do inseto.

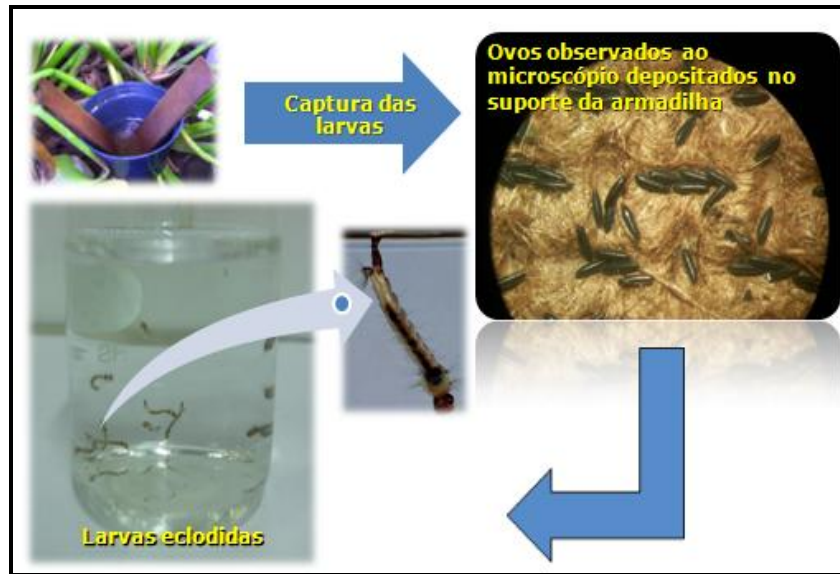


Figura 10. Obtenção dos ovos do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e eclosão das larvas.

b) A larva

Na fase de larva o *Aedes aegypti* (Figura 11) possui aspecto vermiforme, sifão curto, grosso e mais escuro que o corpo e possui 4 estádios evolutivos. A duração desta fase depende da temperatura e da alimentação, em média dura sete dias. As larvas são sensíveis a movimentos bruscos na água.



Figura 11. Larvas do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).
Fonte: WIKIMEDIA (2009)

c) A pupa

A pupa é o último estágio da fase aquática (Figura 12) e possui o aspecto de vírgula, sendo bastante móvel quando perturbada; seu corpo escurece a medida que se aproxima o momento da emergência do adulto. Esta fase dura de dois a três dias e durante este período a pupa não se alimenta.



Figura 12. Pupa do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).
Fonte: ARBOVIRUS (2009).

d) O adulto

Os mosquitos adultos estão na fase de reprodução e dispersão da espécie. Seu corpo é escuro, com faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais e possui um desenho em forma de lira no mesonoto (Figura 6). Eles podem acasalar 24h após emergirem. O acasalamento pode se dar durante o voo ou pousados sobre uma superfície. O repasto sanguíneo das fêmeas fornece proteínas para o desenvolvimento dos ovos. Ocorre nas primeiras horas do dia e ao anoitecer. O macho alimenta-se de carboidratos extraídos dos vegetais. A fêmea faz uma postura após cada repasto sanguíneo. O intervalo entre a alimentação e a postura é de três dias. A postura se dá geralmente no fim da tarde. A fêmea é atraída por recipientes sombreados ou escuros, com superfície áspera. Prefere água limpa e distribui cada postura em vários recipientes (SILVA 2006).

2.6.2 O Dengue

O dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que entre 50 a 100 milhões de pessoas se infectem anualmente, em mais de 100 países, de todos os continentes, exceto a Europa. Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência dessa doença (BRASIL, 2009a).

Trata-se de uma virose transmitida pela picada dos mosquitos *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus*, que após terem picado uma pessoa doente, adquirem o flavivírus, causador da doença, passando a disseminá-lo. Seu período de incubação é de oito a dez dias (FUNASA, 2002).

É uma doença transmitida por um arbovírus do gênero *Flavivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*. São conhecidos quatro sorotipos: 1, 2, 3 e 4. A presença do vírus no organismo provoca alterações bioquímicas como a diminuição da albumina no sangue, albuminúria e discreto aumento dos testes de função hepática: aminotransferase, aspartato sérica (conhecida anteriormente por transaminase glutâmico – oxalacética – TGO) e aminotransferase alanina sérica (conhecida anteriormente por transaminase glutâmico pirúvica – TGP) (SILVA, 2006).

A doença manifesta-se de duas formas. A forma benigna é difundida e tem sintomas semelhantes aos de uma forte gripe. A forma maligna é a hemorrágica e atinge principalmente as pessoas que já foram acometidas pela forma benigna da doença. Esta forma hemorrágica é letal na maioria dos casos, pois provoca hemorragias internas. Não existe tratamento específico contra o dengue. Os mosquitos são responsáveis por mais doenças que qualquer outro grupo de artrópodes. O mosquito *Aedes aegypti* atua como um vetor para um arbovírus responsável pela febre amarela nas Américas Central e do Sul e no oeste da África.

Este mosquito também é o vetor do dengue hemorrágico, que se tornou endêmico no Brasil. Ele é atualmente um mosquito que apresenta a maior dispersão em áreas urbanas do mundo. Esta espécie é de grande importância para a medicina, pois se trata do vetor de quatro sorotipos do flavivírus causador do dengue clássico e da febre hemorrágica do dengue. O aumento na densidade desse mosquito está relacionado ao comportamento sinantrópico e ao hábito antropofílico dessa espécie (SILVA et al., 2004).

Os machos de todas as espécies de mosquitos não sugam o sangue humano ou de animais, eles se alimentam de frutos. Apenas as fêmeas sugam o sangue que ela precisa de modo a amadurecer os seus ovos. Os ovos da maioria das espécies de insetos são postos juntos, mas o *Aedes* põe os ovos separadamente, conseqüentemente permitindo a difusão dos ovos e aumentando a chance de sobrevivência.

A maioria dos mosquitos põe seus ovos em qualquer tipo de água, entretanto o *Aedes aegypti* põe seus ovos na maioria das vezes em água limpa. Porém, segundo SILVA et al. (1999), o *Aedes* tem uma capacidade de adaptação a condições adversas, desenvolvendo-se até mesmo em águas poluídas. De acordo com SILVA e SILVA (1999), a quiescência dos ovos do *Aedes aegypti* se dá em ambientes inóspitos. Os seus ovos podem sobreviver por longos períodos, mesmo em ambientes secos, geralmente por mais de um ano. Uma vez que o vírus pode ser transmitido do adulto para o ovo, o vírus também consegue sobreviver até o próximo período de chuvas, quando as cidades ficam alagadas. O vírus se instala nas glândulas salivares do mosquito, que ao picar o indivíduo, injeta saliva na ferida, de modo a evitar a coagulação sanguínea e facilitar a alimentação. Durante a alimentação, as fêmeas do mosquito injetam o vírus na circulação sanguínea.

O primeiro relato de doença semelhante ao dengue foi descrita numa enciclopédia chinesa da Dinastia Chin (265 a 420 A.C.). Foi denominada pelos chineses de veneno da água, pois achavam que de alguma maneira estava associada a insetos (SILVA e SILVA, 1999).

Epidemias foram também descritas nas Índias Ocidentais em 1635. Os primeiros relatos de uma síndrome febril aguda semelhante ao dengue foram detectados na ilha de Jakarta, na Ásia, e no Cairo e em Alexandria, no Egito, em 1779. Em 1903, Graham forneceu, pela primeira vez, evidências da transmissão por mosquito, e, em 1906, Bancroft concluiu ser o *Aedes aegypti* o vetor do dengue. No final da Segunda Grande Guerra, Sabin e colaboradores fizeram importantes contribuições como a definição dos sorotipos dengue 1 e 2, do tamanho da partícula viral, das vias de infecção, de agentes inativantes, da duração da imunidade homóloga e heteróloga (SILVA, 2006).

Até os dias atuais, o dengue ainda é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 80 milhões de pessoas se infectem anualmente, em 100 países, de todos os continentes, exceto a Europa. Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência do dengue (FUNASA, 2002).

O dengue clássico e o dengue hemorrágico são problemas importantes de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais. O dengue está presente em mais de 100 países e 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas endêmicas. No início desta década, foi estimada a ocorrência de 50-100 milhões de casos de dengue, em plena crise epidêmica. Estima-se que cerca de 250.000-500.000 casos de dengue hemorrágico são oficialmente notificados anualmente (GUZMÁN e KOURI, 2001).

De acordo com SILVA (2006) há referências de epidemias em 1916, em São Paulo, e em 1923, em Niterói, sem diagnóstico laboratorial. A primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista - Roraima, causado pelos sorotipos DEN-1 e DEN-4 (Figura 13).

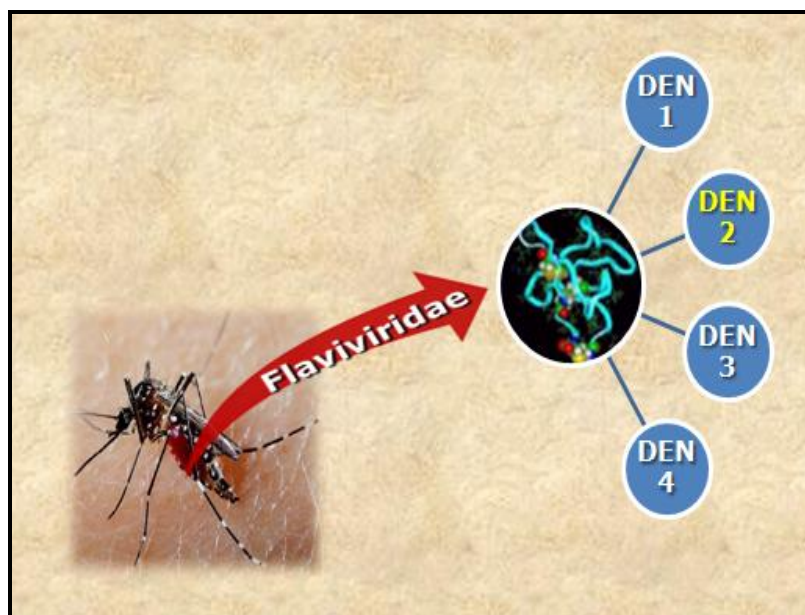


Figura 13. Sorotipos DEN-1, DEN-2, DEN3 e DEN-4 do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).
Fonte: ARBOVIRUS (2009).

A partir de 1986, foram registradas epidemias em diversos estados. A mais importante ocorreu no Rio de Janeiro onde, pelo inquérito sorológico realizado, estima-se que pelo menos 1 milhão de pessoas foram afetadas pelo sorotipo DEN-1 nos anos 1986/1987. Outros estados como Ceará, Alagoas, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Tocantins, São Paulo, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul notificaram surtos no período de 1986/1993 (SANTOS, 2003).

Em nosso país, as condições socioambientais favoráveis à expansão do *Aedes aegypti* L. possibilitaram a dispersão do vetor desde sua reintrodução em 1976 e o avanço da doença. Essa reintrodução não conseguiu ser controlada com os métodos tradicionalmente empregados no combate às doenças transmitidas por vetores. Programas com baixíssima ou mesmo nenhuma participação da comunidade, sem integração intersetorial e com pequena utilização do instrumental epidemiológico mostraram-se incapazes de conter um vetor com altíssima capacidade de adaptação ao novo ambiente criado pela urbanização acelerada e pelos novos hábitos (BRASIL, 2009a).

Um levantamento de dados realizado em fevereiro de 2009 pelo Ministério da Saúde mostra o mapa da incidência da doença no País (Figura 14).

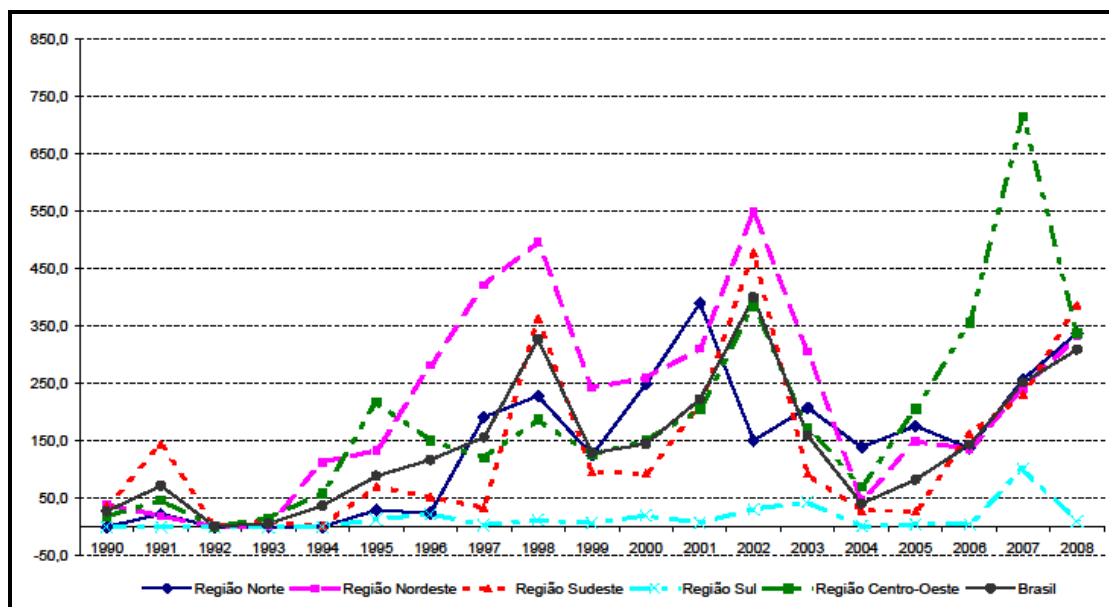


Figura 14. Taxa de Incidência do dengue no Brasil por regiões entre os anos de 1990 e 2008.
Fonte: BRASIL (2009b).

