

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

LEANDRA SOFIA DOS SANTOS MENDES

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE LARVICIDA FRENTE AO *Aedes aegypti*
DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Cinnamomum zeylanicum* Breyn
(CANELA)**

São Luís

2011

LEANDRA SOFIA DOS SANTOS MENDES

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE LARVICIDA FRENTE AO *Aedes aegypti*
DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Cinnamomum zeylanicum* Breyn
(CANELA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFMA como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho

São Luís

2011

Dedico este trabalho:

A **Deus**, ser supremo e responsável por me dar forças para vencer todos os momentos difíceis de minha vida, levando-me a alcançar várias vitórias para minha realização.

Minha mãe, **Doris Maria Araujo dos Santos**, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos de minha vida, me propiciando momentos de extrema realização...

Meu pai, **José Ribamar Campos Mendes**, que me propiciou meios e oportunidades para aprimorar meus conhecimentos em busca de minha felicidade.

Minha filha, **Rayanne Sofia Mendes Cunha**, pedaço representativo da minha vida; principal incentivo para a busca da realização dos meus sonhos.

“O adestramento do homem para o trabalho sempre foi e será uma das mais importantes tarefas da administração industrial. Torna-se uma condição essencial para a conquista da boa produtividade”.

Giroletti

AGRADECIMENTOS

A DEUS, que em todos os momentos de minha vida, sempre me mostrou uma luz para a realização de meus sonhos;

Aos meus pais, Doris Maria dos Santos Mendes e José Ribamar Campos Mendes, por me incentivarem e me darem as condições necessárias para a chegada deste momento especial;

À minha filha, Rayanne Sofia Mendes Cunha, que me deu a oportunidade de ir à frente à busca de todas as minhas realizações;

À minha segunda mãe, Maria de Jesus Freire, que sempre acreditou e me deu forças para alcançar os meus objetivos;

Ao meu irmão, Leandro José Dos Santos Mendes, pelo incentivo;

Ao meu avô, Raimundo Nonato Batista dos Santos, por sempre se fazer presente em minha vida;

Ao meu padrinho, Francisco José Veras, por total incentivo e esforço para que alcançasse um de meus sonhos;

Ao Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho, orientador que com total dedicação e competência transmitiu com maestria os ensinamentos e segurança, necessários para a realização desta Dissertação.

A todos os professores do curso que de alguma forma contribuíram para a minha formação acadêmica;

Ao MSc. Marconiel Neto da Silva, que sempre acreditou e me incentivou para a realização desse sonho;

Ao meu vizinho, Paulo Joarez dos Santos Gomes, pela dedicação e incentivo para alcançar esse momento;

Aos grandes, queridos, amados e indispensáveis amigos;

À banca examinadora, por ter aceitado participar do meu trabalho, engrandecendo-o.

Aos amigos dos Laboratórios de Microbiologia e de Bromatologia do PCQA e a todos do Pavilhão Tecnológico da UFMA, especialmente à minha amiga Marlucy pelos cuidados e atenção dispensada.

Aos amigos e colegas do SESI, SENAI, IEL e da Federação das Indústrias do Estado do Maranhão (FIEMA), pelo apoio constante.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAPES, pela concessão da Bolsa.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	13
1 INTRODUÇÃO	14
CAPÍTULO 2	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Considerações sobre óleos essenciais	18
2.2 <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn (Canela)	21
2.3 Técnicas Analíticas	23
2.3.1 Cromatografia Gasosa (CG).....	24
2.3.2 Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (CG-EM).....	25
2.4 Aspectos sobre o mosquito <i>Aedes aegypti</i>	26
2.4.1 Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	28
CAPÍTULO 3	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 Geral	32
3.2 Específicos	32
CAPÍTULO 4	33
4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	34
4.1 Origem, Coleta e Preparo da Amostra Botânica	34
4.2 Identificação botânica	34
4.3 Extração do óleo essencial	35
4.4 Caracterização físico-química do óleo essencial	36
4.4.1 Densidade	36
4.4.2 Solubilidade em etanol (70%).....	36
4.4.3 Índice de refração.....	37
4.4.4 Cor e Aparência	37
4.5 Caracterização química	37
4.5.1 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).....	37
4.5.2 Quantificação do eugenol por Cromatografia Gasosa.....	38
4.6 Padrão	38

4.7 Atividade larvícida.....	39
4.7.1 Obtenção e cultivo das larvas	39
4.7.2 Teste de toxicidade	40
4.7.2.1 Análise Estatística	41
CAPÍTULO 5	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Extração do óleo essencial	44
5.1.1 Rendimento	44
5.1.2 Cinética	44
5.2 Caracterização físico-química do óleo essencial	45
5.3 Caracterização química	47
5.3.1 Identificação e quantificação dos constituintes do óleo essencial	47
5.4 Atividade larvícida.....	48
CAPÍTULO 6	58
6 CONCLUSÃO	59
CAPÍTULO 7	60
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	61
CAPÍTULO 8	62
REFERÊNCIAS.....	63

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AMDIS	Automated Mass Spectral Deconvolution Mass & Identification System
CG	Cromatografia Gasosa
CL ₅₀	Concentração Letal 50%
EM	Espectrometria de Massas
FUNASA	Fundação Nacional da Saúde
ISO	International Organization for Standardization
OMS	Organização Mundial de Saúde
ppm	Partes por Milhão
WHO	World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn (canela): árvore e folhas.	22
Figura 2. Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	26
Figura 3. Distribuição do <i>Aedes aegypti</i> no mundo em 2010: países ou áreas de risco.	27
Figura 4. Ovos do <i>Aedes aegypti</i>	28
Figura 5. Larvas do <i>Aedes aegypti</i>	29
Figura 6. Pupa do <i>Aedes aegypti</i>	29
Figura 7. Armadilha utilizada para a coleta dos ovos do <i>Aedes aegypti</i>	39
Figura 8. Larvas do <i>Aedes aegypti</i> em terceiro estágio.	40
Figura 9. Cinética referente ao rendimento de extração do óleo essencial da espécie <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn em função do tempo, com massa de 400g e temperatura de 100°C.	45
Figura 10. Cromatograma obtido na análise do óleo essencial das folhas da espécie <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn.	47
Figura 11. Taxa de mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> – expostas a quatro concentrações diferentes do óleo essencial da <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn, após 24 horas – versus o logaritmo de cada dose aplicada.	50
Figura 12. Estimativa da CL ₅₀ do óleo essencial da <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn 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.	51
Figura 13. Taxa de mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> expostas a seis concentrações diferentes do padrão de eugenol, após 24 horas.	53
Figura 14. 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.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físicas do óleo essencial extraído das folhas da <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn (canela).....	46
Tabela 2. Compostos identificados na amostra de óleo essencial de folhas da espécie <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn.	48
Tabela 3. Mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição em várias concentrações do óleo essencial extraído das folhas da espécie vegetal <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn.	49
Tabela 4. Mortalidade das larvas do <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição em várias concentrações padrão de eugenol.....	52

RESUMO

Na procura pelo controle químico alternativo contra o mosquito *Aedes aegypti*, diversas pesquisas são desenvolvidas e estimuladas no intuito de se descobrir novas substâncias inseticidas de origem vegetal. Neste trabalho, a partir da extração e do estudo analítico do óleo essencial das folhas de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela), foi analisado o efeito larvívica do óleo contra larvas em terceiro estágio do mosquito *Aedes aegypti*. Extraíu-se quantitativamente o óleo essencial das folhas por arraste à vapor. Determinaram-se as propriedades físico-químicas do óleo essencial (densidade, índice de refração, solubilidade, cor e aparência). Determinou-se os seus componentes por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. Quantificou-se o componente majoritário do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. Calculou-se a CL_{50} do óleo e do padrão, além do limite de confiança a 95% de probabilidade, a partir dos métodos de Reed-Muench (1938) e Pizzi (1950), respectivamente. O rendimento do óleo foi de 0,79% m/m. Foram identificados quatro componentes no óleo, e a presença majoritária do eugenol foi confirmada pela técnica analítica. A atividade larvívica do óleo apresentou mortalidade de 50, 60 e 100% em concentrações de 50, 60 e 100 ppm, respectivamente. O óleo essencial obteve CL_{50} de 56,49 ($\pm 2,25$) ppm e o padrão de eugenol 79,75 ($\pm 2,10$) ppm. Os resultados promissores indicam que o óleo essencial avaliado é composto por substâncias que juntamente com o componente majoritário eugenol propiciam maior efeito larvívica contra *Aedes aegypti*.

Palavras-Chave: Óleo essencial. Folhas. Canela. Atividade larvívica. *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

In the search for alternative chemical control against the *Aedes aegypti* mosquito, several studies are developed and encouraged in order to discover new substances of plant origin insecticides. In this work, the extraction and analytical study of the essential oil from leaves of *Cinnamomum zeylanicum* Breyne (cinnamon), we analyzed the effect of oil larvicide against third stage larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. The essential oil of leaves was extracted quantitatively by steam distillation. The physicochemical properties of essential oil (density, refractive index, solubility, color and appearance) were determined. It was determined the components by gas chromatography coupled to a mass spectrometer. We quantified the major component of essential oil by Gas Chromatography coupled to mass spectrometer. We calculated the oil and standard LC_{50} , besides the confidence limit at 95% probability, using the methods of Reed-Muench (1938) and Pizzi (1950), respectively. The oil yield was 0.79% m/m. We identified four components in the oil, and the majority presence of eugenol was confirmed by analytical technique. The oil larvicidal activity showed a mortality of 50, 60 and 100% at concentrations of 50, 60 and 100 mol L⁻¹, respectively. The essential oil obtained LC_{50} of 56.49 (± 2.25) ppm and the standard of eugenol 79.75 (± 2.10) mol L⁻¹. The promising results indicate that the appraised essential oil is consisted of substances that jointly with the major component eugenol provide greater larvicidal effect against *Aedes aegypti*.

Key-words: Essential oil. Leaves. Cinnamon. Larvicidal activity. *Aedes aegypti*.

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* é atualmente o mosquito que apresenta maior dispersão em áreas urbanas do planeta. Ele é um dos agentes (juntamente com *Aedes albopictus*) transmissores da dengue, doença considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um dos principais problemas de saúde pública no mundo, com grande incidência nas regiões tropicais do globo (WHO, 2011).

Trata-se de uma espécie de grande importância para a medicina, pois é o vetor de quatro sorotipos do flavivírus causador da dengue clássica e da febre hemorrágica da dengue. Portanto, é urgente que o controle da densidade populacional do *Aedes aegypti* ocorra para que a 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 do mosquito (BRASIL, 2009).

Atualmente, o controle é feito por meio de aplicações de inseticidas organofosforados e piretróides (BRASIL, 2009). Porém, o uso frequente e em doses cada vez maiores desses produtos tem evidenciado os principais problemas devido ao uso destes inseticidas: o aparecimento de populações resistentes de mosquitos a esses produtos e os danos ambientais provocados por seu uso intensivo (LUNA et al., 2004; CARVALHO; SILVA, 2000; POLANCZYK et al., 2003).

Por mais de 30 anos o organofosforado temephos foi o larvicida exclusivo usado no Brasil para o controle do *Aedes aegypti* (BARRETO, 2005). Contudo, está sendo paulatinamente substituído, e a razão é o desenvolvimento de grande resistência das larvas, que não mais estão sendo adequadamente controladas por este produto químico.

Dessa maneira, 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 meio ambiente. A resistência resulta no aumento da frequência de aplicação de inseticida, dosagens crescentes, rendimentos diminuídos, danos ambientais e surgimento de doenças, quando os vetores não podem ser controlados (SIMAS et al., 2004).

Produtos de origem vegetal são amplamente reconhecidos por sua diversidade química, como por sua considerável aplicação em diversas áreas,

incluindo a farmacêutica (PENIDO et al. 2005). Logo, as plantas oferecem uma fonte alternativa de controle porque contêm uma série de bioativos químicos.

Considerável número de pesquisas tem ressaltado a busca e o desenvolvimento de substâncias derivadas de diversas plantas para controle de mosquitos (LEYVA et al., 2009; CHENG et al. 2009; GERIS et al. 2008; MULLAI et al. 2008; PAVELA, 2008; CHAMPAKAEW et al. 2007; GLEISER; ZYGADLO 2007; SILVA et al. 2006; MENDONÇA et al. 2005; AMER; MEHLHORN, 2006a e 2006b; SILVA et al. 2006). Portanto, a procura por compostos larvicidas advindos de espécies vegetais, como os óleos essenciais extraídos de certas plantas, tem se intensificado na última década.

Esses extratos de plantas, chamados “óleos essenciais”, são misturas químicas complexas formadas, às vezes, por mais de cem componentes responsáveis, por exemplo, 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).

A espécie vegetal utilizada neste trabalho é conhecida da comunidade científica e alguns estudos realizados com o óleo essencial extraído das folhas, têm mostrado resultados interessantes. Contudo, não há relatos na literatura científica quanto ao uso do óleo essencial dessa espécie como agente larvicida, apesar de alguns trabalhos similares indicarem compostos de origem botânica com esse tipo de atividade e potencial para uso no controle de vetores (MARINHO, 2010; GONZAGA et al., 2008; SILVA et al., 2004; POHLIT et al., 2004; PARK et al., 2002; PIZARRO et al., 1999).

Para o Brasil, pesquisas nesta área têm grande significado. No país a dengue causa morte de muitas 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 o crescimento da doença e os prejuízos causados pela dengue no país, torna-se de suma importância a descoberta de novos materiais e desenvolvimento de métodos de combate ao seu vetor. Dessa forma, pelo fato de muitas plantas, por natureza, serem tóxicas para os mosquitos, os óleos essenciais podem representar uma saída eficiente para esse problema.

Nesse contexto, na busca por produtos naturais que possam ser usados como larvicidas contra *Aedes aegypti* no controle da dengue, foi testado o óleo essencial extraído das folhas de uma planta da flora brasileira, a *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, contra as larvas desse mosquito.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

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).

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 et al. (2007) afirmam que além dos óleos obtidos de plantas (fitogênicos), produtos sintéticos são encontrados no mercado. Esses óleos

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 et al. (2007), 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. (2007), é a volatilidade, diferenciando-se assim, dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes.

sintéticos podem ser imitações dos óleos naturais ou composições de fantasia. A identificação da natureza deste óleo 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 et al. (2007) 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 concentrações (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.

Quanto aos métodos de extração dos óleos essenciais eles variam de acordo com a parte da planta em que ele se encontra, bem como com a proposta de utilização dos mesmos. Os mais comuns são: 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

⁴ Vegetais botanicamente idênticos, mas que diferem quimicamente.

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.

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 Espectrofotometria 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 destaque 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 versa 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.

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., 2002; 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 da dengue não ocorram é atacando os locais de reprodução (GLUBER, 1989).

O controle ideal é feito com o uso de larvicidas nos locais de reprodução. Normalmente são usados inseticidas e larvicidas organofosforados e piretróides sendo a utilização de produtos naturais 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 *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (Canela)

O gênero *Cinnamomum* (*Lauraceae*) é constituído por aproximadamente 350 espécies, muitas das quais são produtoras de óleo essencial. O valor comercial dos óleos de *Cinnamomum* depende da espécie e da parte da planta utilizada (FAO, 1995). Os óleos essenciais mais importantes no mercado mundial são os obtidos de *C. verum* ("cinnamomum bark oil" e "cinnamomum leaf oil"), *C. cassia* ("cassia oil") e *C. camphora* ("sassafras oil" e "ho leaf oil"). *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Cinnamomum verum* J. S. Presl.), conhecida como "canela-da-índia" e "canela-do-ceilão", é originária de algumas regiões da Índia e do Ceilão. A parte interna da

casca do tronco e dos ramos constitui a canela do comércio, com vasto uso mundial na perfumaria e na culinária, devido suas propriedades aromáticas e condimentares além de ser, popularmente, utilizada como estimulante, tônica, carminativa e antiespasmódica. A canela e o seu óleo essencial são empregados como corretivos do odor e do sabor na preparação de alguns medicamentos (LIMA, 2005).

A caneleira (Figura 1) é uma árvore originária do Ceilão, da Birmânia e da Índia e conhecida há mais de 2500 anos a.C. pelos chineses. Seu nome científico, "cinnamomum", segundo referências, é derivado da palavra indonésia "kayu manis", que significa "madeira doce". Mais tarde, recebeu o hebreu "quinnamon", que evoluiu para o grego "kinnamon".



Figura 1. *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela): árvore e folhas.

A canela era a especiaria mais procurada na Europa e seu comércio era muito lucrativo. O monopólio do comércio da canela esteve nas mãos dos portugueses no século XVI, passou para os holandeses, com a Companhia das Índias Orientais, quando esses expulsaram, em 1656, os portugueses do Ceilão. A partir de 1796, o comércio da canela passou para domínio inglês com a expulsão dos holandeses do Ceilão.

A caneleira requer cerca de 1.300 mm de chuva por ano e temperatura média anual superior a 21 °C. A casca dos ramos é comercializada em rama (pau),

raspas e pó. A caneleira é utilizada na culinária, na produção de bebidas, medicamentos, perfumes e sabonetes. Outras espécies do gênero *Cinnamomum* e *Cassia* também produzem canela. A canela é uma árvore de ciclo perene que atinge até 8 a 9 metros de altura. O tronco alcança cerca de 40 cm de diâmetro. As folhas são coriáceas, lanceoladas, com nervuras na base, brilhantes e lisas na parte superior e verde-clara, e finamente reticulada na parte inferior. As flores são de coloração amarela ou esverdeada, numerosas e bem pequenas, agrupadas em cachos ramificados (BALMÉ, 1978; SCHIPER, 1999).

De acordo com a literatura, a *Cinnamomum zeylanicum* apresenta como composição química as seguintes substâncias: ácido cinâmico, açúcares, aldeído benzênico, aldeído cinâmico, aldeído cumínico, benzonato de benzil, cimeno, cineol, eugenol, felandreno, furool, linalol, metilacetona, mucilagem, oxalato de cálcio, pineno, resina, tanino e vanilina (DIAS, 2009). As partes da plantas mais utilizadas são: óleo essencial e casca desidratada. A *Cinnamomum zeylanicum* apresenta como propriedades medicinais: adstringente, afrodisíaca, anti-séptica, aperiente, carminativa, digestiva, estimulante, hipertensora, sedativa, tônica e vasodilatadora (BALMÉ, 1978; SCHIPER, 1999).

Praticamente se utiliza a parte aérea do vegetal como um todo. As folhas são utilizadas para a extração de óleos essenciais, mas a parte mais valorizada é realmente a casca dos ramos. No comércio encontra-se a canela em pó, rasurada e em cascas enroladas em si mesmas e medindo cerca de 20 a 25 cm de comprimento (MORSBACH et al., 1997).

2.3 Técnicas Analíticas

A análise de misturas complexas de multicomponentes como os óleos essenciais requer a aplicação de métodos analíticos modernos e instrumentação adequada.

As técnicas analíticas permitem a avaliação das qualidades do óleo essencial, garantindo, assim, a identificação, constância de seus constituintes químicos e a segurança de sua utilização.

A avaliação quantitativa e qualitativa envolve a utilização de diversas técnicas básicas que sofreram algumas alterações nos últimos anos, devido 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. Entre as técnicas citamos a seguir, basicamente, aquelas utilizadas neste trabalho.

2.3.1 Cromatografia Gasosa (CG)

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes, os quais são registrados por equipamentos (cromatógrafos) em gráficos denominados cromatogramas. Entre os métodos de análise a cromatografia ocupa lugar de destaque devido à facilidade com que efetua separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais (COLLINS et al., 2006).

Diferentes técnicas cromatográficas são predominantes na análise de voláteis; em particular, métodos de cromatografia gasosa que resultam na separação da mistura em componentes individuais (BRAITHWAITE; SMITH, 1996; SCHREIER, 1984). Assim, a cromatografia permite determinar, qualitativamente e quantitativamente, as frações individuais obtidas nos cromatogramas. Portanto, a Cromatografia Gasosa é a técnica por excelência para análise de óleos essenciais, pois tratam-se de misturas voláteis. A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra em uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa).

2.3.2 Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (CG-EM)

Existem no mercado várias empresas que oferecem o conjunto cromatográfico a gás-espectrometria de massas (CG-EM), acoplado por meio de uma interface que aumenta a concentração da amostra no gás de arraste, aproveitando a maior difusibilidade do gás. A velocidade de varredura é grande o suficiente para permitir a obtenção de diversos espectros de massas por pico eluído no cromatógrafo. A conexão direta de colunas capilares de cromatografia gasosa ao espectrômetro de massas sem a interface de enriquecimento permite várias varreduras de massas rápidas em pontos diferentes de um pico cromatográfico, de modo a testar sua homogeneidade. Desse modo, é possível resolver picos cromatográficos parcialmente superpostos. Assim, a espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa fornece as fragmentações dos componentes individuais separados (ADAMS, 2007).