É notável que desde o ano de 1990 a incidência da doença tem crescido em todas as regiões do País. Contudo, até março de 2009, os casos de dengue caíram no Brasil. O balanço parcial de casos, divulgado Ministério da Saúde, aponta que nas dez primeiras semanas deste ano foram notificados 114.355 casos da doença, representando uma queda de 28,6% em relação ao mesmo período de 2008, quando 160.137 pessoas foram vítimas do mosquito. Houve redução no número de casos da doença em 19 estados e no Distrito Federal. Ocorreu aumento de notificações na Bahia, Acre, Roraima, Amapá, Minas Gerais, Espírito Santo e Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2009c).

Apesar dos esforços para o controle da doença, até o momento não existe uma vacina para prevenção do dengue. Enquanto não se pode contar com esta medida de controle, o único elo vulnerável da cadeia epidemiológica é o vetor. A luta contra os mosquitos consiste principalmente na eliminação dos seus criadouros potenciais, que se constituem em recipientes artificiais de água, como pneus usados expostos ao ar, depósitos de ferro velho descobertos, latas, garrafas e plásticos abandonados. As medidas de controle consistem na limpeza de terrenos baldios; aplicação de larvicida em depósitos de água de consumo; uso de inseticida para as formas adultas do mosquito, durante os períodos de transmissão.

Claro que as ações de prevenção do dengue necessitam de envolvimento de outros setores da sociedade, particularmente na questão da melhoria de condições de urbanização e habitação, coleta regular de lixo, abastecimento permanente de água encanada e educação escolar (TAUIL, 2001).

Além disso, a conscientização de cada cidadão sobre as medidas de prevenção e controle do dengue é de fundamental importância para a diminuição do número de casos da doença. É necessária uma ação efetiva dos órgãos públicos de saúde, no que diz respeito ao controle da doença, em parceria com a população.

Capítulo 3

Objetivos

3.1 Objetivo geral

Caracterizar analiticamente e avaliar o uso da mistura dos óleos essenciais das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl (folhas) e *Aniba duckei* Kostermans (galhos) como agente larvicida frente ao mosquito *Aedes aegypti*.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair quantitativamente o óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* Lindl e galhos *Aniba duckei* Kostermans pelo método de hidrodestilação.
- Caracterizar físico-quimicamente o óleo essencial, no que diz respeito à densidade, índice de refração, solubilidade em álcool a 70%, cor e aparência.
- Caracterizar analiticamente e quantificar os componentes majoritários da mistura dos óleos essenciais por CG-EM.
- Calcular a concentração letal a 50% (CL₅₀) do óleo a partir do teste de toxicidade (atividade larvicida frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti*).

Capítulo 4

Parte Experimental

O presente trabalho foi desenvolvido com a utilização de vários equipamentos e contou com a parceria dos seguintes laboratórios e instituições: Laboratório de Pesquisa em Química Analítica (LPQA), Central Analítica, Laboratório de Físico-Química e Microbiologia do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão – UFMA e da Central Analítica da Unicamp-SP.

4.1 Origem, coleta e preparo da amostra vegetal

As amostras de galhos foram coletadas de três árvores da *Aniba duckei* Kostermans cultivadas na Reserva Florestal Ducke, rodovia AM – 010 km 26 – Manaus – AM – Brasil.

Uma exsicata da espécie *Aniba duckei* Kostermans foi preparada a partir da coleta de três ramos de folhas, com frutos de aproximadamente 30 a 40 cm de comprimento. Em seguida foram colocados em jornais e acondicionados para transporte entre folhas de papelão, presos por um barbante. Estes foram prensados e secos a 37 – 40 °C por 24 horas e depois foram presas e montadas em cartolina na qual foi afixada uma ficha adesiva contendo: nome científico, nome vulgar, família, local de coleta, identificador. Essa exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal do Amazonas.

Para o preparo das exsicatas, foram coletados três ramos de folhas da *Pimenta dióica* Lindl, de aproximadamente 30 a 40 cm de comprimento, em seguida foram colocados individualmente em jornais de papelão presas por barbantes. Estas foram prensadas e secas à uma temperatura de 37 a 40°C por 24 a 36 horas, em seguida foram montadas em cartolinas, numeradas e depositadas no Herbário da UFSCar (Apêndice 2).

4.2 Moagem do material vegetal

As amostras coletadas das folhas (*Pimenta dioica* Lindl) e dos galhos (*Aniba duckei* Kostermans) foram colocadas para secar em uma sala, por um período de 7 dias. Após o período de secagem utilizou-se um moinho elétrico Tenal, modelo TE-340 do pavilhão tecnológico para trituração das folhas e dos galhos isoladamente. Após a moagem o material em pó foi armazenado em frascos de polietileno para posterior extração dos respectivos óleos essenciais.

4.3 Extração do óleo essencial

Para extração do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl e da *Aniba duckei* Kostermans, utilizou-se o Sistema Extrator de Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo de 1000 mL e uma manta elétrica como fonte geradora de calor. A cada extração do óleo essencial, eram pesadas 30 gramas da biomassa da *Pimenta dioica* Lindl e adicionou-se 300 mL de água destilada, e também eram pesadas 30 gramas de galhos moídos da *Aniba duckei* Kostermans e adicionou-se 300 mL de água destilada, ambos em balões de fundo redondo acoplado ao Sistema de Clevenger. Em seguida, ligava-se a manta elétrica e mantinha-se a temperatura de 100° C e após 3 horas e meia encerrava-se a destilação recolhendo-se os óleos essenciais. Os óleos eram secos por meio de percolação em Na₂SO₄ anidro. Essas etapas foram realizadas em triplicatas e as amostras eram armazenadas em recipientes de vidro sobre refrigeração para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis.

O rendimento da extração foi calculado na relação massa/volume, observando o volume obtido no próprio sistema de extração.

O rendimento da extração pode ser calculado a partir da quantidade de óleo que se obteve com uma determinada massa vegetal. Como nesse experimento partiu-se de uma massa de 30 g de folhas moídas da *Pimenta dioica* Lindl e obteve-se em média 0,75 mL de óleo essencial em cada extração o rendimento m/v foi de 2,50%. Como a densidade do óleo foi determinada em 0,982 g mL⁻¹, rendimento m/m foi calculado em 2,45%.

O presente estudo demonstrou que a espécie *Aniba duckei* Kostermans, forneceu um óleo essencial cujo rendimento foi de 1,93% (m/m), o qual foi considerado de bom valor em relação à extração de outros óleos essenciais de plantas aromáticas.

4.4 Características físico-químicas do óleo essencial

Na caracterização das propriedades físico-químicas dos óleos essenciais realizou-se as análises de densidade, solubilidade em etanol a 70% v/v, índice de refração, cor e aparência.

4.4.1 Densidade

A densidade da mistura de óleos essenciais foi obtida e determinada com o emprego de um picnômetro de 1,0 mL previamente seco, tarado e aferido. Em seguida era cheio com as amostras do óleo essencial a 25 °C e então pesado.

4.4.2 Solubilidade em etanol (70%)

Para esse teste, foram utilizados balões volumétricos de 10 mL contendo um volume constante do óleo essencial, sobre o qual era adicionado proporcionalmente volume crescente da mistura de álcool/água destilada a 70% (v/v) até a sua completa solubilização.

4.4.3 Índice de refração

As leituras eram feitas a 25 °C com o óleo colocado diretamente sobre o prisma de Flint do refratômetro, para o qual era utilizada uma micropipeta.

4.4.4 Cor

A técnica utilizada foi visual, foi avaliado visualmente comparando-se a cor da mistura de óleos essenciais com cores conhecidas e sobre um fundo branco, com as cores conhecidas e descritas na literatura especializada.

4.4.5 Aparência

A técnica empregada, também nesse caso, foi à visual na qual se fez uma comparação das essências no que diz respeito à sua transparência ou limpidez por testes sensoriais.

4.5 Análises químicas da mistura de óleos essenciais

4.5.1 Análise por espectrofotometria no UV-Vis

Utilizou-se um espectrofotômetro UV-Vis modelo “Cary 50” da Hewlett Packard. As amostras foram adicionadas em uma solução a 70% v/v de etanol/água para viabilizar a completa diluição do óleo, já que esta relação foi a que apresentou a menor proporção de etanol sem que a solução turvasse.

4.5.2 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas

Analizou-se o óleo essencial CG-EM no cromatógrafo à gás HP 5890, coluna HP - 1 de metil silicone entre-cruzada (25 m x 0,22 mm i.d.; 0,3 µm de espessura de filme), acoplado a um detector seletivo de massas HP 5970 de impacto eletrônico, com uma energia de 70 eV, temperatura de transferência de 300 °C e banco de dados NBS_Reve (40.000 registros). Para as análises foram injetados 1 µL da amostra diluída em clorofórmio e efetuaram-se as medidas fixando-se às seguintes condições: temperatura inicial: 60 °C, final: 300 °C, tempo inicial: 2 min., final: 15 min., rampa: 2 °C min.⁻¹, gás de arraste: He, solvente: clorofórmio.

4.6 Padrões de eugenol e linalol

No presente estudo foram usados padrões concentrados de eugenol e linalol os quais foram gentilmente fornecidos pela Indústria Dierberger de Óleos Essenciais S.A.

As soluções padrões foram preparadas por diluição a diferentes concentrações em etanol e clorofórmio.

4.7 Obtenção e cultivo das larvas

Como os ovos do *Aedes aegypti* não são postos diretamente na água, mas sim milímetros acima de sua superfície, principalmente em recipientes artificiais, foi preparada uma armadilha simples para coleta desses ovos. Para tanto, foram utilizados jarros de plástico para planta, de aproximadamente 500mL, semi-preenchidos com água e um pedaço de madeira de dimensões aproximadamente 20cmx5cm com uma parte imersa e outra não. A fêmea do *Aedes aegypti*, deposita seus ovos na parte imediatamente superior à lâmina d'água, na parte do madeirite ainda úmida, mas fora da água do jarro.

Os ovos do *Aedes aegypti* foram imersos numa bacia plástica, de formato retangular, com cerca de 3 litros de água mineral para a eclosão. Após a imersão dos ovos, 0,5g de ração de rato foi adicionado à água para auxiliar no crescimento das larvas. Todo o material foi mantido no interior de uma gaiola de madeira e coberta com uma tela de tecido, apropriada para insetos, a fim de evitar a contaminação por ovos de outras espécies de mosquito. Após a eclosão, as larvas foram acompanhadas até que atingissem o 3º ou 4º estágio do desenvolvimento, quando então foram utilizadas nos ensaios de atividade larvicida. São necessários de quatro a cinco dias para que as larvas atinjam o tamanho ideal para os ensaios.

As larvas foram identificadas, como *Aedes aegypti*, por técnicos do Laboratório do Núcleo de Patologia Tropical e Medicina Social, Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão.

4.8 Teste de toxicidade

Para realização do teste de toxicidade, as larvas selecionadas, entre o terceiro e o quarto estágios (10 por teste), foram transferidas para um béquer contendo 20mL de água mineral (26-28°C). As larvas foram capturadas utilizando-se uma pipeta de Pasteur. Cada teste foi feito em quintuplicata para cada concentração testada. Os controles positivos foram realizados com o organofosforado temefós em larvas do *Aedes aegypti*, na concentração utilizada pela vigilância sanitária que é de 100mg L⁻¹. Os controles negativos foram realizados com 20mL de água mineral (26-28°C) contendo 0,04% de Tween. As larvas foram expostas às soluções por 24 horas e ao fim deste período registrou-se a mortalidade.

Para o preparo da solução teste, pesou-se 20mg do óleo essencial, em um recipiente do tipo eppendorf, para cada mililitro da solução teste e, em seguida, foi adicionada uma gota de solvente, do tipo Tween 80, sobre o óleo, fazendo-se então a homogeneização. A seguir, utilizando-se uma pipeta automática, foi adicionado um mililitro de água destilada fazendo-se nova homogeneização.

Esta solução foi então transferida para o béquer contendo as larvas separadas para o teste, de acordo com as concentrações pré-estabelecidas após testes iniciais.

4.9 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada de acordo com o método Reed-Muench, o qual parte do princípio de que, um animal que sobreviva a certa dose, também irá sobreviver em qualquer outra dose menor que aquela, conseqüentemente o animal que morrer com certa dose, também irá morrer em doses maiores que aquela. Desse modo, os dados de mortalidade para cada concentração testada, é construído no gráfico onde se observa uma curva para o acúmulo de animais mortos em cada concentração e outra curva para o acúmulo de sobreviventes. O ponto de intercessão entre as curvas é a Concentração Letal 50% (CL₅₀), pois nesse ponto o número de animais sobreviventes é igual ao número de animais mortos (COLEGATE e MOLYNEUX, 1993).

O intervalo de confiança foi calculado segundo o método de PIZZI (1950). Para tanto, constrói-se um gráfico do percentual de mortos versus logaritmo (log) da dose. A seguir determina-se o valor de “R”, que é a diferença entre o log da dose que mata 75% das larvas e o log da dose que mata 25% das larvas. Calcula-se também a variável “h” que consiste na média das diferenças dos valores de log das doses. Com esses dados determina-se o log do erro padrão (SE), através da seguinte fórmula:

$$(SE)^2 = 0,79.h.\left[\frac{R}{20}\right] \Rightarrow (SE) = \sqrt{0,79.h.\left[\frac{R}{20}\right]}$$

Os valores: 0,79 (encontrado no dividendo) e 20 (situado no divisor) do quociente da radiação acima se referem aos fatores de conversão necessários para calcular o erro padrão estabelecido nas amostras.