Na técnica de impacto de elétrons (IE), mais comumente usada em espectrometria de massas, um espectrômetro de massas bombardeia moléculas na fase vapor com um feixe de elétrons de alta energia e registra o resultado do impacto dos elétrons como um espectro de íons separados na base da razão massa/carga (m/z). A maior parte dos íons formados tem carga unitária. Os espectros de massas são obtidos rotineiramente com o uso de um feixe eletrônico de energia de 70 eV. O evento mais simples que pode ocorrer em fase gasosa é a remoção de um único elétron pelo feixe, com formação do íon molecular, um cátion-radical (M^+) (o ponto simples representa o elétron desemparelhado). A maior parte dos íons desintegra-se em 10^{-10} - 10^{-3} s, dando, no caso mais simples, um fragmento carregado positivamente e um radical. Assim, forma-se um número de fragmentos iônicos que podem ser posteriormente decompostos em fragmentos menores (SILVERSTEIN et al., 2007).

Pode-se apresentar o espectro na forma de um gráfico ou uma tabela. O gráfico tem a vantagem de mostrar seqüências de fragmentação que com a prática podem ser facilmente reconhecidas. No espectro de massas por impacto de elétrons, gerado por um computador na forma de um gráfico de barras, a abundância relativa dos picos apresentada como percentagem do pico base (100%), é lançada contra a razão massa/carga (m/z).

2.4 Aspectos sobre o mosquito *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (Figura 2) é o principal responsável pela transmissão da febre amarela urbana e da dengue em todo o mundo (TAUIL, 2001). É doméstico e antropofílico, com atividade hematofágica diurna e utiliza-se, preferencialmente, de depósitos artificiais de água limpa para colocar seus ovos (CDC, 2011).



Fonte: INFO-E (2011)

Figura 2. Mosquito *Aedes aegypti*.

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 (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Hoje, o *Aedes aegypti* é considerado um mosquito cosmopolita, com ocorrência em regiões tropicais e subtropicais do planeta (CDC, 2011).

A ocorrência do *Aedes aegypti* se dá, principalmente, nas regiões tropicais. Dados do ano de 2010 indicaram as áreas de maior risco (mapa da Figura 3): 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 Taiwan⁵ (CDC, 2011).



Fonte: WHO (2011).

Figura 3. Distribuição do *Aedes aegypti* no mundo em 2010: países ou áreas de risco.

Nos Estados Unidos a ocorrência do mosquito é incomum, mas em 1995 foram registrados casos de transmissão no Texas. No Brasil o *Aedes aegypti* está distribuído na maior parte do país e a região Nordeste está mais suscetível à ocorrência de epidemias da dengue, onde o mosquito está restrito às vilas e cidades, sempre ligado ao peridomicílio e ao domicílio humano (NEVES, 2000).

Percebe-se que o mosquito *Aedes aegypti*, 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 tornando-se o causador de uma doença que é um grande problema de saúde pública (FUNASA, 2002).

⁵ 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, 2011).

2.4.1 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 e vasos, dentro ou perto das habitações. Seu ciclo de vida compreende quatro estágios: ovo – larva – pupa – adulto (SILVA, 2006).

a) Ovo: o ovo (Figura 4), mede aproximadamente 1 mm de comprimento, com contorno alongado e fusiforme. O ovo 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 (SILVA, 2006).



Fonte: FIOCRUZ (2011)

Figura 4. Ovos do *Aedes aegypti*.

De acordo com dados da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA, 2002) são capazes de resistir a longos períodos de dessecação: ovos com até 450 dias, sofrem eclosão, quando colocados em contato com a água. 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.

b) Larva: nesta fase o *Aedes aegypti* (Figura 5) possui aspecto vermiforme, sifão curto, grosso e mais escuro que o corpo e possui quatro estágios

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.



Fonte: WIKIMEDIA (2011)

Figura 5. Larvas do *Aedes aegypti*.

c) Pupa: é o último estágio da fase aquática (Figura 6) e possui o aspecto de vírgula, sendo bastante móvel quando perturbada; seu corpo escurece à 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 (SILVA, 2006).



Fonte: ARBOVIRUS (2011).

Figura 6. Pupa do *Aedes aegypti*.

d) 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 2). Podem

acasalar 24h após emergirem e o acasalamento pode ser durante o vôo ou pousados sobre uma superfície.

O repasto sanguíneo das fêmeas fornece proteínas para o desenvolvimento dos ovos e ocorre nas primeiras horas do dia e ao anoitecer (o macho alimenta-se de carboidratos extraídos dos vegetais). A fêmea faz uma postura (geralmente no fim da tarde) após cada repasto sanguíneo e o intervalo entre a alimentação e a postura é de três dias. A fêmea é atraída por recipientes sombreados ou escuros e prefere água limpa e distribui cada postura em vários recipientes (SILVA, 2006).

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar analiticamente e avaliar a atividade larvícida do óleo essencial das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn frente o *Aedes aegypti*.

3.2 Específicos

- a) Extrair quantitativamente o óleo essencial das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.
- b) Determinar as propriedades físico-químicas do óleo essencial: densidade, índice de refração, solubilidade, cor e aparência.
- c) Determinar os componentes do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas.
- d) Quantificar os componentes do óleo por cromatografia gasosa.
- e) Calcular a concentração letal CL_{50} do óleo essencial e do padrão do componente majoritário do óleo a partir do teste de toxicidade (atividade contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*).

CAPÍTULO 4

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Físico-Química do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e Central Analítica da Unicamp.

A metodologia adotada envolveu atividades usuais em um tratamento analítico de plantas aromáticas. Realizou-se o teste de atividade larvicida calculando-se a CL_{50} segundo o método Reed-Muench (1938 apud COLEGATE; MOLYNEUX, 1993).

4.1 Origem, Coleta e Preparo da Amostra Botânica

As amostras de folhas verdes em estudo foram coletadas nos meses agosto a setembro do ano de 2009 (escolha aleatória) em sítio localizado na Maioba, Município de Paço do Lumiar – Maranhão. Após a coleta, o material foi transportado até o Laboratório de Físico-Química de Alimentos do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão para a realização das análises.

As amostras foram selecionadas e colocadas para secar. Após o período de secagem utilizou-se um moinho elétrico Tecnal, modelo TE-340 para a trituração das folhas. Após a moagem o material em pó foi armazenado em frascos de polietileno para posterior extração do óleo essencial. Para as pesagens utilizou-se balança digital Marte, modelo AL 500, com precisão de 0,1 mg.

4.2 Identificação botânica

Para obtenção da exsicata, as folhas foram secas, prensadas e acondicionadas em folhas de jornal. A temperatura utilizada para a secagem foi de 38°C, durante 48 horas. Em seguida, as exsicatas foram enviadas ao Herbário Ático SEABRA, da UFMA, que efetuou a caracterização botânica da espécie com base

nas características físicas do material coletado. De acordo com a caracterização botânica, a espécie de canela estudada, foi identificada pela Professora Especialista Ana Zélia Silva, do Departamento de Farmácia da UFMA, como pertencente à família das Lauráceas, cujo nome científico é *Cinnamomum zeylamicum* Breyn, conforme características das folhas e galhos da espécie. A exsicata encontra-se depositada no herbário da UFMA sob o nº 1153.

4.3 Extração do óleo essencial

Para a extração do óleo essencial da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn utilizou-se um extrator de Clevenger de vidro acoplado a um balão de fundo redondo de 6000 mL e a uma manta elétrica como fonte geradora de calor. A cada rotina de extração do óleo essencial, foram pesadas 400g das folhas moídas e colocadas com 4000 mL de água destilada em balão de fundo redondo acoplado ao sistema extrator. Em seguida ligava-se a manta elétrica e mantinha-se a temperatura em 100°C. Após 3,5 horas encerrava-se a destilação recolhendo-se o óleo essencial. O óleo foi seco por meio de percolação em Na₂SO₄ anidro. Essas operações foram realizadas em triplicatas e as amostras armazenadas em frascos de vidro sob refrigeração para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis. Posteriormente esses óleos foram submetidos às análises.

O rendimento da extração foi calculado pela relação massa/volume, observando o volume obtido no próprio sistema de extração, conforme a equação abaixo:

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

Onde:

R% = rendimento em porcentagem;

volume óleo = volume de óleo em mL;

densidade = massa de um ml de óleo em g;

massa = massa seca de folhas em g.

Para a determinação da cinética de extração fez-se a hidrodestilação em sistema de Clevenger variando-se os tempos de extração em 1,0; 2,0; 3,0; 3,5; 4,0 e 5,0 horas, à temperatura de 100°C (em cada extração usou-se uma massa de 400g de amostras para 4000 mL de água – 1:10). A seguir mediu-se o volume do óleo, coletou-se, filtrou-se em Na₂SO₄ anidro e armazenou-se sob refrigeração para evitar perda por volatilização.

4.4 Caracterização físico-química do óleo essencial

Foram realizadas análises de densidade, solubilidade em etanol a 70% v/v, índice de refração, cor e aparência.

4.4.1 Densidade

Para o cálculo da densidade, utilizou-se um picnômetro de 1,0 mL, previamente seco, tarado e aferido, onde se adicionaram e pesaram as amostras do óleo essencial (25°C).

4.4.2 Solubilidade em etanol (70%)

Na determinação da solubilidade, utilizou-se uma solução de etanol/água a 70% (v/v), mantendo-se constante o volume de óleo e adicionando-se, proporcionalmente, volumes diferentes e crescentes da solução alcoólica até se atingir a completa solubilização.

4.4.3 Índice de refração

Para a determinação do índice de refração, utilizaram-se pipetas de Pasteur em vidro para adicionar as amostras dos óleos diretamente sobre o prisma de Flint do refratômetro, à temperatura de 25°C; fazendo-se então as leituras. Para as medidas de índice de refração utilizou-se um refratômetro ABBE 2 WAJ.

4.4.4 Cor e Aparência

A técnica utilizada foi visual, onde, sob um fundo branco, se comparou a cor do óleo essencial com cores conhecidas e para a aparência se fez uma inspeção do óleo no que diz respeito a sua transparência ou limpidez.

4.5 Caracterização química

4.5.1 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

A identificação da composição química do óleo essencial extraído das folhas de canela foi feita através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. As análises foram realizadas em equipamento CG/EM modelo QP-5000, marca Shimadzu, usando-se uma coluna capilar (30m x 0,25mm x 0,25µm, HP-5MS), tendo como fase estacionária 5% difenil, 95% dimetil polisiloxano. Utilizou-se hélio como gás de arraste a um fluxo de 1,0 mL/min. Alíquotas de 0,3µL das amostras foram injetadas no modo split, com razão de divisão 1:10, com fonte de ionização a 70 eV. As condições de operação do equipamento foram as seguintes: temperatura do injetor: 280°C, programação de temperatura do forno: 40°C (5,0 min.) – 240°C (40°C/min.) – 240°C – 300°C (80°C/min., 7,5 min.) e linha de

transferência 280°C. O detector de massas do tipo quadrupolo linear e a varredura de 0,5 seg/scan.

Para a identificação dos compostos detectados na amostra utilizou-se as bases de dados de espectros de massas NIST105, NIST21 EWILEY139. O programa AMDIS (Automated Mass spectral Deconvolution Mass & Identification System) foi utilizado para a interpretação dos espectros de massas quando havia diferenças significativas entre o espectro de massas obtido e o encontrado no banco de dados. É fundamental salientar que o espectro de cada constituinte da amostra foi comparado com cada um dos espectros armazenados no banco de dados do computador. Após esta comparação, o programa faz uma lista tríplice de compostos com sua respectiva probabilidade de ser ou não um determinado composto. Se $p > 70\%$, existe uma grande probabilidade de ser este o composto identificado. O banco de dados é limitado e, em alguns casos, indica quais seriam os prováveis constituintes, por aproximação.

4.5.2 Quantificação do eugenol por Cromatografia Gasosa

Para avaliar a concentração cromatográfica construiu-se um gráfico registrando a concentração de eugenol pelo valor médio ($n = 4$) das respectivas áreas e interpolando-se o valor da amostra.

4.6 Padrão

Utilizou-se um padrão concentrado de eugenol (98% de pureza) nas análises químicas, procedente da Indústria Dierberger de Óleos Essenciais.

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

4.7 Atividade larvicida

4.7.1 Obtenção e cultivo das larvas

Como os ovos do *Aedes aegypti* não são postos diretamente na água, mas 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 500 mL, semi-preenchidos com água e um pedaço de madeira de dimensões 20cmx5cm com uma parte imersa e outra não (Figura 7). A fêmea do *Aedes aegypti*, deposita seus ovos na parte imediatamente superior à lâmina d'água, na parte da madeira ainda úmida, mas fora da água do jarro.



Figura 7. Armadilha utilizada para a coleta dos ovos do *Aedes aegypti*.

Os ovos do *Aedes aegypti* foram imersos numa bacia plástica, de formato retangular, com três litros de água mineral, para a eclosão. Após a imersão dos ovos, 0,5 g de ração para ratos 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 estágio do desenvolvimento, quando

então foram utilizadas nos ensaios de atividade larvívora. Foram necessários de quatro a cinco dias para que as larvas atingissem 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 do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão (MARINHO, 2010).

4.7.2 Teste de toxicidade

Para realização do teste de toxicidade, as larvas selecionadas no terceiro estágio (Figura 8) foram transferidas para um béquer contendo 20 mL de água mineral (26-28°C). As larvas foram capturadas utilizando-se uma pipeta de Pasteur (Figura 8). Cada teste foi feito em triplicata para cada concentração testada.

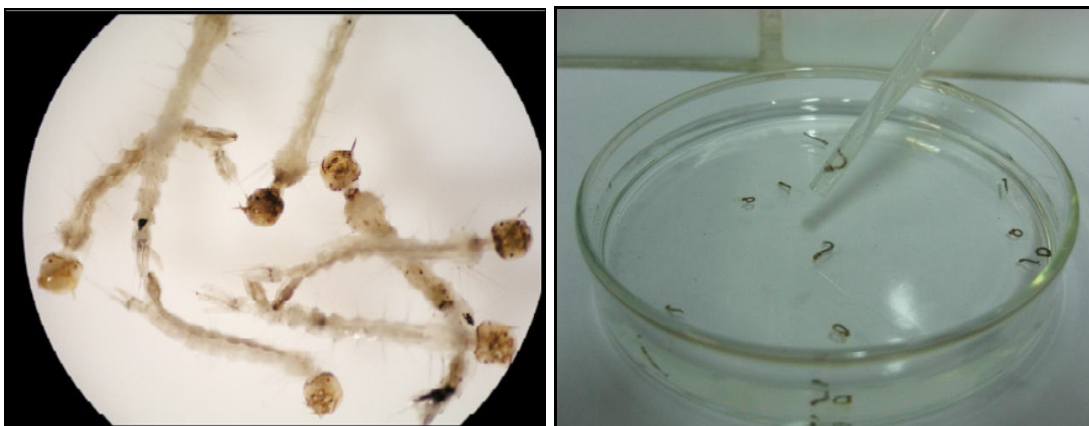


Figura 8. Larvas do *Aedes aegypti* em terceiro estágio.

Os controles positivos foram realizados com o organofosforado temephos em larvas do *Aedes aegypti*, na concentração utilizada pela Vigilância Sanitária que é de 100mg L⁻¹. Os controles negativos foram realizados com 20 mL de água mineral (26-28°C) contendo 0,04% de Tween. As larvas foram expostas às soluções por 24 horas, sendo monitoradas de hora em hora. Ao fim dos períodos registrou-se a mortalidade.

Para o preparo da solução teste, pesou-se 20 mg 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. Semelhantemente procedeu-se com o padrão de eugenol.

4.7.2.1 Análise Estatística

Após os testes de toxicidade com o óleo e o padrão de eugenol, montou-se uma tabela com os valores das seis concentrações, log das mesmas, o número de larvas mortas após 24 horas (média dos cinco pontos), número de larvas vivas após 24 horas (média dos cinco pontos), o acumulado de mortos (soma das células de mortos abaixo) e o acumulado de vivos (soma das células de vivos acima).

A análise estatística dos dados foi realizada de acordo com o método de Reed-Muench (1938), o qual parte do princípio de que um animal que sobreviva a certa dose, também irá sobreviver em qualquer outra dose menor que aquela, consequentemente, o animal que morrer com certa dose, também irá morrer em doses maiores que aquela. A partir de uma tabela contendo os dados de mortalidade para cada concentração testada, é construído um 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% (CL_{50}), pois nesse ponto o número de animais sobreviventes é igual ao número de animais mortos (COLEGATE; MOLYNEUX, 1993).

O intervalo de confiança foi calculado segundo o método de Pizzi (1950) no qual se constrói um gráfico do percentual de mortos *versus* logaritmo (log) da dose. A seguir determinou-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: $(SE)^2 = 0,79 \times h \times R/20$. Finalmente, o valor do intervalo de confiança é igual 2×10^{SE} .

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração do óleo essencial

5.1.1 Rendimento

O rendimento da extração foi calculado diante da quantidade de óleo que se obteve a partir de uma determinada massa vegetal. Como nesse experimento partiu-se de uma massa de 400g de folhas moídas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn e obtiveram-se em média 3,0mL de óleo essencial em cada extração o rendimento v/m foi de 0,75%. Como a densidade do óleo foi determinada em 1,048 g mL⁻¹ (Tabela 1) o rendimento m/m foi calculado em 0,79%.

O rendimento determinado está dentro da faixa de valores encontrados na literatura, 0,7 a 1,2% por processos extrativos nas folhas (KOKETSU, 1997).

5.1.2 Cinética

A Figura 9 representa a relação entre o rendimento percentual do óleo extraído e o tempo de extração, para uma mesma quantidade de massa (400g) das folhas secas em pó nas condições do item 4.3. Observa-se ainda que o rendimento máximo do óleo extraído foi obtido após a coleta em quatro horas de hidrodestilação. Durante a cinética de extração observou-se nitidamente que houve perda no rendimento, pois o óleo extraído das folhas da canela se mostrou denso e com muita facilidade de formar hidrolato, ou seja, mistura de água com óleo.

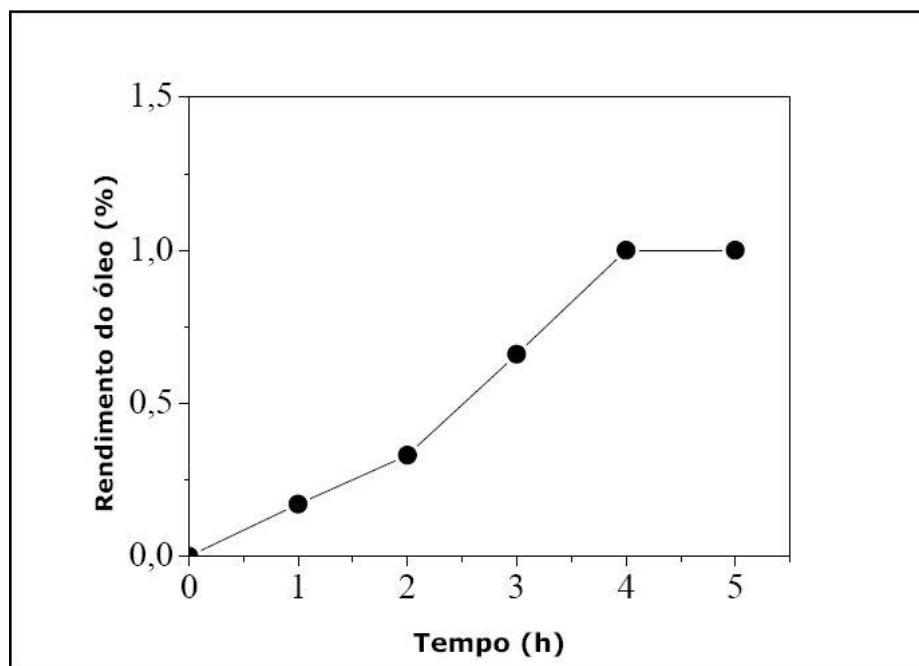


Figura 9. Cinética referente ao rendimento de extração do óleo essencial da espécie *Cinnamomum zeylanicum* Breyn em função do tempo, com massa de 400g e temperatura de 100°C.

Na indústria de essências a cinética de extração do óleo essencial é um dos principais parâmetros físico-químicos pesquisados. Além de estar diretamente relacionado com a qualidade do óleo essencial, o tempo de extração reflete-se na natureza econômica do processo. Por isso, uma destilação rápida pode conduzir a um produto contendo predominantemente constituintes mais voláteis, porém destituído das melhores características; ao contrário, uma extração prolongada encarece o produto e também pode sobrecarregá-lo de compostos de aromas indesejáveis (CHAAR, 2000).

5.2 Caracterização físico-química do óleo essencial

Os resultados obtidos na caracterização físico-química do óleo essencial extraído das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn estão na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físicas do óleo essencial extraído das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela).

Propriedades físico-químicas	Resultados
Densidade (g mL ⁻¹)	1,048
Solubilidade em álcool a 70% (v/v)	1:1
Índice de refração (N _D ^{25°})	1,533
Cor	Amarelo
Aparência	Límpido
Rendimento (%)	0,79

Os valores obtidos (Tabela 1) apresentaram valores semelhantes aos relatados pela literatura (KOKETSU, 1997).

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo, geralmente, específica para um determinado órgão e característica para o seu desenvolvimento, mas as condições ambientais são capazes de causar variações significativas. Alguns desses aspectos são: o ciclo vegetativo; o processo de obtenção; os fatores extrínsecos (ambiente no qual o vegetal se desenvolve, tipo de cultivo, temperatura, umidade relativa, grau de hidratação do terreno e a presença de micronutrientes como N, P e K) (SIMÕES et al., 2007).