Finalmente, o valor do intervalo de confiança é igual a 2×10^{SE} .

Capítulo 5

Resultados e Discussão

5.1 Características físico-químicas da mistura dos óleos essenciais

A comparação entre os valores encontrados e os valores da literatura mostra que algumas características físico-químicas são concordantes entre si e que outra como densidade e índice de refração, apresentam similaridade dos resultados. A variação observada no rendimento é atribuída à época e região de colheita, uma vez que ambos utilizaram o mesmo método e procedimento de extração. Forma de armazenamento e período de extração podem também influenciar no rendimento do óleo obtido (FARIAS, 2001).

Os parâmetros físico-químicos dos óleos essenciais das folhas de *Pimenta dioica* Lindl e dos galhos da *Aniba duckei* Kostermans e da mistura de óleos (Tabela 1), apresentaram similaridade com os padrões. Este fato era esperado uma vez que a mistura foi preparada na proporção de 1:1.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos das espécies *Pimenta dioica* Lindl e *Aniba duckei* Kostermans comparadas com a mistura de óleos essenciais.

Parâmetros Físico-químicos	<i>Pimenta dioica</i> Lindl ^a	<i>Aniba duckei</i> Kostermans ^b	Mistura de óleos Essenciais ^c
Densidade (g mL ⁻¹)	0,949	0,866	0,904
Solubilidade em etanol a (70%)	1:2	1:2	1:2
Índice de refração (N _D 25°)	1,332	1,466	1,379
Cor	Amarelo	Amarelo	Amarelo
Aparência	Límpido	Límpido	Límpido
Odor	Característico	Característico	Característico

^(a)Monteiro (2008);

^(b)Teles (2003);

^(c)Trabalho em estudo

5.2 Caracterização Química

5.2.1 Análises espectrofotométricos da mistura de óleos essenciais na região do ultravioleta – visível

No presente trabalho utilizou-se a espectrofotometria de UV-Vis tanto para investigar a presença do eugenol e linalol na mistura de óleos essenciais, bem como para a sua caracterização eletrônica.

Os espectros de absorção na região da ultravioleta, para a mistura de óleos essenciais (A), para a solução etanol/água a 60% em volume (B), padrão de linalol (D) e padrão de eugenol (C) são apresentados na Figura 15.

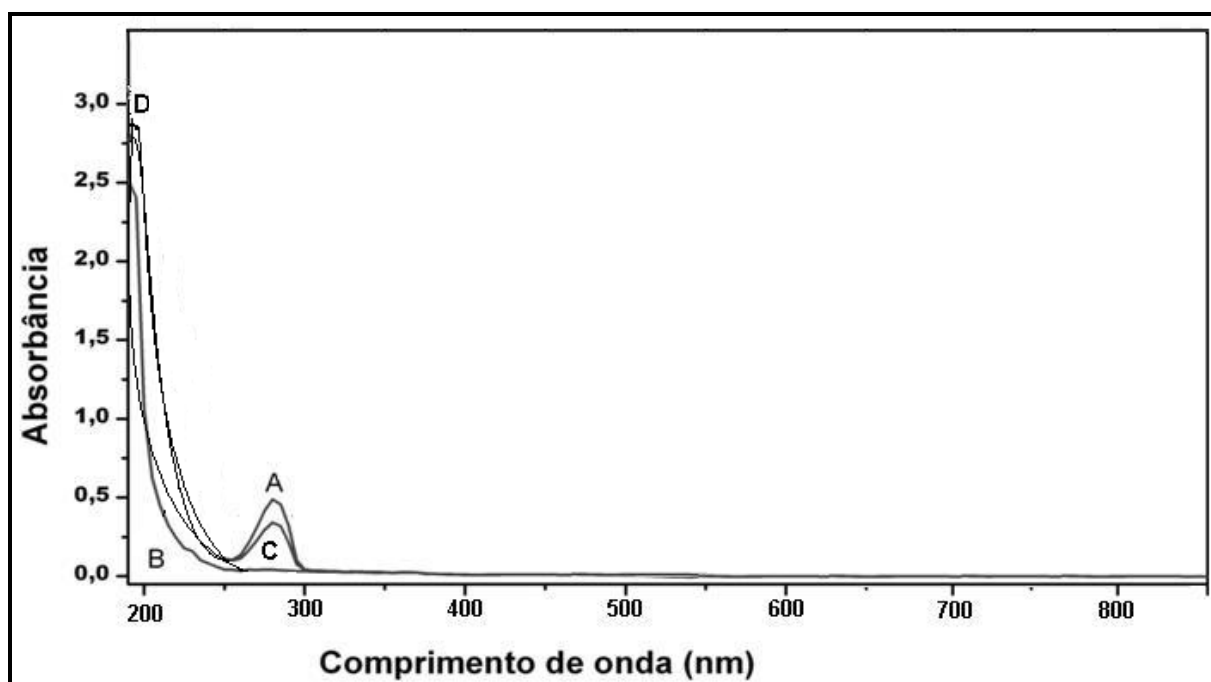


Figura 15. Espectros de absorção no UV-Vis. (A) padrão de eugenol; (B) padrão de linalol; (C) mistura de óleos essenciais; (D) solução etanol/água à 60%.

Nessa análise espectrofotométrica, a solução de etanol/água a 60% em volume foi escolhida após um estudo sobre a solubilidade dos óleos essenciais em várias concentrações dessa solução.

Na Figura 15, essas bandas podem ser atribuídas à presença de compostos alifáticos insaturados (230 nm) e a compostos aromáticos com substituição auxocrômica (280 nm) como o grupo hidroxila, sendo que ambas com transições eletrônicas*, embora unidades fenilpropílicas apresentem bandas com máximo de absorção no mesmo intervalo dos comprimentos de onda observados (UGAZ, 1994; SILVERSTEIN et al, 2007). No entanto, ao se comparar o espectro da mistura de óleos essenciais com os espectros dos padrões de eugenol e linalol, nota-se que os mesmos praticamente se sobrepõem, indicando que o eugenol e o linalol encontram-se presente na mistura de óleos essenciais como componentes majoritários.

5.2.2 Análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

Por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foi possível separar e identificar seis constituintes da mistura de óleos essenciais, os quais são apresentados na Figura 16, seguindo a ordem de eluição.

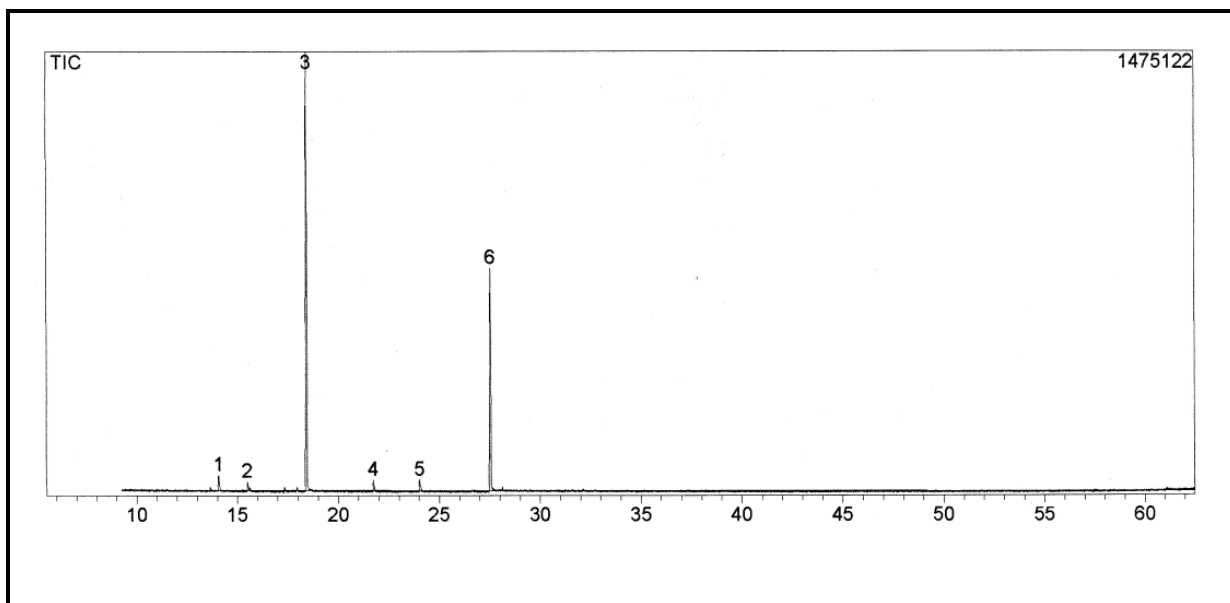


Figura 16. Cromatograma da mistura de óleos essenciais.

Na Figura 16 apresenta seis picos cromatográficos, sendo que o pico cromatográfico 1 é o β -mirceno, cujo tempo de retenção foi 14,08 min; o pico cromatográfico 2 é o Limoneno, com tempo de retenção 15,52 min; o pico cromatográfico 3 é o Linalol, o qual apresentou o tempo de retenção 18,46 min; o pico cromatográfico 4 é o Mircenol, cujo tempo de retenção foi 21,76 min; o pico cromatográfico 5 é o Alilfenol, com tempo de retenção 24,05 min; e o pico cromatográfico 6 é o Eugenol, cujo tempo de retenção foi de 27,56 min.

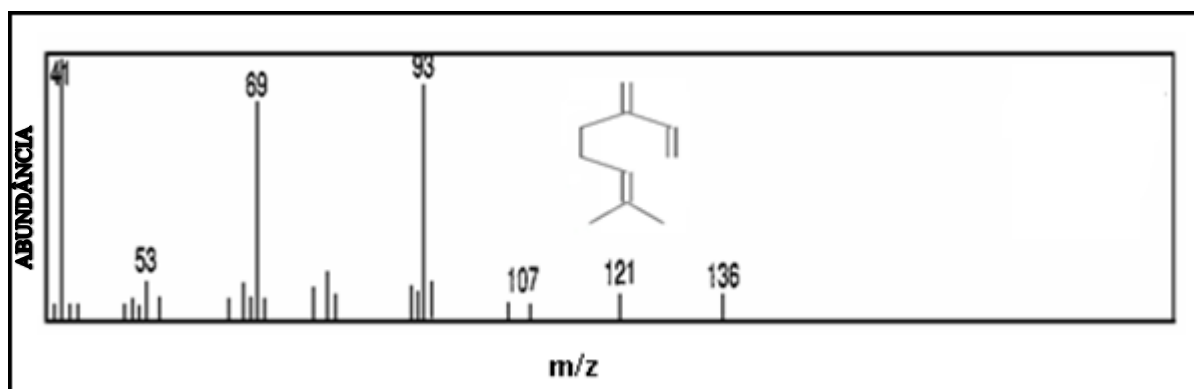
A Tabela 2 mostra a identificação de cada pico apresentados na Figura 17, assim como o seu tempo de retenção (T_r) na coluna e o respectivo teor na mistura de óleos essenciais, sendo que a quantificação dos seis picos cromatográficos foi determinada pelo método de normalização (integração da área do pico correspondente). Nota-se que o linalol apareceu com 63,04%, e o eugenol com 31,07%, o que caracteriza serem estes os componentes majoritários.

Tabela 2. Composição química da mistura de óleos essenciais.

Pico	T _r (min)	Substância identificada	Teor (%)
1	14,08	β-Mirceno	2,36
2	15,52	Limoneno	1,00
3	18,46	Linalol	63,04
4	21,76	Mircenol	1,13
5	24,05	Alilfenol	1,40
6	27,56	Eugenol	31,07

A seguir são discutidos os sete picos cromatográficos da Tabela 2 que se apresentaram com seus respectivos teores.

O pico 1 da Figura 17 foi identificado, segundo a espectroteca NIST02 e a literatura (ADAMS, 2007), como sendo o β- mirceno de fórmula C₁₀H₁₆ e massa molecular correspondente a 136 g mol⁻¹ (Figura 17). Esse hidrocarboneto monoterpênico apresenta o pico molecular m/z 136 e o pico intenso em m/z 93, o qual é referente à estrutura C₇H₉⁺ formada por isomerização, seguida de clivagem alílica (SILVERSTEIN et al, 2007).

**Figura 17.** Espectro de massa do β-mirceno.

De acordo com o banco de dados da espectroteca NIST02 e de padrões constantes na literatura (ADAMS, 2007), o pico 2 da Figura 21 corresponde ao limoneno, C₁₀H₁₈, evidenciado pela presença do íon molecular m/z=136 observado no espectro de massas da Figura 18.

O referido espectro de massas mostra ainda picos característicos de hidrocarbonetos: o pico m/z 121 [M-15] é referente à perda do grupo metila, enquanto que os picos m/z 107 [M-15-14] e m/z 93 [M-15-14-14] são decorrentes da subsequente perda do grupo metileno. O aparecimento do pico com m/z 68 ($C_5H_8^+$) pode ser decorrente da quebra das ligações carbono-carbono semelhantemente à reação retro-Diels-alder, o qual é bastante comum em alquenos cíclicos, resultando ainda numa molécula neutra, conforme demonstrado na Figura 19 (SILVERSTEIN et al, 2007).