Características como o índice de refração podem revelar se o óleo em questão sofreu alguma alteração⁶, devido, por exemplo, adulterações. Este parâmetro corresponde à relação entre a velocidade da luz no ar e a velocidade na substância em ensaio.

⁶ Por comparação com o índice de refração da água (1,3330).

5.3 Caracterização química

5.3.1 Identificação e quantificação dos constituintes do óleo essencial

As análises realizadas na Central Analítica da Unicamp permitiram a identificação de quatro constituintes do óleo essencial das folhas de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (cromatograma da Figura 10), os quais são apresentados na Tabela 2, conforme ordem de eluição (com as respectivas concentrações).

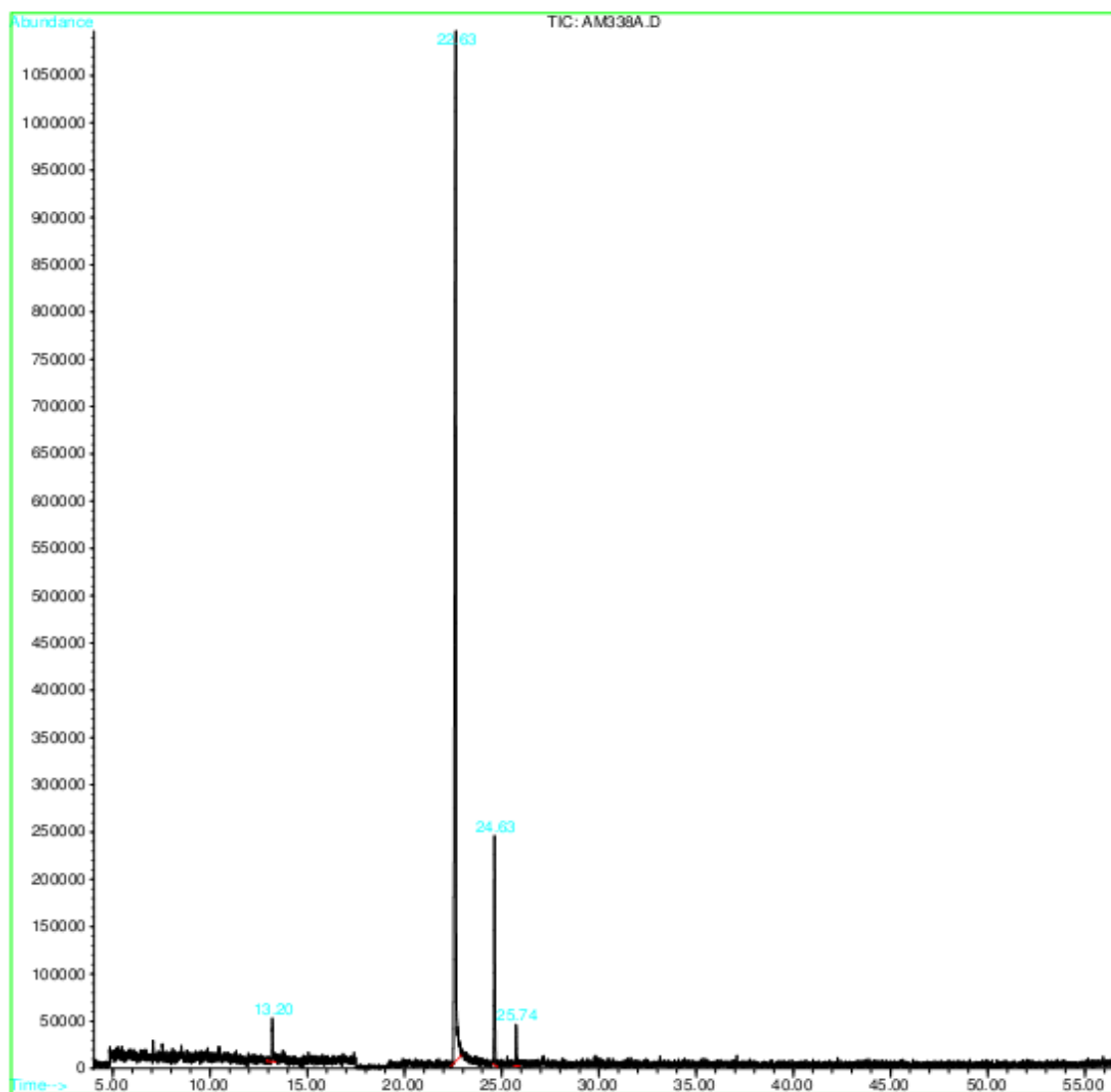


Figura 10. Cromatograma obtido na análise do óleo essencial das folhas da espécie *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.

Tabela 2. Compostos identificados na amostra de óleo essencial de folhas da espécie *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.

Pico	tRET ^a	Nome do Composto	% A ^b
1	13,20	Linalol	2,68
2	22,63	Eugenol	82,67
3	24,63	Cariofileno	12,18
4	25,74	Humuleno	2,47

^aTempo de retenção do pico pela ordem de eluição da coluna.

^b%A = Porcentagem de área normalizada.

De acordo com a metodologia utilizada foi possível a identificação da composição do óleo na amostra utilizada. A classe aromática está representada pelo eugenol, como mostrado na Tabela 2, é o composto majoritário 82,67%. A fração sesquiterpênica está representada pelos compostos cariofileno 12,18% e humuleno 2,47%.

O composto majoritário eugenol, identificado no óleo essencial extraído das folhas da canela (Tabela 2), segundo a literatura apresenta propriedades comprovadas como, bactericida, fungicida, anestésico, anti-séptico, anticoagulante, antioxidante, inseticida, repelente, efeito alelopático, e na produção de outros fenólicos como a vanilina (MARINHO, 2010).

5.4 Atividade larvicida

A atividade larvicida do óleo essencial extraído das folhas da espécie *Cinnamomum zeylanicum* Breyn foi testada em quatro concentrações diferentes: 30, 50, 70 e 100 ppm, 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 triplicata. Os dados sobre o número de larvas vivas e de larvas mortas foram encontrados através de uma média das três repetições para cada uma das quatro concentrações testadas (Tabela 3). Os controles utilizados não apresentaram resposta positiva ao teste.

Tabela 3. Mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição em várias concentrações do óleo essencial extraído das folhas da espécie vegetal *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.

Dose, ppm	Log dose	Mortos	Vivos	Acumul. mortos	Acumul. vivos	Mortalidade %
100	2,0000	10	0	21	0	100
70	1,8450	6	4	11	4	60
50	1,6989	5	5	5	9	50
30	1,4771	0	10	0	19	0

Número de larvas ($n = 10$).

De acordo com a Tabela 3, a concentração de 30 ppm do óleo essencial da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, não apresentou a menor atividade larvicida, ou seja, nenhuma das larvas morreu nessa concentração (0% de mortalidade). A partir da concentração de 50 ppm do óleo essencial a atividade larvicida foi aumentando, provocando a morte de 50, 60 e 100% dos indivíduos testados, ou seja, 5, 6 e 10 larvas.

A taxa de percentagem da mortalidade das larvas frente o óleo é mostrada na Figura 11.

Na Figura 12 mostra-se que a Concentração Letal 50% (CL₅₀), concentração na qual cinquenta por cento das larvas testadas morrem, foi encontrada próxima ao Log dose 1,75 (abaixo da concentração de 70 ppm).

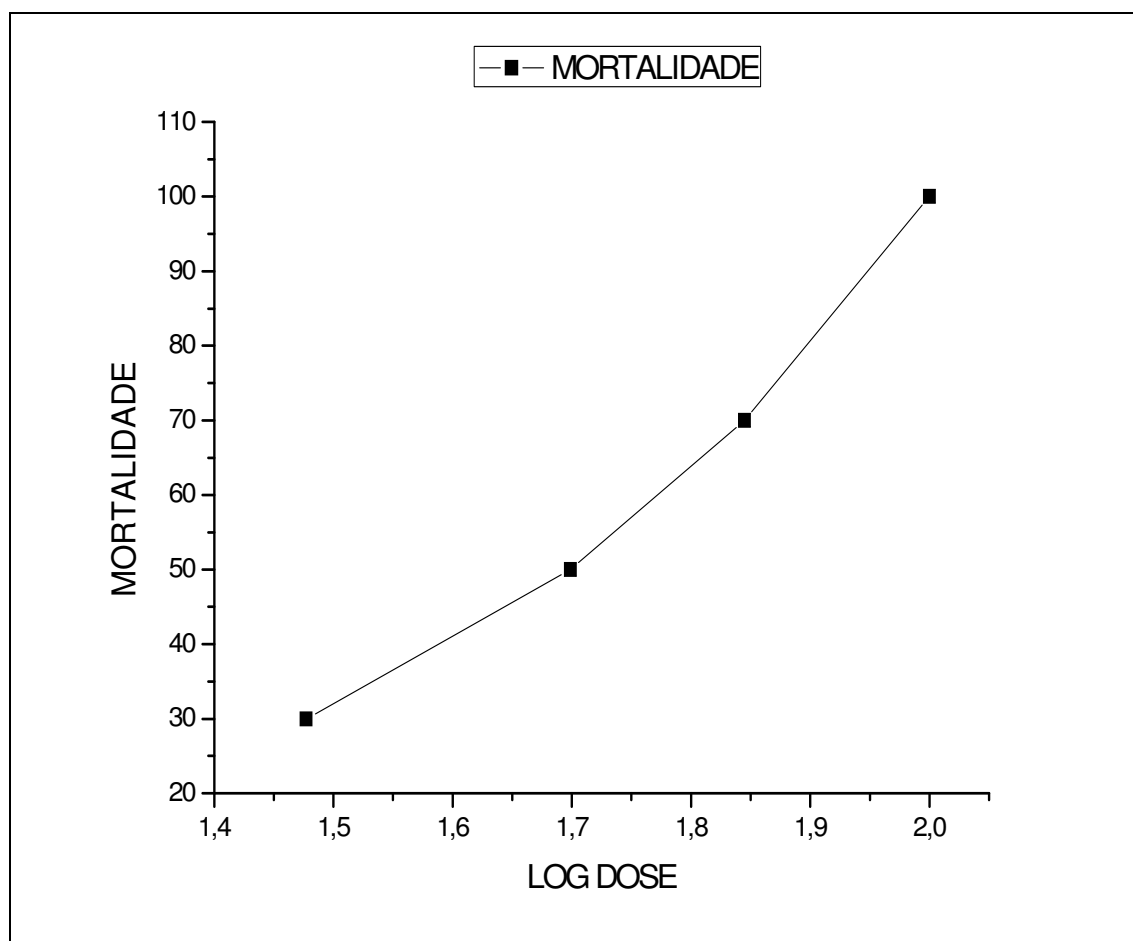


Figura 11. Taxa de mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* – expostas a quatro concentrações diferentes do óleo essencial da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, após 24 horas – versus o logaritmo de cada dose aplicada.