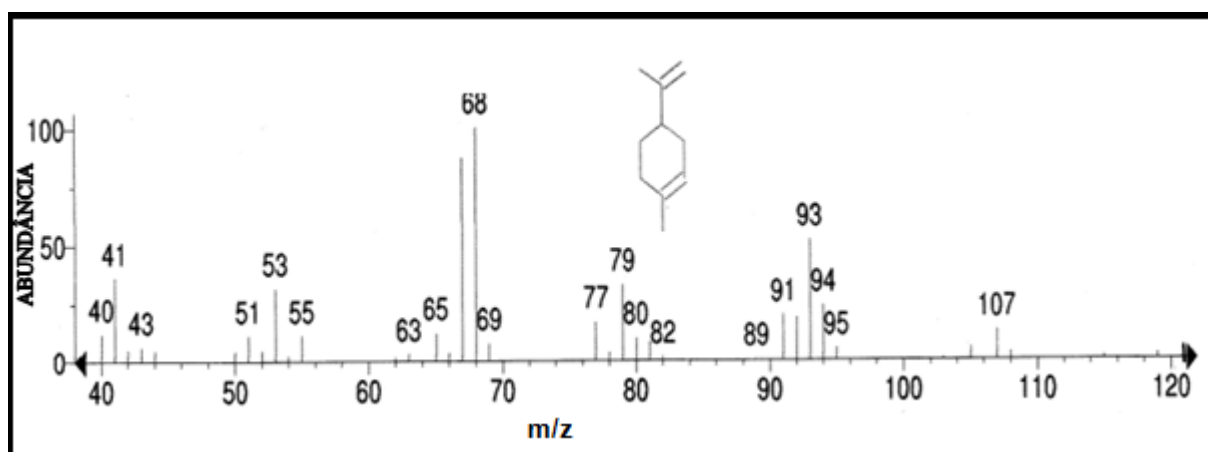


Figura 18. Espectro de massa do Limoneno.

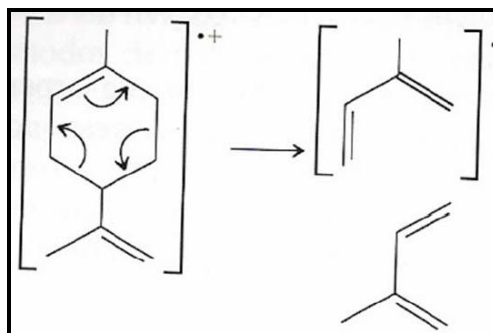


Figura 19. Ocorrência da reação de retro-Diels-Alder na fragmentação do limoneno.

O espectro de massa da Figura 20 foi relacionado ao linalol, percebe-se que o pico do íon molecular $m/z = 154$ (o qual não aparece no espectro por causa da sua instabilidade), confirmado como $C_{10}H_{18}O$ a sua fórmula molecular, de baixa intensidade, característico dos alcoóis terciários. Os picos $m/z = 136$ [M-18] e $m/z = 121$ são característicos da perda de água e do grupo metila, respectivamente.

Para alcoóis terciários, ocorre freqüentemente a quebra de ligação C-C vizinha do átomo de oxigênio, com eliminação do maior grupo, o que fica evidenciado no pico de $m/z=71$ ($H_2C=CH-COH^+-CH_3$) e pelo pico de $m/z=83$. O pico com $m/z=93$ é devido à eliminação de água e do grupo $C_3H_8^+$ [M-44]. (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2006).

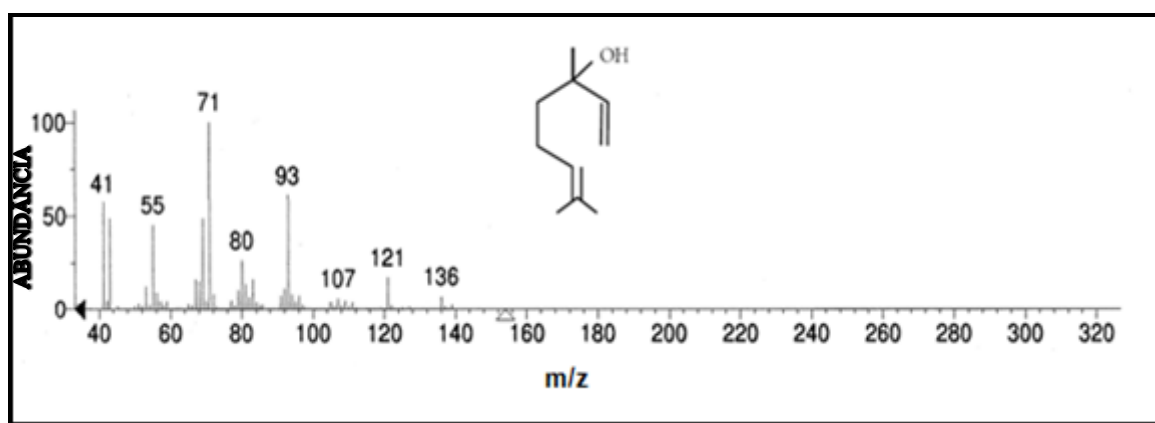


Figura 20. Espectro de massa do Linalol.

O espectro de massas da Figura 21 serve como parâmetro para a proposta de identificação do íon-molecular, está situado no ponto em que a relação $m/z = 154$, confirmando como fórmula $C_{10}H_{18}O$, que caracteriza o álcool terciário chamado de mircenol. O pico $m/z = 136$ é devido à perda de água, que freqüentemente ocorre pela decomposição térmica de alcoóis superiores nas paredes quentes da câmara de injeção, (SILVERSTEIN.; BASSLER.; MORRILL, 2006). O pico $m/z = 121$ é resultante da perda de água e de grupo metila, característica de alcoóis terpênicos.

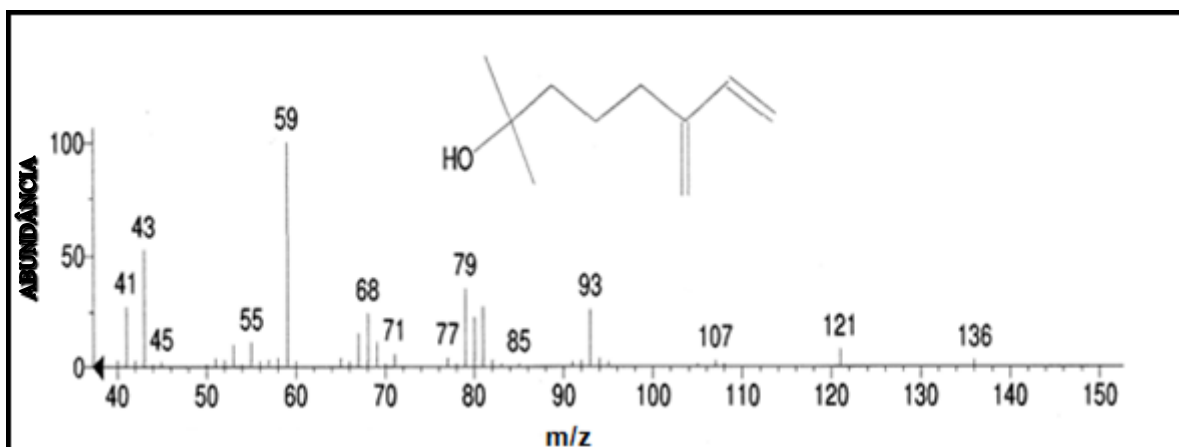


Figura 21. Espectro de massa do Mircenol.

O espectro de massa da Figura 22, refere-se ao composto Alilfenol. O pico do íon molecular apresenta $m/z=134$, com pico base de $m/z=133$, característico de fenóis substituídos.

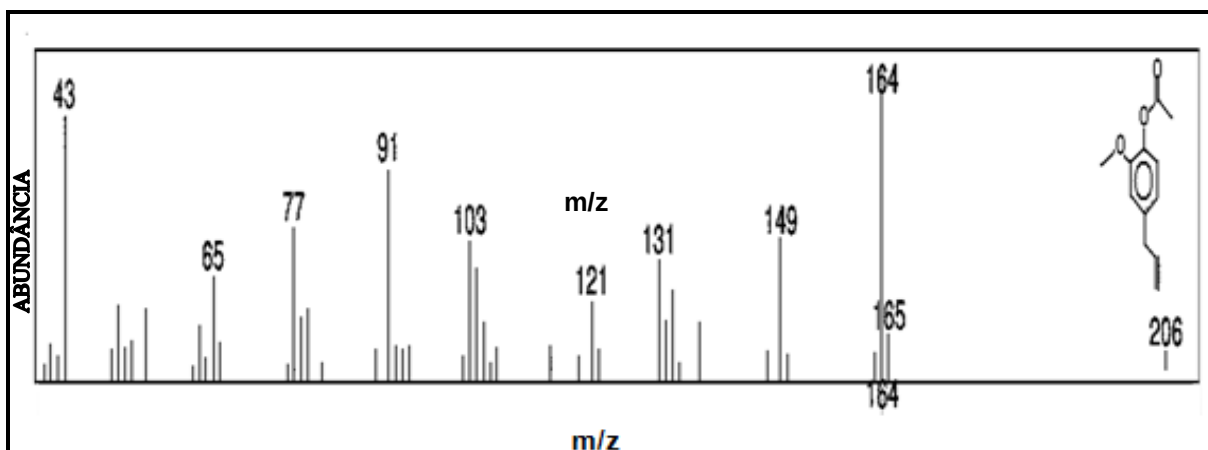


Figura 22. Espectro de massa do Alilfenol.

O espectro de massas da Figura 23 serve como parâmetro para a proposta de identificação das massas apresenta o pico do íon molecular $m/z = 164$ [M^+], confirmando como $C_{10}H_{12}O_2$ a fórmula do eugenol. Para fenóis, é comum o pico de o íon molecular ser também o pico base, como é o caso do eugenol. O pico $m/z = 149$ [$M-15$] é característico da perda do radical metila (CH_3) e o pico $m/z = 77$ é característico do íon ($C_6H_5^+$).

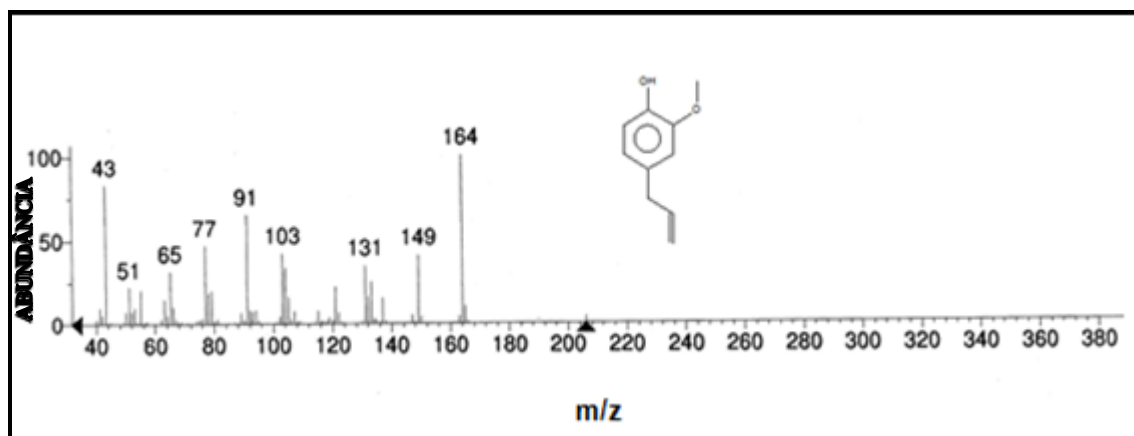


Figura 23. Espectro de massas do Eugenol.

5.3 Atividade Larvicida da mistura de óleos essenciais da *Pimenta dioica* Lindl e *Aniba duckei* Kostermans

A atividade larvicida da mistura de óleos essenciais extraído das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl e galhos *Aniba duckei* Kostermans foi testada em cinco concentrações diferentes: 50, 70, 100, 130 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo n é o número de larvas do mosquito *Aedes aegypti* utilizadas no ensaio larvicida para cada concentração (totalizando 10 larvas por ensaio).

Para cada concentração os testes foram realizados em quintuplicata. Os dados sobre o número de larvas vivas e de larvas mortas foram encontrados através de uma média das cinco repetições para cada uma das cinco concentrações testadas (Tabela 3).

Tabela 3. Mortalidade das larvas do *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição em várias concentrações da mistura dos óleos essenciais extraído das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl e galhos *Aniba duckei* Kostermans.

Dose, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Log dose	Mortos	Vivos	Acumulados Mortos	Acumulados Vivos	Mortali- dade, %
150	2,176	10	0	20,667	0	100
130	2,114	6,333	3,667	10,667	3,667	63,33
100	2,000	2,667	7,333	4,334	11	26,67
70	1,845	1,667	8,333	1,667	19,333	16,67
50	1,699	0	10	0	29,333	0

Número de larvas (n = 10).

De acordo com a Tabela 3, a concentração de $70 \mu\text{g mL}^{-1}$ da mistura do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl apresentou a menor atividade larvicida, matando, em média, 1,667 larvas, o que corresponde a 16,67 % de mortalidade. Na concentração de $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ da mistura dos óleos essenciais, a atividade larvicida atingiu a mortalidade de 100% dos indivíduos testados, ou seja, 10 larvas.

A taxa de percentagem da mortalidade das larvas frente ao óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl é mostrada na Figura 24, o qual apresentou-se constante a partir do Log dose 2,176 (concentração $150 \mu\text{g mL}^{-1}$).