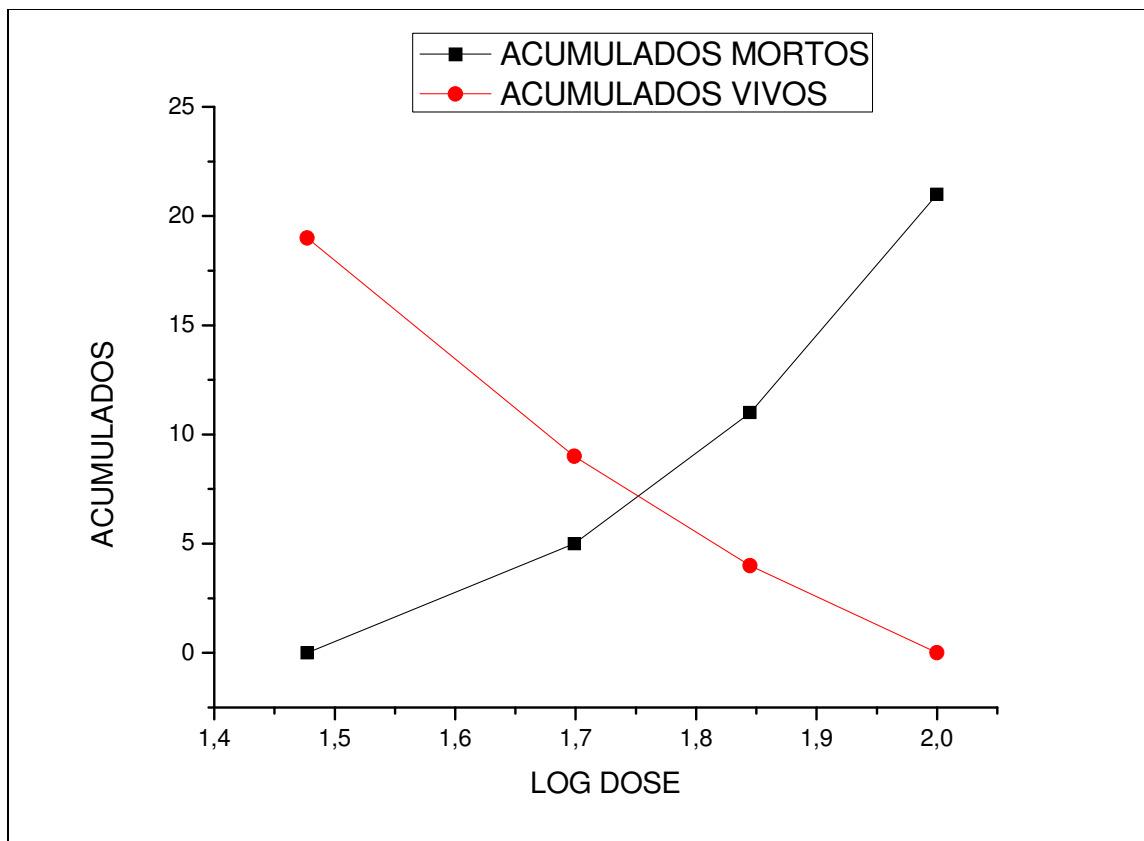


Figura 12. Estimativa da CL_{50} do óleo essencial da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL_{50} é o ponto de intersecção das duas curvas.

A dose letal CL_{50} para o óleo essencial da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn foi calculada através da intersecção das curvas de indivíduos acumulados mortos e indivíduos acumulados vivos da Figura 12, tendo como resultado a concentração de 56,49 ppm. De acordo com Cheng et al. (2003) valores de $CL_{50} < 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados ativos.

Para o padrão de eugenol, componente majoritário do óleo essencial, a atividade larvicida foi testada em seis concentrações do óleo essencial, 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 ao óleo, para cada concentração os testes foram realizados em triplicata. Os dados sobre o número de larvas vivas e mortas foram encontrados através de uma média das três 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 padrão de eugenol.

Dose, ppm	Log dose	Mortos	Vivos	Acumul. Mortos	Acumul. vivos	Mortalidade %
120	2,0791	10	0	30	0	100
100	2,0000	9	1	20	1	90
90	1,9542	8	3	11	4	80
70	1,8451	2	7	3	11	20
50	1,6989	1	9	1	20	10
30	1,3010	0	10	0	30	0

Número de larvas ($n = 10$).

Analisando-se a Tabela 4 verifica-se que para o padrão de eugenol, a concentração de 30 ppm não apresentou atividade larvicida. A concentração de 120 ppm apresentou a maior atividade, 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 13, apresentando 100% de mortalidade no Log dose 2,0791 (concentração 120 ppm).

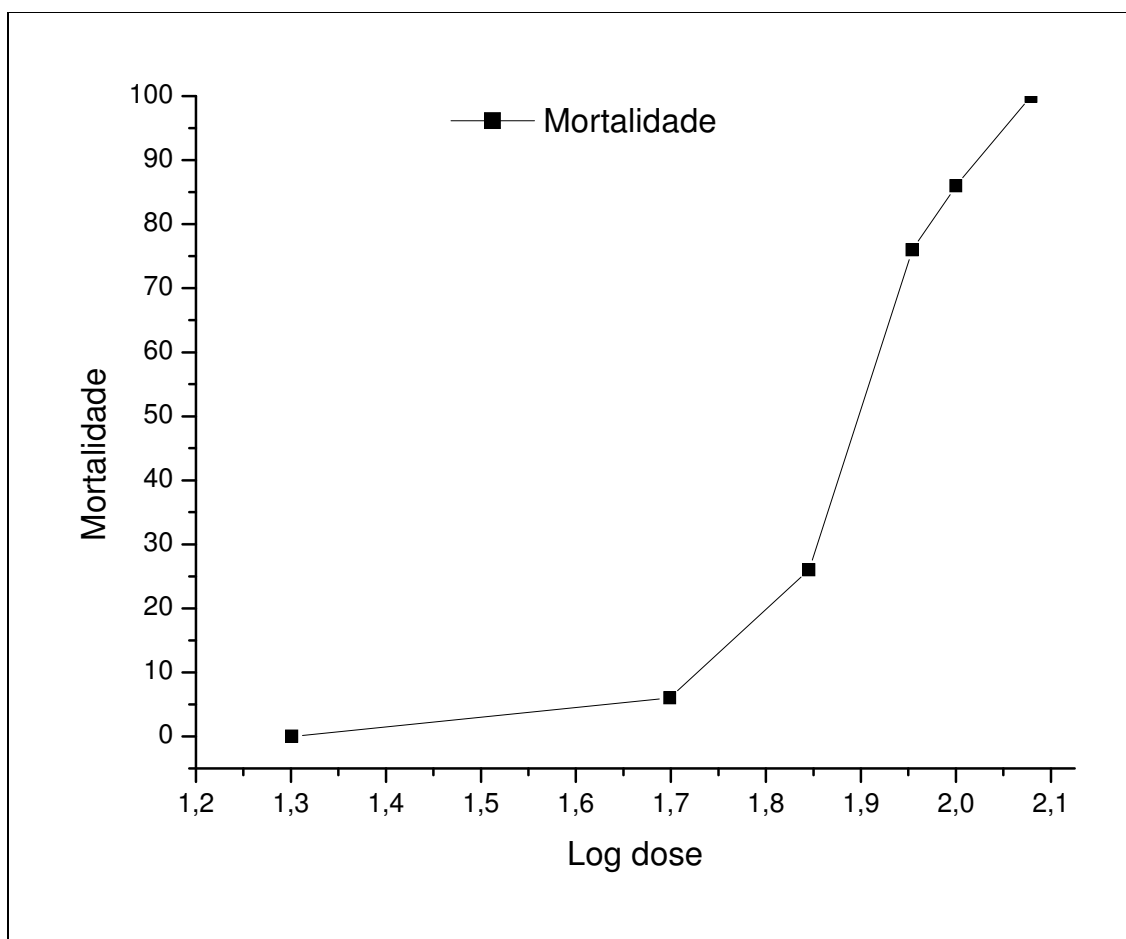


Figura 13. Taxa de mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* expostas a seis concentrações diferentes do padrão de eugenol, após 24 horas.

Partindo-se dos valores da Tabela 4 calculou-se a Concentração Letal 50% para o padrão de eugenol (CL_{50}). A Figura 14 mostra a estimativa da CL_{50} do eugenol pelo método Reed-Muench (1938) a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada, tendo sido a CL_{50} o ponto de interseção das curvas.

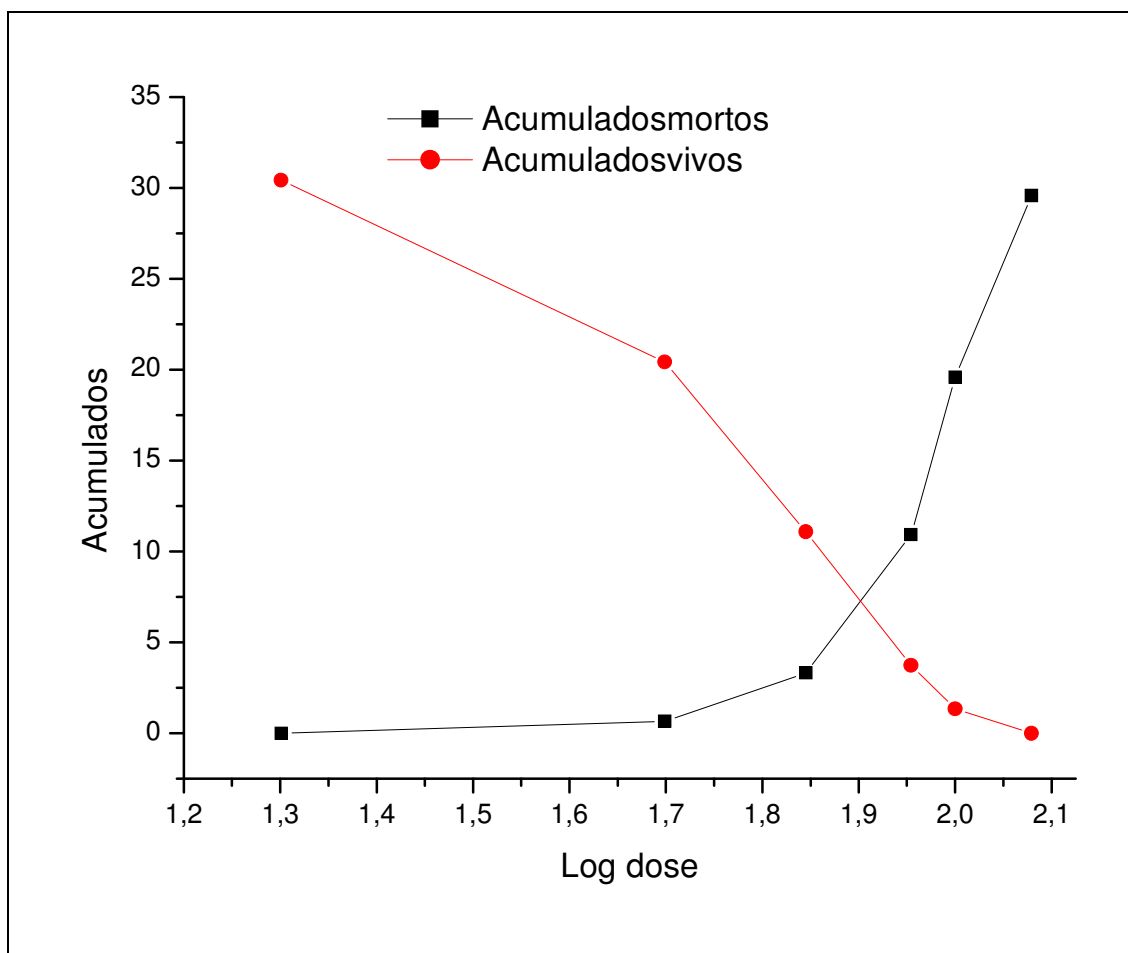


Figura 14. Estimativa da CL_{50} do padrão de eugenol pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL_{50} é o ponto de interseção das duas curvas.