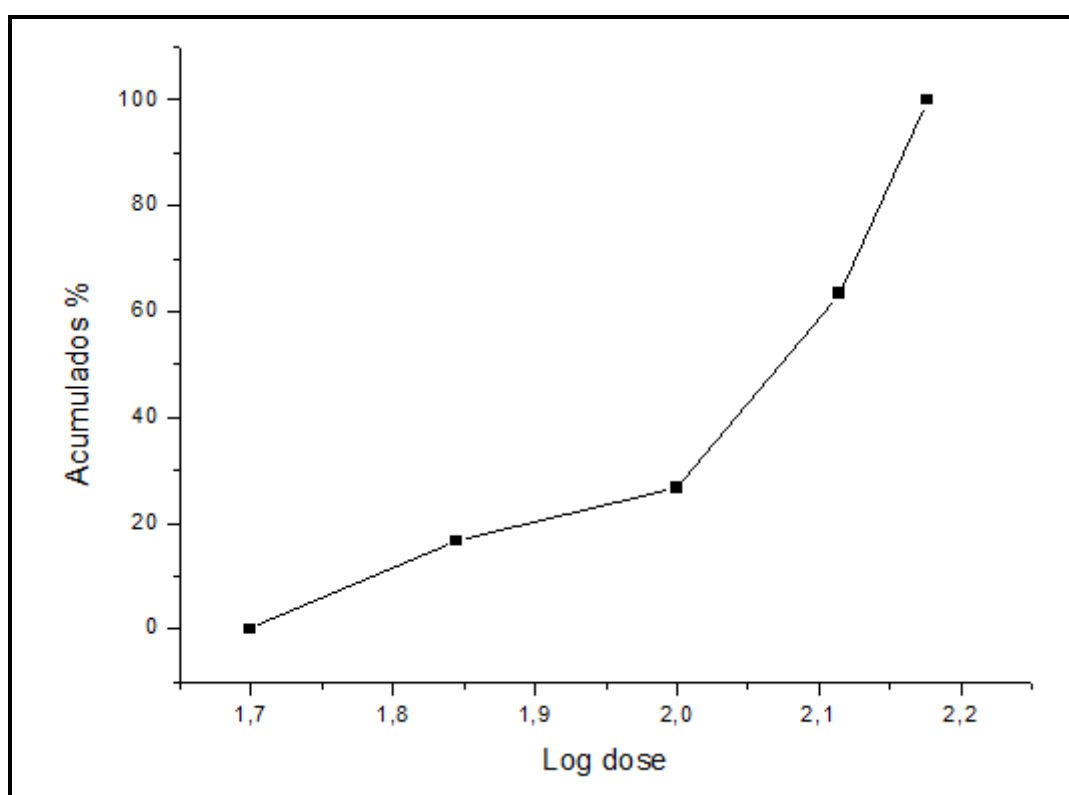


Figura 24. Taxa de Mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* – expostas a cinco concentrações diferentes do óleo essencial de *Pimenta dioica* Lindl, após 24 horas – versus o logaritmo de cada dose aplicada.

De acordo com CHENG et al. (2003) valores de $CL_{50} < 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados ativos.

A Figura 24 mostra que a Concentração Letal 50% (CL_{50}), concentração na qual cinquenta por cento das larvas testadas morrem, foi encontrada próxima ao Log dose 1,950 (abaixo da concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$). A dose letal 50% para a mistura de óleos essenciais da *Pimenta dioica* Lindl e *Aniba duckei* Kostermans foi calculada através da intersecção das curvas de indivíduos acumulados mortos e indivíduos acumulados vivos da Figura 25, tendo como resultado a concentração de $113,95 \mu\text{g mL}^{-1}$ com um intervalo de confiança de $2,11 \mu\text{g mL}^{-1}$ para mais ou para menos, isto é, CL_{50} de $113,95 (\pm 2,11) \mu\text{g mL}^{-1}$.

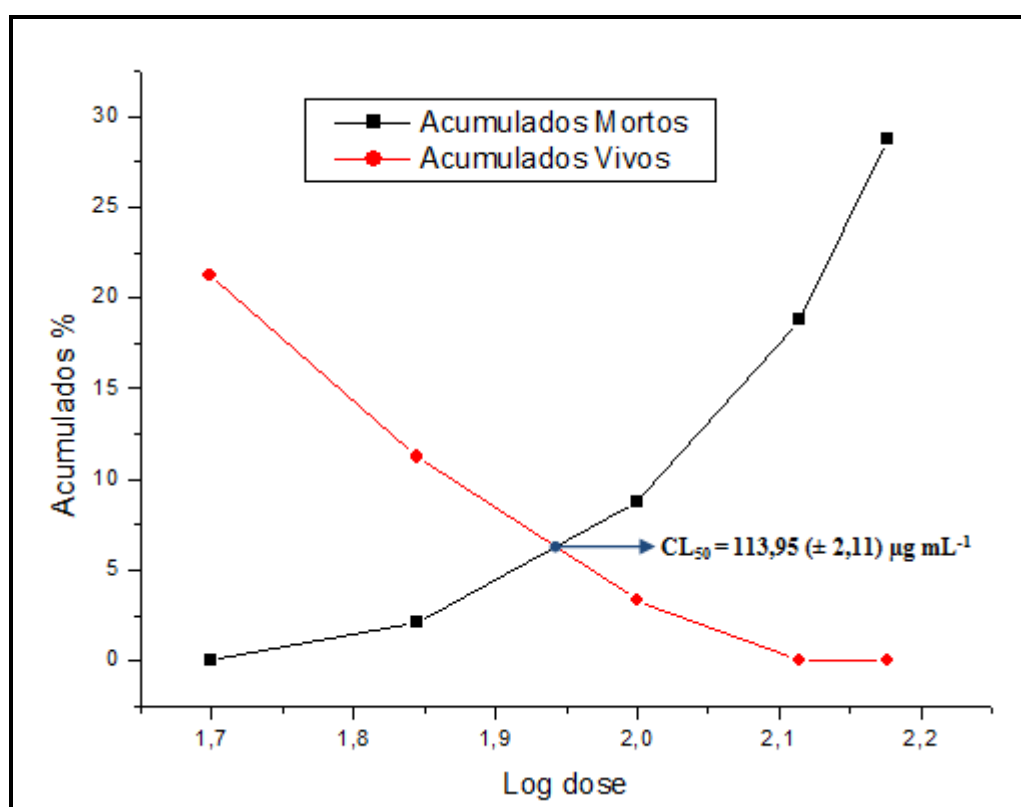


Figura 25. Estimativa da CL_{50} da mistura dos óleos essenciais da *Pimenta dioica* Lindl e da *Aniba duckei* Kostermans pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL_{50} é o ponto de intersecção das duas curvas.

Para o padrão de linalol o componente majoritário do óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans, a atividade larvicida foi testada nas mesmas cinco concentrações em que a mistura dos óleos essenciais foram testadas, sendo n o número de larvas do mosquito *Aedes aegypti* utilizadas no ensaio para cada concentração, num total de 10 larvas por ensaio.

De forma análoga o padrão de linalol foi testado para cada concentração em quintuplicata. Os dados sobre o número de larvas vivas e de larvas mortas foram encontrados através de uma média das cinco repetições para cada uma das seis concentrações testadas (Tabela 4).

Tabela 4. Mortalidade das larvas do *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição em várias concentrações do padrão de linalol.

Dose, $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Log dose	Mortos	Vivos	Acumulados Mortos	Acumulados Vivos	Mortali- dade, %
350	2,544	10	0	19,667	6	100
300	2,477	4	6	9,667	12,333	40
250	2,398	3,667	6,333	5,667	20,666	36,67
200	2,301	1,667	8,333	2	30,333	16,67
150	2,176	0,333	9,667	0,333	40	3,33
100	2	0	10	0	50	0
50	1,699	0	10	0	60	0

Número de larvas (n = 10).

Analisando-se a Tabela 4 verifica-se que para o padrão de linalol, a concentração de 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não apresentou atividade larvicida. A concentração de 350 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou a maior atividade larvicida, provocando a morte de 100% dos indivíduos testados.

A Taxa de percentagem da mortalidade das larvas frente ao padrão do linalol é mostrada na Figura 26, apresentando 100% de mortalidade no Log dose 2,544 (concentração 350 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

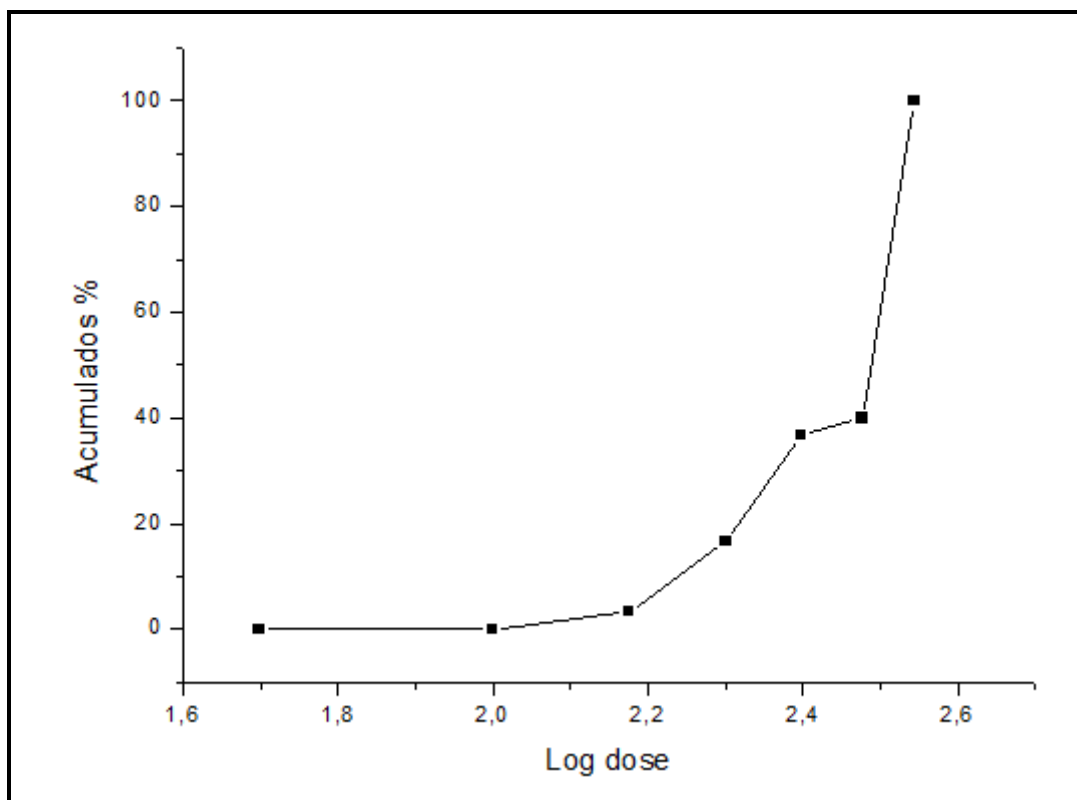


Figura 26. Taxa de Mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* expostas a sete concentrações do padrão de linalol, após 24 horas.

Partindo-se dos valores da Tabela 4 foi possível calcular a Concentração Letal 50% para o padrão de linalol (CL_{50}). A Figura 27 mostra sua estimativa de CL_{50} pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada, tendo sido a concentração letal 50%, CL_{50} , o ponto de interseção das duas curvas.

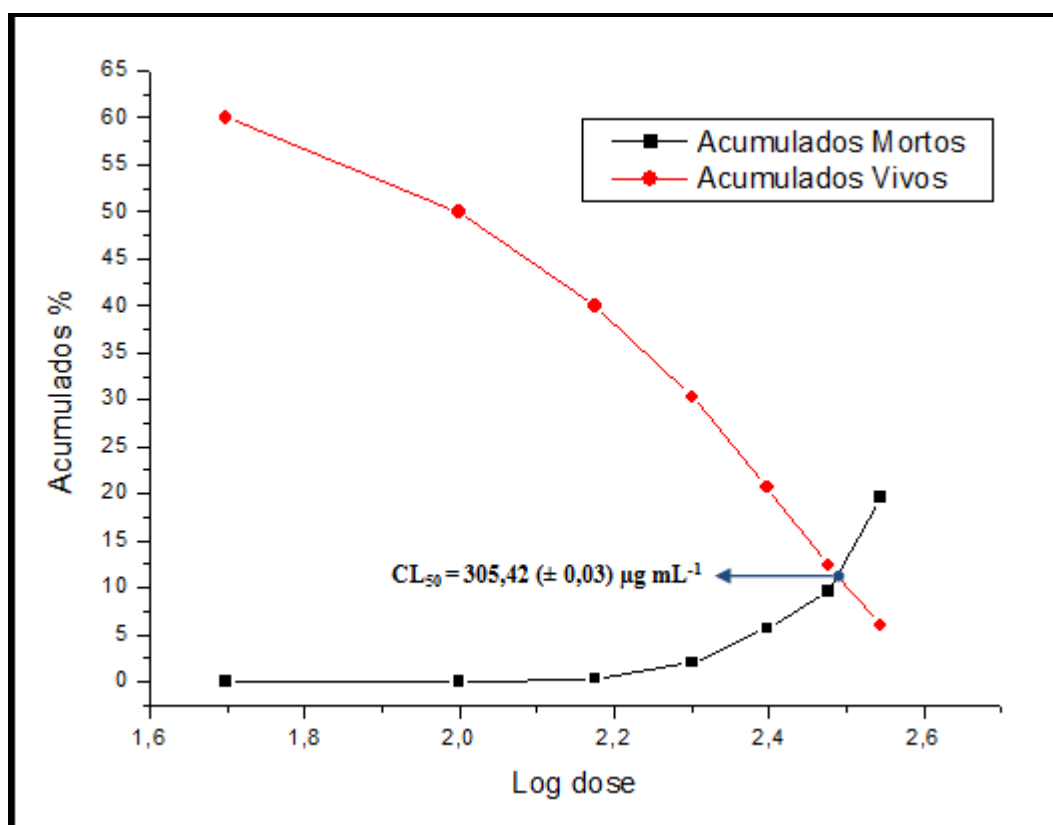


Figura 27. Estimativa da CL_{50} do padrão de linalol pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL_{50} é o ponto de interseção das duas curvas.