Observando-se a Figura 14 verifica-se que o valor encontrado para a CL_{50} está próximo ao Log dose 1,90 (entre as concentrações 70 e 90 ppm). O resultado obtido foi o valor de concentração 79,75 ppm, com intervalo de confiança de 2,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Comparando-se as mortalidades apresentadas pelo óleo e padrão de eugenol, percebe-se que o óleo essencial das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn demonstrou melhor atividade larvica contra o *Aedes aegypti*, indicando que a mistura de componentes do óleo age de maneira mais eficaz que o padrão isolado.

A esse respeito, a potencialidade dos óleos essenciais varia segundo a espécie vegetal, a origem, a composição e os mecanismos de ação contra a praga em questão (LEYVA, 2009; TELES, 2009).

Contra o *Aedes aegypti* alguns estudos mostram que os componentes terpênicos, alcoóis e aldeídos dos óleos essenciais são os principais responsáveis pela atividade inseticida ou larvica (LUCIA et al., 2007; LEE, 2006; PANELLA et al., 2005; CARVALHO et al., 2003; ARAÚJO et al., 2003; KARR; COTAS, 1998).

É importante ressaltar, nesse contexto, que não se pode apenas atribuir a ação larvica descrita neste estudo, portanto, ao composto eugenol particularmente; apesar de estar presente na ordem de 82,67%, nas folhas da amostra de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.

Outro fator importante a ser levado em consideração são os fenilpropanóides (como o eugenol) e, especialmente, os terpenóides, descritos por Alves (2001) como os principais constituintes que estão envolvidos nas interações planta-inseto.

Essa premissa é fortuitamente alegada quando nos reportamos a diversos achados na literatura referentes a alguns dos compostos identificados pelas técnicas analíticas utilizadas neste trabalho e que, possivelmente, podem ter contribuído na ação larvica do óleo essencial das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.

Santos et al. (2006) reportaram a atividade larvica de mono e sesquiterpenos extraídos de óleos essenciais da família *Boraginaceae* frente ao *Aedes aegypti*. Entre os compostos majoritários os monoterpenos α - e β -pineno foram destacados como responsáveis pela ação larvica (no presente estudo esse último composto apresentou um teor de 6,51%).

Simas et al. (2004) pesquisando produtos naturais no controle da dengue identificaram diversas classes de terpenos, como os compostos α - pineno, β -pineno,

linalol e eugenol. Os referidos autores indicam também que algumas características estruturais químicas são importantes para a atividade biológica, como por exemplo, a indicação de que a ligação dupla exocíclica no β -pineno parece ser mais importante que a ligação dupla endocíclica do α -pineno.

Os óleos essenciais podem atuar também em enzimas digestivas e neurológicas bem como interagir com o tegumento do inseto (ISMAN, 2006). Kim et al. (2003) demonstraram a importância da relação entre a estrutura química e atividade biológica dos compostos; reportando que quanto maior a lipofilicidade, maior a penetração no tegumento do inseto.

Outra observação de Simas et al. (2004) é também quanto à importância da lipofilicidade de terpenos para a atividade larvica em *Aedes aegypti*, quando se compararam monoterpenos e sesquiterpenos de estruturas correlatas.

Coats et al. (1991) estudando biorreguladores de pragas identificaram terpenos e fenilpropanóides, como o eugenol, e verificaram que o composto repeliu o mosquito *Aedes aegypti*, tendo a ressalva de que foi evidenciado nesse estudo a menor atividade de fenilpropanóides contendo núcleos benzênicos que possuíam substituintes nucleofílicos, como hidroxila, metoxila e benzodioxola.

Furtado et al. (2005) reportaram em seu estudo a ação larvica de óleos contendo limoneno, linalol e eugenol frente ao mosquito *Aedes aegypti*. Na ocasião esses compostos foram confirmados como majoritários e apresentaram menores atividades quando testados isoladamente (como ocorreu no presente trabalho). Os autores também sugerem a possibilidade de outros compostos serem responsáveis pela atividade larvica do óleo essencial ou ainda a existência de um sinergismo entre o composto majoritário e outro(s) componente(s) do óleo, existentes em menor fração.

Como já relatado neste estudo, pesticidas químicos organofosforados e piretróides são uma poderosa ferramenta contra vetores e continuarão desempenhando papel importante no controle integrado. No entanto, eles têm desvantagens, como o custo elevado, riscos a saúde humana e a organismos não-alvo, bioacumulação e desenvolvimento de resistência dos organismos alvo (THATHEYUS 2007; PROPHIRO, 2008).

Em comparação ao principal larvica utilizado no combate à dengue, o temephos, estudos recentes quanto à susceptibilidade deste composto referem que se trata de um produto que com o passar dos anos perdeu a sua força frente ao

mosquito, sendo necessárias doses cada vez maiores no seu combate (FURTADO et al., 2005).

Prophiro (2008) estudou os efeitos do temephos sobre larvas do *Aedes aegypti* no terceiro estágio e verificou um processo de estabelecimento de resistência ao organofosforado em algumas cidades da região sul do Brasil.

Nesse contexto é válido relatar outra importante observação quanto à ineficiência crescente do pesticida temephos utilizado no Brasil pelo Programa de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa): ele tem aspectos diferenciados no consumo do produto – enquanto na região Nordeste são consumidos 87,5g, no Sudeste o consumo é de 54,0g e no Sul 48,0g do produto (FUNASA, 2002).

Diante desse panorama, os resultados alcançados com o óleo das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn mostram a importância da necessidade de novas alternativas usando produtos de origem natural, especialmente se levarmos em conta que estes podem minimizar a dependência aos inseticidas químicos sintéticos.

Partindo dos resultados alcançados e do princípio de que o óleo essencial é um produto natural e, portanto, menos nocivo à saúde das pessoas e dos animais domésticos (ISMAN, 2000), pode-se afirmar que o óleo essencial das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn é um promissor agente larvicida natural em locais de crescimento de larvas do *Aedes aegypti*.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os resultados analíticos mostraram a eficiência do óleo extraído das folhas de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn juntamente com a metodologia adotada tanto na extração do óleo essencial, quanto à identificação e quantificação do composto majoritário.

As folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn forneceram um óleo essencial cujo rendimento foi de 0,79%, para extração por hidrodestilação.

A caracterização por CG-EM permitiu identificar quatro componentes presentes no óleo essencial (linalol, eugenol, cariofileno e humuleno), sendo o eugenol o componente majoritário na amostra (82,67%).

A atividade larvícida do óleo essencial das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn frente às larvas do *Aedes aegypti* foi maior que o padrão de eugenol mostrando-se, portanto, ser promissora a sua aplicação para esse fim, com CL₅₀ de 56,49 ppm.

Nesse contexto o óleo das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn pode oferecer uma alternativa larvícida natural no combate à dengue. Os resultados foram considerados promissores, no entanto, pesquisas adicionais são necessárias para que se proporcione o uso deste óleo essencial para essa finalidade contra o *Aedes aegypti*.

Finalmente, por se tratar de uma multimistura que apresenta características como volatilidade e baixa solubilidade em água, sugerem-se outros estudos no intuito de se realizar, por exemplo, um processo de encapsulação, o qual pode ser uma saída para resolver essas limitações do óleo, favorecendo uma liberação mais prolongada do composto na água onde o mosquito deposita suas larvas.

CAPÍTULO 7
**PERSPECTIVAS
FUTURAS**

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Isolar e testar como agentes larvicidas outros componentes do óleo essencial da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.

Investigar o efeito residual do óleo essencial das folhas no ambiente (persistência larvicida).

Testar o óleo em diferentes intervalos de temperatura para verificar se há resposta no monitoramento das larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

Testar o hidrolato do óleo essencial da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn como larvicida do mosquito *Aedes aegypti*.

Estudar metodologias eletroquímicas para as determinações qualitativas e quantitativas dos outros componentes dos óleos essenciais.

CAPÍTULO 8

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. 4.ed. Carol Stream, Illinois: Allured, 2007.

ALVES, HM. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**: 10-15, 2001.

AMER, A.; METHLHORN, H. Larvicidal effects of various essentials oils against, *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* larvae (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, 99:466-72, 2006a.

AMER, A.; MEHLHORN, H. Persistency of larvicidal effects of plant oil extracts under different storage conditions. **Parasitology Research**, 99: 473-477. 2006b

ARAUJO, E.C.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.; ANDRADE, I.L.; LIMA, M.A. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martisii* Benth. **J Agric Food Chem**, 51:3260-2, 2003.

ARBOVIRUS. ***Aedes aegypti*: pupa**. Disponível em: <http://www.arbovirus.health.nsw.gov.au/areas/arbovirus/mosquit/photos/aedes_aegypti_pupa.jpg> Acesso em: 15 fev. 2011.

ARIDOGAN, B.C.; BAYDAR, H.; KAYA, S.; DEMIRCI, M.; OZBASAR, D.; MUMLU, E. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. **Arch. Pharm. Res.**, 25:6, 860-864, 2002.

BALMÉ, F. **Plantas Medicinais**. São Paulo: Hemus, 1978.

BARRETO, C.F. *Aedes aegypti* - resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, Goiás, 1:2-62-73, nov. 2005.