Observando-se a Figura 27 percebe-se que o valor encontrado está próximo ao Log dose 2,501 (entre as concentrações de 200 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O resultado obtido foi o valor de concentração 305,42 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com intervalo de confiança de 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para mais ou para menos, ou seja, CL_{50} de 305,42 ($\pm 0,03$) $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para o padrão de eugenol, componente majoritário do óleo essencial da espécie *Pimenta dioica* Lindl, a atividade larvicida foi testada nas mesmas cinco concentrações em que a mistura dos óleos essenciais foram testadas, sendo n o número de larvas do mosquito *Aedes aegypti* utilizadas no ensaio para cada concentração, num total de 10 larvas por ensaio.

De forma análoga, o padrão de eugenol foi testado para cada concentração em quintuplicata. Os dados sobre o número de larvas vivas e de larvas mortas foram encontrados através de uma média das cinco repetições para cada uma das quatro concentrações testadas (Tabela 5).

Tabela 5. Mortalidade das larvas do *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição em quatro concentrações do padrão de eugenol.

Dose, $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Log dose	Mortos	Vivos	Acumulados Mortos	Acumulados Vivos	Mortali- dade, %
120	2,079	10	0	22,667	0,667	100
100	2	9,333	0,667	12,667	8,000	93,33
70	1,845	2,667	7,333	3,334	15,333	26,67
50	1,699	0,667	9,333	0,667	16	6,67

Número de larvas (n = 10).

Analisando-se a Tabela 5 verifica-se que para o padrão de eugenol, a concentração de $50\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou baixa atividade larvicida. A concentração de $120\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou a maior atividade larvicida, provocando a morte de 100% dos indivíduos testados.

A Taxa de percentagem da mortalidade das larvas frente o padrão de eugenol é mostrada na Figura 28, apresentando 100% de mortalidade no Log dose 2,079 (concentração $120\mu\text{g mL}^{-1}$).

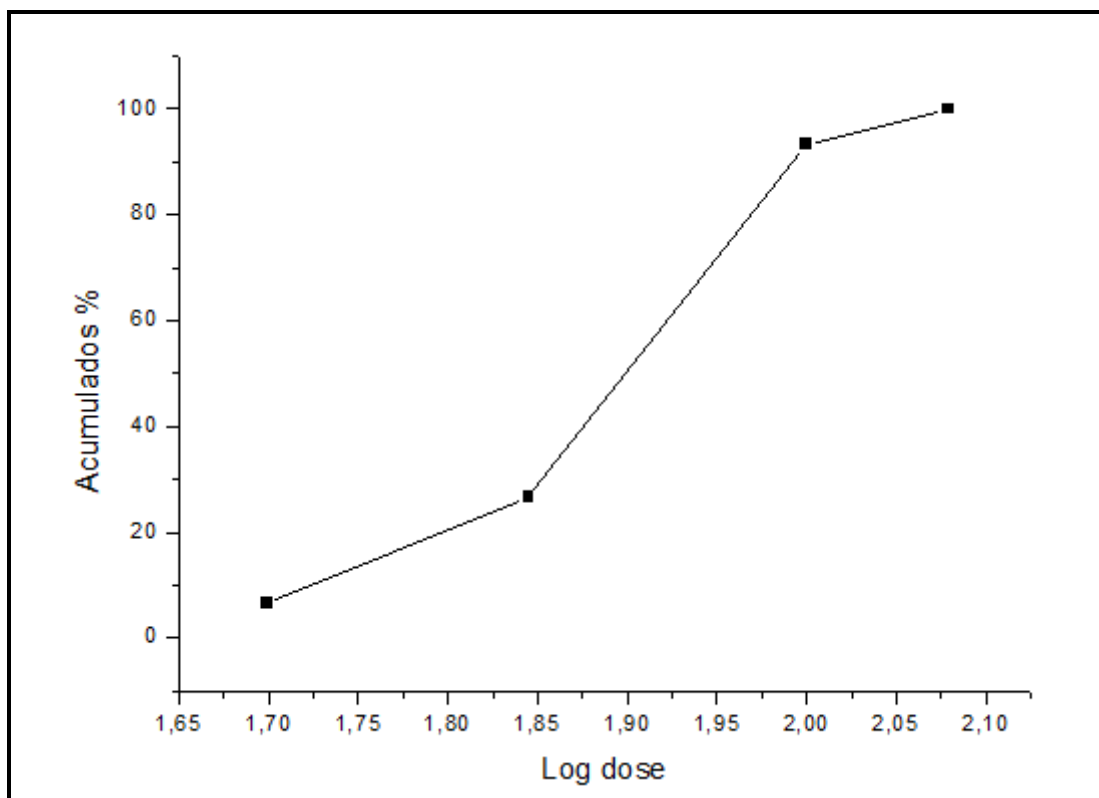


Figura 28. Taxa de Mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* expostas a quatro concentrações diferentes do padrão de eugenol, após 24 horas.

Partindo-se dos valores da Tabela 5 foi possível calcular a Concentração Letal 50% para o padrão de eugenol (CL_{50}). A Figura 29 mostra a estimativa de CL_{50} pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada, tendo sido a concentração letal 50% (CL_{50}), o ponto de interseção das duas curvas.

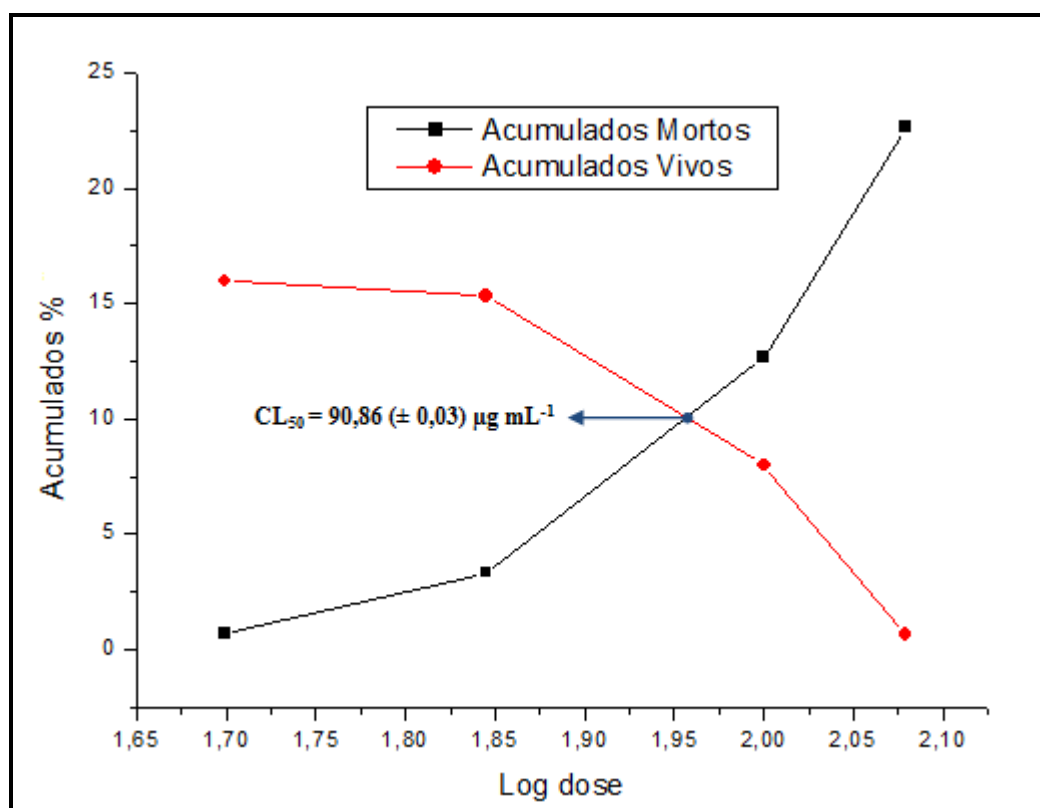


Figura 29. Estimativa da CL_{50} do padrão de eugenol pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL_{50} é o ponto de interseção das duas curvas.

Observando-se a Figura 29 percebe-se que o valor encontrado está próximo ao Log dose 1,980 (entre as concentrações de 70 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O resultado obtido foi o valor de concentração 90,86 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com intervalo de confiança de 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ou seja, CL_{50} de 90,86 ($\pm 0,03$) $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Percebe-se que a mistura dos óleos essenciais das folhas de *Pimenta dioica* Lindl e dos galhos de *Aniba duckei* Kostermans bem como o padrão de eugenol e linalol demonstraram possuir atividade larvicida contra o *Aedes aegypti*. Contudo, a mistura dos óleos essenciais apresentou melhor resultado que o padrão de linalol e próximo ao valor registrado para o padrão de eugenol, indicando que os demais componentes colaboraram para eficácia da mistura como larvicida.

Para qualificar o grau de atividade larvicida da mistura dos óleos essenciais e dos padrões de eugenol e linalol, consideraram-se alguns parâmetros.

No Brasil, os agentes da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA, 2002), órgão do Governo Federal, aplicam o inseticida temefós, numa concentração de 100 mg L^{-1} nos locais que servem de criadouros para larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Nessa concentração, obtém-se taxa de mortalidade de 100%, para o inseticida organofosforado temefós.

Dessa forma, o uso de solução da mistura dos óleos essenciais da *Pimenta dioica* Lindl e do *Aniba duckei* Kostermans além de não agredir o meio ambiente, proporciona ainda uma fonte de renda para famílias que vivem próximas as plantações dessas plantas, sem que haja destruição das árvores para obtenção do óleo essencial, como foi demonstrado neste trabalho com a extração do óleo essencial do *Aniba duckei* a partir dos galhos, diferentemente da indústria de cosméticos que as extraem do tronco dessa árvore.

Capítulo 6

Conclusão

O estudo analítico e avaliação da atividade larvicida da mistura dos óleos essenciais das folhas de *Pimenta dioica* Lindl e dos galhos de *Aniba duckei* Kostermans concluem-se o que se segue.

- As folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl e os galhos da espécie *Aniba duckei* Kostermans forneceram óleos essenciais que ao serem misturados apresentaram similaridade com os parâmetros físico-químicos dos óleos essenciais de cada espécie isoladas.
- A técnica espectrométrica de UV-Vis usada para a caracterização da mistura dos óleos essenciais apresentou resultado satisfatório, quando comparados aos seus padrões, no que diz respeito as suas absorbâncias.
- A atividade larvicida da mistura dos óleos essenciais das folhas da *Pimenta dioica* Lindl com os galhos do *Aniba duckei* Kostermans frente ao mosquito *Aedes aegypti* L. sugere que essas plantas podem oferecer uma alternativa natural e de baixo custo no combate ao dengue. Os resultados com esta mistura são promissores na busca de larvicidas naturais (CL_{50} de $113,95 \pm 2,11 \mu\text{g.mL}^{-1}$).
- As atividades larvicidas dos padrões de eugenol (CL_{50} de $90,86 \pm 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$) e linalol (CL_{50} de $305,42 \pm 0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$) componentes majoritários dos óleos em estudo, apresentaram respectivamente valores de CL_{50} menor e maior que a mistura dos óleos essenciais (CL_{50} de $113,95 \pm 2,11 \mu\text{g.mL}^{-1}$), demonstrando uma maior eficiência do constituinte eugenol.

Capítulo 7

Perspectivas de Trabalhos Futuros

- Testar a atividade larvícida da mistura de óleos essenciais da folha da *Pimenta dioica* Lindl com os galhos do *Aniba duckei* Kostermans em outras proporções, tais como 2:1, 1:2, 3:1, e 1:3.
- Promover a metilação do eugenol e linalol, principais constituintes dos óleos essenciais da *Pimenta dioica* Lindl e do *Aniba duckei* Kostermans, respectivamente, na perspectiva de se obter o metileugenol e metilinalol e testá-los como agentes larvicidas.
- Desenvolver uma forma farmacêutica, onde a mistura de óleos essenciais das folhas da *Pimenta dioica* Lindl com os galhos do *Aniba duckei* Kostermans possa atuar como princípio ativo de um agente larvícida.
- Executar testes específicos à mistura dos óleos essenciais das folhas da *Pimenta dioica* Lindl com os galhos do *Aniba duckei* Kostermans para desenvolver vários produtos de limpeza ou em cosméticos.

Capítulo 8

Referências Bibliográficas

ADAMS, RP 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy. 2nd edition, Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/registro_fitoterapicos.pdf>. Acessado em abr/2008

ARBOVIRUS. Aedes aegypti: pupa. Disponível em: <http://www.arbovirus.health.nsw.gov.au/areas/arbovirus/mosquit/photos/aedes_aegypti_pupa.jpg> Acessado em: 15 abr. 2009.

ARIDOGAN, B.C. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. Arch. Pharm. Res., 25:6, 860-864, 2002.

BARROSO, G. M. et al. Sistemática das Angiospermas do Brasil. v.I. São Paulo: EDUSP, 1978. 255p.

BAUER, A.W; KIRBY, W.M.M; SHERRIS, J.C; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology. Philadelphia, v.45, p.493-496, 1966.

BIOSAPIENS. Pau rosa - Aniba roseodora Ducke. Disponível em: <http://www.biosapiens.com.br/index_0312.php> Acesso em 22 fev. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Dengue. 2009a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Taxa de incidência de dengue. Brasil e Grandes Regiões, 1990-2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/graficotaxa_incidencia_dengue.pdf>. Acessado em 10 abr. 2009b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Casos de dengue caem 28,6% no Brasil. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=10066>. Acessado em 10. Abr. 2009c.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94:223-253, 2004.

CAMPOS, Janaína Abrantes. Estudos analíticos do óleo essencial extraído da espécie *Aniba duckei* Kostermans e sua aplicação em perfume. São Luís. 2003, 68f. Monografia (Graduação em Química Industrial) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís/MA, 2003.

CARVALHO, L.A.F.; SILVA, I.G. Avaliação longitudinal da atividade do *Temephós* a 1% sobre o *Aedes aegypti* (Lin, 1762). *Entomologia y vectores*, 7:191-201, 2000.

CDC, Centers for Disease Control and Prevent. Division of vector-borne infections diseases. Dengue fever. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue>>. Acessado em: 10 abr. 2009.

CHAAR, J.S; ALBUQUERQUE, L. Óleo do pau rosa mata larvas do *Aedes aegypti*. *Ciência Hoje On-line*, 23/01/2004. Disponível em: <<http://www2.uol.com.br/cienciahoje/chdia/n987.htm>> Acesso em 1º maio 2004.

CHAAR, Jamal da Silva. Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans. São Carlos, 2000. 150p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos/SP, 2000, 150p.

CHANG, S.T; CHEN, P.F; CHANG, S.C. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, n.77, p.123-127, 2001.

CHENG, S. et al. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. *Bioresource Technology*. 100:452–456, 2009.

COLEGATE, S.M.; MOLYNEUX, R.J. *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, an Structural Determination*. Boca Raton: CRC, 1993.

CONSOLI, R.; OLIVEIRA, R.L. *Principais mosquitos de importância sanitária do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.

CORRÊA, M.P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. V. 3.

CORREA, M.P. *Dicionário das plantas úteis e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926-1978. 4.v.

COSTA SOBRINHO, J.R.S. Estudo analítico e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído das folhas da *Pimenta dioica* L. São Luís, Programa de Pós-Graduação em Química, UFMA, 2008. Dissertação de Mestrado, 95p.

COSTA, C. M. G. R.; SANTOS, M. S.; BARROS, H. M. M.; AGRA, P. F. M. e FARIAS, M. A. A. Óleo essencial de citronela no controle da bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora*. *Tecnol. & Ciên. Agropec.*, 2(2): 11, 2008.

- COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L. SANTOS, N. K. A.; CARDOS, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Rev. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. Rev. Bras. Farmacognosia, 15(4): 304, 2005.
- CRACKER, L.E.; SIMON, J.E. Herbs, Species and Medicinal Plants. Phoenix: Onyx, 1987. v.1. 329 p.
- CRAVEIRO, A.A. et al. Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste. Fortaleza: EUFC, 1981. 210p.
- CRONQUIST, A. The Evolution and classification of flowering plants. 2ed. New York: New York Botanical Garden, 1988. 517p.
- DUKE, J. A.; BOGENSCHUTZ-GODWIN, M. J.; DUCCELLIER, J. Handbook of Medicinal Spices. 2 ed. Florica: ORC, p. 245., 2002.
- FALKENBERG, M. de B.; SANTOS, R. I. dos; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, M. O. et al. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/Ed. da UFSC, 1999.p.163-179.
- FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3 ed. Florianópolis: UFSC, p. 199-222, 2001.
- FIOCRUZ. *Aedes aegypti*: ovos. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/media/memo_dengue2.jpg> Acessado em: 15 abr. 2009.
- FUNASA. Direção do Centro Nacional de Epidemiologia. Plano de intensificação das ações de prevenção e controle da Febre Amarela. Brasília, jul. 2002.
- FURTADO, R.F. et al. Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Neotropical Entomology, 34:5, 843-847, Sep.-Oct. 2005.
- GILL, A. O., HOLLEY, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. International Journal of Food Microbiology 108 (2006) 1 – 9.
- GLUBER, D. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti-boe disease controli* in the 1990's: top down or bottom up. Am. J. Trop. Med. Hyg., 40, 571-578, 1989.
- GONZAGA, A.D. et al. Toxicity of cassava manípueira (*Manihot esculenta* Crantz) and erva-de-rato (*Palicourea marcgravii* St. Hill) to adults of *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae). Acta Amazonica, 38:1, 101-106, 2008.
- GONZÁLEZ DE COSÍO, M. Especies vegetales de importancia económica en México. México: Porrúa, 305 p., 1984.
- GOTTIEB, O. R.; KAPLAN, M.A. Amazônia: Tesouro químico a preservar. Ciência Hoje, 1990. v.11, n.61, p. 19-21.

GUALTIERI, F. et al. Dinâmica Molecular das Interações de Novos Análogos da Tacrina (THA) com a Acetilcolinesterase (AChE). II Fármaco, 50, 489-503, 1997.

GUENTHER, E. The essential oils. Individual essential oils of the plant families Gramineae, Lauraceae, Burseraceae, Myrtaceae, Umbelliferae and Geraniaceae. New York: D. Van Nostrand, 1950. v.4.

GUZMÁN, M. G., KOURI, G. Dengue: an update. Lancet Infectious Diseases, 2, 32-42, jan. 2001.

HAMMER, K. A. et al. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of applied Microbiology, v.86, 1999. p. 985-999.

KAEMPGEN, D. Fed. Rep. Ger. Eugenol-isoeugenol mixtures para treatment of Aids. Ger. Offen. De, 3829200:A1., Mar 1, 1990.

KALIL FILHO, A.N. Conservação de gimnospermas de plantas aromáticas e medicinais da Amazônia brasileira para uso humano. Manaus: EMBRAPA, Comunicado Técnico, n.50, 2000.

KIM, J., MARSHALL, M. R. e WEI, C. Antibacterial Activity of Some Essential Oil Components against Five Foodborne Pathogens. J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 2839-2845.

KIM, S. et al. Inhibition of immediate allergic reaction by eugenol. Yakhak Hoechi, v.40, n.6, p.679-683, 1996.

KOBAYSAHI et al. Eugenol and isoeugenol dimmers as bactericides, fungicides and inflammation inhibitors. Kibun Food Chemical Co., Ltd., Japan. JP 09176074 A2. Jul. 8, 1997.

KOBAYSAHI, R. Eugenol and isoeugenol dimmers as bactericides, fungicides and inflammation inhibitors. Kibun Food Chemical, 09176074:A2., Jul. 8, 1997.

LOPEZ, A.B; CAPÓ, J.T; GONZÁLEZ, Y.C. Actividad analgésica y antipirética de un extracto fluido de Pimenta dioica L. y evaluación de su toxicidad aguda oral. Rev. Cubana Farm. v.32, n.3, p.198-203, 1998.

MARINHO, S. C. Caracterização química e avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais das espécies Pimenta dioica Lindl, Aniba duckei Kostermans e Zingiber officinale Roscoe. São Luís, 2005. 111f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal do Maranhão. 2005.

MARINO, M. et al. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. International Journal of Food Microbiology, v.67, 2001. p.187-195.

MARQUES, C. A. Importância Econômica da Laurácea Lindl. Floresta e Ambiente, v.8, n.1, p.195-206, jan./dez 2001.

MINOTT, D. A.; BROWN, H. A. Differentiation of fruiting and non-fruiting *Pimenta dioica* (L.) Merr. Trees Based on Composition of Leaf Volatiles. *J. of Essential Oil Research: JEOR*, Jul 2007. Disponível em: <http://findarticles.com/p/articles/mi_qa4091/is_ai_n19434097>. Acessado em: 04 outubro 2008.

MONTEIRO, O. dos S. Caracterização do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl e sua aplicação como atrativo de abelhas euglossina. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

MONTEIRO, Odaír Santos. Estudo Analítico do eugenol contido no óleo essencial extraído dos frutos da espécie *Pimenta dioica* Lindl e sua aplicação como agente bactericida. (Mestrado em Química Analítica). Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2004.

MOUCHREK FILHO, V. E. Estudos Analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl. São Carlos. 2000, 124p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, USP.

MOUCHREK FILHO, V. E. Introdução à Química de Óleos Essenciais. São Luís, 2001. 72p. Apostila.

MYINT, S. et al. Gas chromatographic determination of eugenol in ethanol extract of cloves. *J. Chromatogr.*, v. 679, p.193-195, 1996.

NASCIMENTO, Adenilde Ribeiro. Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente a bactérias isoladas de sururu (*Mytella falcata*). Lavras. 2004, 91f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Federal de Lavras/MG, 2004.

NEVES, D.P. Parasitologia Humana. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

NUEVA DISTRIBUCIÓN DE DISCOGRAMAS BRITANIA. Disponível em: <http://www.britanialab.com/espanol/k07_01.html> Acesso em: 23 de maio de 2007.

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. *Rev. Eletrônica de Enferm.* 10(1): 189, 2008.

OMS apóia estudo com plantas medicinais. Disponível em: <http://www.drashi/fitoterapia_oms_apoia_estudos_com_plantas_medicinais.ht> Acesso em: 18 abr. 2007.

PARK, I.-K. e SHIN, S.-C. Fumigant Activity of Plant Essential Oils and Components from Garlic (*Allium sativum*) and Clove Bud (*Eugenia caryophyllata*) oils against the Japanese Termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 4388-4392.

PINO, J.; ROSADO, A.; GONZALEZ, A. Analysis of the essential oil of pimento berry (*Pimenta dioica*). *Nahrung.*, v.33, n.8, p. 717-720, 1989.

PIZARRO, A.P. et al. Aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquito. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32, 23-29, 1999.

- PIZZI, M. Sampling variation of the fifty percent end-point, determined by the Reed-Muench (Behrens) Method. *Human Biol.*, 22, 151-190, 1950
- POHLIT, A.M. et al. Screening of plants found in the state of Amazonas, Brazil for activity against *Aedes aegypti* larvae. *Acta Amazonia*, 34:01, 97-105, 2004, Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 1999. p. 163-179.
- PORTO, K.R.A. et al. Atividade larvícida do óleo de *Anacardium humile* Saint Hill sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41:6, 586-589, nov.-dez. 2008.
- REBÊLO, J.M.M. História natural das euglossíneas. As abelhas das orquídeas. São Luís, Lithograf, 2001. 152p.
- RODRIGUES, F.E.A. et al. Estudo químico e avaliação da atividade larvícida sobre *Aedes aegypti* de óleos essenciais de *Stemodia maritima* Linn (Scrophulariaceae). *Anais da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Águas de Lindóia, jun. 2007.
- RODRIGUEZ, M. et al. Antimicrobial activity of *Pimenta dioica*. *Alimentaria*, v.33, n.8, p. 107-110, 1996.
- RODRÍGUEZ, M.G.Q. et al. Uso de la crema repelente de *Pimenta dioica* por combatientes de una unidad militar. *Rev. Cubana Med. Milit.*, 26:2, 94-97, 1997.
- ROJO, L. et al. From natural products to polymeric derivatives of Eugenol: a new approach for preparation of dental composites and orthopedic bone cements. *Biomacromolecules*, 7, 2751-2761, 2006.
- SANTOS, A C. Triagem de extratos de plantas para o controle de vetores de doenças tropicais e estudo fitoquímico da *Annona montana* Mucfadyen. Fevereiro, 2003.
- SANTOS, A. C. A.; SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. Estudos de processos de extração de óleos essenciais e bioflavonóides de frutas cítricas. 1. ed. Caxias do Sul: EDUCS. v. 1. 112 p., 2003.
- SANTOS, Leila Márcia. Caracterização e avaliação da atividade bactericida do óleo essencial e do óleo acetilado da espécie *Aniba duckei* Kostermans. São Luís, 2004. 100fl. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2004.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, M.O. et al. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 1999. p. 291-320.
- SIANI, A.C. et al. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, 16, ano 3, set./out. 2000.

SILVA, A. F.; BARBOSA, L. C. A.; SILVA, E. A. M.; CASLI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit, (Lamiaceae). *Rev. Bras. Pla. Med.*, 6: 1, 2003.

SILVA, H.H.G. Adaptação do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em criadouros artificiais com água poluída. *Entomologia y Vectores*, 6, 383-391, 1999.

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

SILVA, H.H.G. et al. Estudo comparativo de eficiência das técnicas de ultra baixo volume (UBV) e termonebulização (FOG) no controle de *Aedes aegypti*. *Informe Epidemiológico do Sistema Único de Saúde*, 10, 45-46, 2001.

SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G. Influência no período de quiescência dos ovos sobre o ciclo evolutivo de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Díptera culicidae) em condições de laboratório. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32, 349-355. 1999.

SILVA, W.J. Atividade larvicida do óleo essencial de plantas existentes no Estado de Sergipe contra *Aedes aegypti* Linn. São Cristóvão-SE, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, UFSE, 2006. Dissertação de Mestrado, 81p.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 490p., 2007.

SILVERSTEIN, R.M. et al. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SIMAS, N.K. et al. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilterpenóides. *Química Nova*, 27:01, 46-49, fev. 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M.; et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, cap. 18, p.467-495, 2003.

SIMÕES, M.O. et al. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 1999.

SOARES, A.C. Se bem não fizer, mal também não fará. *Revista Eletrônica de Ciências*. n.12, out. 2002. Disponível em: < http://www.cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/art_12/medicamento.html > Acesso em 18 abr. 2007.

SOARES, A.C. Se bem não fizer, mal também não fará. *Revista Eletrônica de Ciências*. n.12, out. 2002. Disponível em: < http://www.cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/art_12/medicamento.html > Acesso em 18 abr. 2007.

SOBRINHO, Joao Reis Salgado. Estudo analítico do óleo essencial extraído das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl. e sua aplicação como agente bactericida. (Mestrado em Química Analítica). Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2007.

SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. *J. ethnopharmacol.*, v. 51, p. 1-15, 1996 apud NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, M.O. et al. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 1999.

SOUSA, E. R.; MARQUES, E. P.; FERNANDES, E. N.; ZHANG, J.; MARQUES, A. L. B. Graphite electrodes modified by 8-hydroxyquinolines and its application for the determination of copper in trace levels. *J. Braz. Chem. Soc.*, 17(1): 177, 2006.

SOUSA, M.C. Estudos analíticos do óleo essencial dos frutos da espécie *Pimenta dioica* Lindl e sua aplicação como atrativo de insetos (feromônio). São Luís. 2003, 99f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís/MA, 2003.

SRINIVASAN, D; NATHAN, S; SURESH, T; PERUMALSAMY, P.L. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. n.74, p.217-220, 2001.

SUDAM (1972) O extrativismo do Pau-rosa, *SUDAM Documentos Amazônicos*, 5-55

SYDOW, E. Mass spectrometry of terpenes II. Monoterpene alcohols. *Acta Chemical Scandinavica*. v.17, p.2504-12, 1963.

TAUIL, P.L. Urbanização e Ecologia do Dengue. *Caderno de Saúde Pública*, 17, 99-102, 2001. Suplemento.

TELES, R.M. Caracterização química e estudo larvicida dos óleos de *ANiba duckei* Kostermans contra *Aedes aegypti*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2009. Tese de Doutorado, 110p.

TELES, Rogério de Mesquita. Estudo analítico do linalol contido no óleo essencial extraído de galho da espécie *Aniba duckei* kostermans e sua aplicação como agente bactericida. São Luís. 2003, 99f. Dissertação(mestrado em Química) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís/MA, 2003.

TOURIYA, B. et al. Application of a two levels factorial design to the study of the antimicrobial activity of three terpenes. *Sci. Aliments.*, 15:6, 571-578, 1995.

UCLA. Library. Spice images. Disponível em: <[http://unitproj1.library.ucla.edu/biomed/spice/images/ALLSPICE\(PIMENTO\).jpg](http://unitproj1.library.ucla.edu/biomed/spice/images/ALLSPICE(PIMENTO).jpg)> Acessado em: 7 fev. 2009.

UGAZ, O. L., *Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de produtos naturales*. Lima, Fondo Editorial de la Pontificia de la Universidad Católica del Perú, 1994, p. 23 - 42.

ULTEE, A. et al. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied Environment Microbiology*, v.65, 1999. p.4606-4610.

VALERO, M. e GINER, M. J. Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, 108 (2006) 1 – 9.

VÁZQUEZ, B. I. et al. Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 67, p. 157-163, 2001.

WERFF, H. et al. Toward and improved classification of Lauraceae. *Annals of Missouri Botanical garden*. V. 8, p. 419 – 432, 1996.

WHO, World Health Organization. International travel and health. 2009 edition. Disease distribution maps: Dengue. Disponível em: <<http://www.who.int/ith/en>>. Acessado em: 10 abr. 2009.

WIKIMEDIA. *Aedes aegypti*: larva. Disponível em: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/95/Aedes_aegypti_larva.jpg> Acessado em: 15 abr. 2009.

WIKIMEDIA. *Pimenta dioica*. Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Pimenta_dioica_flowers.jpg>. Acessado em: 25' out 2008.

APÊNDICE

APÊNCIDE 1

G L O S S Á R I O

Carminativa – agente que alivia a flatulência e a cólica, impedindo a formação de gases no tubo digestivo ou lhes facilitando a eliminação.

Deterrentes – relativo à identificação de um gene que controla a produção de substâncias que são prejudiciais a nutrição dos insetos.

Dispepsia – (do grego *dyspepsía* - "δυσ-" <Dys->, significando ruptura ou dificuldade, e "πέψη" <Pepse>, que significa digestão) é como, na Medicina, é chamada a dificuldade na digestão dos alimentos - vulgarmente chamado de indigestão. É um mal que pode ser esporádico e passageiro, mas que também pode ser crônico e apresentar necessidade de terapias medicinais.

Estomáquicas – relativo ao estimulante da digestão.

Exsicar – fazer secar, evaporar até à secura.

Flatulência – (do latim *flatus*, sopro) é uma ventosidade anal que pode ser ruidosa ou não e tem um cheiro fétido. Tem origem dos gases que são ingeridos juntamente com a comida e, minoritariamente, dos gases acumulados durante o processo de digestão dos animais, na etapa de decomposição dos resíduos orgânicos dentro do intestino. Um desses processos é a fermentação de carboidratos por bactérias. A intensificação da flatulência pode ocorrer em pessoas ansiosas, que falam ao comer ou que comem muito depressa, ou em pessoas que sofrem de parasitoses intestinais.

Flavorizantes – relativo às substâncias (naturais ou sintéticas) ou misturas que adicionadas a um alimento ou medicamento lhes conferem um sabor característico.

Fumigantes – a fumigação é um método de controle químico de pragas no qual são utilizados defensivos agrícolas: os fumigantes.

Fusifforme – a um objecto ou organismo em forma de **fuso** (antigo instrumento usado para fiar), ou seja, alongado e com as extremidades mais estreitas que o centro; elipsóide alongado.

Hematofágica – trata-se da utilização preferencialmente de depósitos artificiais de água limpa para colocar seus ovos, embora já tenha sido observado também em ambientes poluídos, sendo que estes se mantêm viáveis na ausência da água por até 450 dias.

Lipofílica – tem afinidade e é solúvel em lipídios. Substâncias lipofílicas são também hidrofóbicas, ou seja, não são solúveis na água.

Mesonoto – é revestido em todas as suas porções por escamas lanceoladas branco-sujas esparsas, que deixam claros aos lados da porção anterior da faixa negra mediana e das faixas laterais. Mesonoto castanho-escuro, com uma faixa negra longitudinal e mediana, que se termina na parte posterior em uma mancha semi-circular da mesma cor. Esta faixa é ladeada, na metade posterior, por duas faixas negras. Ao lado externo da extremidade anterior de cada uma destas faixas ha uma mancha igualmente negra e arredondada.

Odoríferas – a maioria das moléculas sentidas através do olfato, e que são chamadas odoríferas, é formada por compostos vegetais (frutos e flores), outros compostos resultantes do apodrecimento animal e vegetal, ou os produzidos por certas glândulas de animais, que servem como uma espécie de sinalizador. Através dos cheiros os bichos podem reconhecer e localizar alimentos, fugir de animais predadores e encontrar parceiros para o acasalamento. Nessa hora, os animais liberam uma secreção com algumas substâncias que atraem o parceiro, como os feromônios, por exemplo

Organolépticos – relativo a todas as propriedades que podem ser percebidas com os sentidos humanos, que são a visão, audição, olfato.

Percolação – em química percolação é a extração exaustiva de um princípio ativo.

Quiescência – as condições desfavoráveis do meio determinam o chamado estado de quiescência, que se manifesta sob duas formas: estivação e hibernação. A estivação é uma parada do desenvolvimento que acontece quando a temperatura é muito elevada e a umidade muito pequena. Os ovos de mosquitos postos em lugares secos permanecem quiescentes até que a chuva venha encher as cavidades em que se encontram. A pirambóia, peixe pulmonado do norte brasileiro, habita rios e pântanos que se dessecam periodicamente. Durante a seca, o peixe vive enterrado e envolvido por um casulo formado pela secreção e endurecimento de muco. Na parte superior do casulo existe uma abertura de onde parte um tubo que penetra na boca do animal, o qual, graças ao seu pulmão, vive respirando o ar atmosférico. Durante o processo de estivação, o animal utiliza para a nutrição gorduras acumuladas em torno dos órgãos. Como o metabolismo é reduzido, o animal excreta diminuta quantidade de uréia que se acumula no sangue e é eliminada quando o peixe volta à vida ativa. A hibernação é provocada por baixas temperaturas e consiste num sono profundo provocado pela redução das atividades vitais. Morcegos e hamsters são mamíferos que hibernam nas estações frias, obtendo energia a partir das gorduras armazenadas.

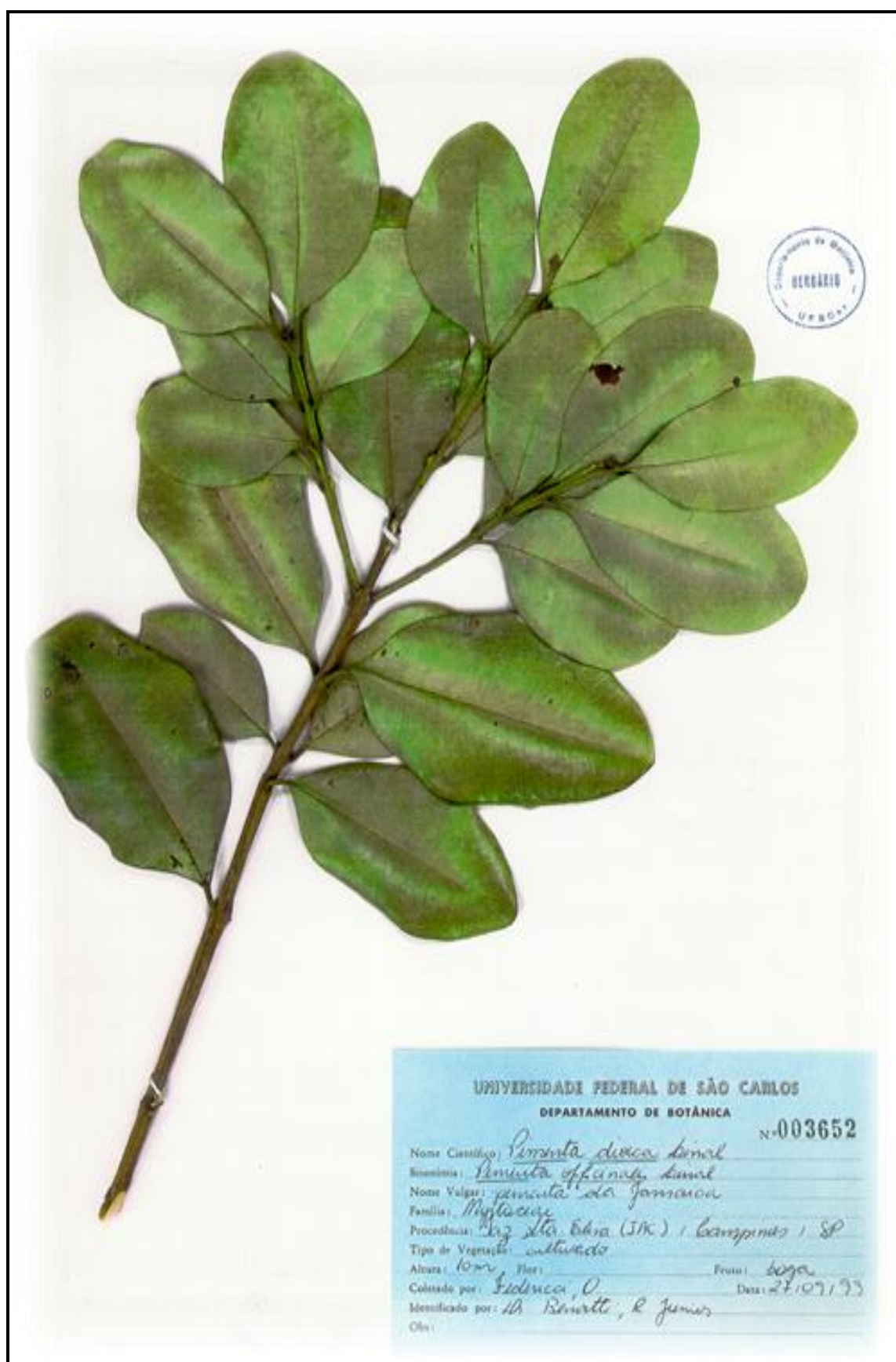
Repasto Sangüíneo – é o ato do inseto se alimentar de sangue diretamente do animal.

Segmentos Tarsais – todo inseto adulto possui 6 pernas (hexápodos), sendo que um número variável de "falsas pernas" (pseudópodos) abdominais pode ocorrer nas formas jovens, como é o caso de lagartas. A perna típica de um inseto é composta de 5 partes coxa, trocanter, fêmur, tíbia e tarso. O número de segmentos tarsais (tarsômeros) em geral varia de 1 a 5, e este número tem grande importância sistemática.

Sorotipos DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 – Em 1930, demonstrou-se a ocorrência de transmissão experimental da doença, entre humanos voluntários, tendo esse mosquito como vetor (SIMMONS e col. 1931, citado por KNUDSEN 1986, p. 421). Foi isolado vírus DEN-2 dessa espécie em Cingapura, em período de epidemia de dengue (RUDNIK E CHAN 1965 citado por KNUDSEN 1986, p. 421). Durante o período que compreendeu os anos de 1966 e 1968, isolou-se o vírus DEN-2 do *Ae. albopictus*, em Cingapura. Naquela oportunidade, circularam os vírus DEN-1 e DEN-2, considerados os responsáveis pela epidemia de dengue. Ambos os vírus foram isolados do *Ae. albopictus* e, apenas o DEN-2, do *Ae. aegypti*.

Vetores – é uma molécula de DNA em que o fragmento de DNA a ser clonado é ligado. Este vetor de ter um gene de resistência a antibióticos, se replicar com autonomia e possuir sequência reconhecida por endonuclease de restrição.

APÊNCIDE 2



Exsicata da *Pimenta dioica* Lindl, depositada no Herbário da Universidade Federal de São Carlos.
Fonte: Mouchrek Filho (2000).