BRAITHWAITE, A.; SMITH, F.J. **Chromatographic Methods**. 5. ed., New York: Blackie academic & Professional, 1996. 559p.

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

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

CARVALHO, A.F.; MELO, V.M.; CARVEIRO, A.A.; MACHOO, M.I.; BEANTIM, M.B.; RABELO, E.F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* against *Aedes aegypti*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 98:569-71, 2003.

CARVALHO, L.A.F.; SILVA, I.G. Avaliação longitudinal da atividade do Temephos 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 nov. 2011.

CHAAR, J.S. **Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans**. São Carlos/SP, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, 2000. Tese de Doutorado, 150p.

CHAMPAKAEW, D.; CHOOCHOTE, W.; PONGPAIBUL, Y.; CHAITHONG, U.; JITPAKDI, A.; TUETUN, B.; PITASAWAT, B. Larvicidal efficacy and biological stability of a botanical natural product, zedoary oil-impregnated sand granules, against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Parasitology Research**. 100: 729-737, 2007.

CHENG, S.S. HUANG, C.G.; CHEN, Y.J.; YU, J.J.; CHEN, W.J.; CHANG, S.T. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. **Bioresource Technology**, 100:452–456, 2009.

CHENG, S.S.; CHANGA, H.T.; CHANG, S.T.; TSAIB, K.H.; CHEN, W.J. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresource Technology**, 89:99-102, 2003.

CHENG, S.S.; HUANG, C.G.; CHEN, Y.J.; YU, J.J.; CHEN, W.J.; CHANG, S.T. 2009. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. **Bioresource Technology**, 100: 452–456, 2009.

COATS, J.R.; KARR, L.L.; DREWES, C.D. In: **Naturally Occurring Pest Bioregulators**; HEDIN, P.A. ACS Symposium Series 449; American Chemical Society: Washington, DC, 1991, p. 306-316.

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

COLLINS, H.C; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. (Orgs.) **Fundamentos de Cromatografia**. São Paulo: UNICAMP, 2006.

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

DIAS, V.L.N. **Fitodisponibilidade de metais, caracterização nutricional, constituição química, avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana do óleo essencial extraído das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.** João Pessoa-PB, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2009. Tese de Doutorado, 88p.

FAO. 1995. **Flavours and Fragrances of Plant Origin**: Non-Wood Forest Products. Chapter 2. *Cinnamomum Oils* (including *Cinnamon* and *Cassia*). Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 27 out. 2011.

FIOCRUZ. ***Aedes aegypti***: ovos. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/media/memo_dengue2.jpg> Acessado em: 15 nov. 2010.

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.; LIMA, M.G.A.; ANDRADE NETO, M.; BEZERRA, J.N.S.; SILVA, M.G. Atividade Larvívora de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, 34:5, 843-847, Sep.-Oct. 2005.

GERIS, R.; SILVA, I.G.; SILVA, H.H.; BARISON, A.; RODRIGUES-FILHO, E.; FERREIRA, A.G. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 50: 25-28, 2008.

GLEISER, R.M.; ZYGADLO, J.A. Insecticidal properties of essential oils from *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, 101: 1349-1354, 2007.

GLUBER, D. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-boe disease control in the 1990's: top down or bottom up. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 40: 571-578, 1989.

GONZAGA, A.D.; GARCIA, M.V.B.; SOUSA, S.G.A.; DANIEL, V.; CORREA, R.S.; RIBEIRO, J.D. Toxicity of cassava manipueira (*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.

INFO-E. **Empresa do Rio desenvolve bioinseticida contra o mosquito da dengue**. Info-e ano VII, n.164, 2 de abril de 2008. Disponível em: <http://www.anprotec.org.br/infoe/acoincece_vejamais.php?var=21>. Acesso em: 7 jul. 2011.

ISMAN, M. Plant essential oil for pest and disease management. **Crop. Prot.**, 19:603-08, 2000.

ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, 51: 45-66, 2006.

KARR, L.L.; COTAS, J.R. Insecticidal properties of dlimonelene. **J Pest Sci**, 13:287-90, 1998.

KIM, E.H.; KIM, H.K.; CHOI, D.H.; AHN, Y.J. A acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari:Acaridae). **Applied Entomology and Zoology**, 38(2): 261-266, 2003.

KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L.; GODOY, R.; DAISE & MORSEBACH, N.; Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná. Ciênc. **Tecnologia Alimentos**, vol. 17, no. 3, p. 281-285, 1997.

LEE, H.S. Mosquito larvicidal activity of aromatic medicinal planta oils against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens*. **J Am Mosq Control Assoc**, 22:292-295, 2006.

LEYVA, M.; MARQUETTI, M.C.; TACORONTE, J.E.; SCULL, R.; TIOMNO, O.; MESA, A.; MONTADA, D. Actividad larvica de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Rev Biomed**, 20:5-13, 2009.

LIMA, M.P.; ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; SILVA, T.M.D.; FERNANDES, C.S. Volatile constituents from leaves and branches of *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*). **Acta Amazônica**, v.35 no. 3, 2005.

LUCIA, A.; GONZÁLEZ, A.P.; SACCACINI, E.; LICASTRO, S.; ZERBA, E.; MASUH, H. Larvicidal effect of Eucalyptus grandis essential oil and turpentine and their major components on *Ae. aegypti* larvae. **J Am Mosq Control Assoc**, 23:293-303, 2007.

LUNA, J.E.D.; MARTINS, M.F.; ANJOS, A.F.; KUWABARA, E.F.; NAVARRO-SILVA, M.A. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, 38: 842-843, 2004.

MARINHO, S.C. **Estudo químico, avaliação eletroquímica e atividade larvicida do óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* Lindl frente *Aedes aegypti* (*Linnaeus*, 1762).** João Pessoa-PB, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2009. Tese de Doutorado, 105p.

MENDONÇA, F.A.; SILVA, K.F.; SANTOS, K.K.; RIBEIRO JUNIOR, K.A.; SANT'ANA, A.E. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, 76: 629-636, 2005.

MONTEIRO, O.S. **Caracterização do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl e sua aplicação como atrativo de abelhas *Euglossina*.** João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2008. Tese de doutorado, 148p.

MORSBACH, N.; KOKETSU, M.; GONÇALVES, S.L.; GODOY, R.O.L.; LOPES, D. Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, 1997.

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/SP, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, 2000. Tese de doutorado, 124p.

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

MULLAI, K.; JEBANESAN, A.; PUSHPANATHAN, T. Effect of bioactive fractions of *Citrullus vulgaris* Schrad. leaf extract against *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, 102: 951-955, 2008.

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

PANELLA, N.A.; DOLAN, M.C.; KARCHESY, J.J.; XIONG, Y.; PERALTA-CRUZ, J.; KHASAWNEH, M. Use of novel compounds for pest control: insecticidal and acaricidal activity of essential oils components from heartwood of Alaska yellow cedar. **J Med Entomol**, 42:352-8, 2005.

PARK, I. K.; LEE, S.G.; SHIN, S.C.; PARK, J.D.; AHN, Y.J. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 1866-1870, 2002.

PAVELA, R. Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, 102: 555-559, 2008.

PENIDO, C.; COSTA, K.A.; PENNAFORTE, R.J.; COSTA, M.F.S.; PEREIRA, J.F.G. SIANI, A.C.; HENRIQUES, M.G.M.O. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergeninduced vascular permeability and hyperalgesia. **Inflammation Research**, 54: 295-303, 2005.

PIZARRO, A.P.; OLIVEIRA-FILHO, A.M.; PARENTE, J.P.; MELO, M.T.; SANTOS, C.E.; LIMA, P.R. 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.; QUINARD, E.L.J.; NUNOMURA, S.M.; TADEI, W.P.; HIDALGO, A.F.; PINTO, A.C.S. (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.

POLANCZYK, R.A.; GARCIA, M.O.; ALVES, S.B. Potencial de *Bacillus thuringiensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Rev. Saúde Pública**, 37:813-816, 2003.

PROPHIRO, J.S. **Susceptibilidade de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) a organofosforado e atividade inseticida de produtos de origem botânica.** Curitiba, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, UFPR, 2008. Dissertação de Mestrado, 121p.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end-points. **Amer. J. Hyg.**, 27:493-7, 1938.

SANTOS, R.P.; NUNES, E.P.; NASCIMENTO, R.F.; SANTIAGO, G.M.P.; MENEZES, G.H.A.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L. Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. **J. Braz. Chem. Soc.**, 17(5), 1027-1030, 2006.

SCHIPER, L.P. **Segredos e virtudes das plantas medicinais**. Rio de Janeiro: Reader's Digest Brasil, 1999.

SCHREIER, P. **Analysis of volatiles methods and applications**. Berlin: Walter de Gruyte, 1984. 469p.

SIANI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUSA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O; RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, 16, ano 3, set./out. 2000.

SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G.; SANTOS, R.M.G.S.; RODRIGUES FILHO, E.; ELIAS, C.N. Atividade larvica de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 37:5, 396-399, set./out. 2004.

SILVA, O.S.; Prophiro, J.S.; ROSSI, J.C.N.; KANIS, L.A.; ROMÃO, P.R.T.; BLAZIUS, R.D. Larvicidal effect of andiroba oil *Carapa guianensis* (Meliaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of the American Mosquito Control Association**, 22: 699-701, 2006.

SILVA, W.J. **Atividade larvica do óleo essencial de plantas existentes no Estado de Sergipe contra *Aedes aegypti* Linn.** São Cristóvão-SE, Progamma 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, 2007.

SIMAS, N.K.; LIMA, E.C.; CONCEIÇÃO, S.R; KUSTER, R.M.; OLIVEIRA FILHO, A.M. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvica de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilterpenóides. **Química Nova**, 27:01, 46-49, fev. 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; PETROVICK, L.A.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 2007.

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

TELES, R.M. **Caracterização química, avaliação térmica e análise larvívica do óleo de *Aniba duckei* Kostermans contra *Aedes aegypti***. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2009. Tese de Doutorado, 110p.

TELES, R.M. **Estudo analítico do linalol contido no óleo essencial extraído de galhos da espécie *Aniba duckei* Kostermans e sua aplicação como agente bactericida**. São Luís, Programa de Pós-Graduação em Química, UFMA, 2003. Dissertação de Mestrado, 99p.

THATHEYUS, J.A. Bio control of mosquitoes In: **Defeating the public enemy, the mosquito**: a real challenge. *Loyola*, 76-94, 2007.

WHO, World Health Organization. **International travel and health**. 2010 edition. Disease distribution maps: Dengue. Disponível em: <<http://www.who.int/ith/en>>. Acessado em: 10 nov. 2011.

WIKIMEDIA. ***Aedes aegypti***: larva. Disponível em: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/95/Aedes_aegypti_larva.jpg> Acessado em: 15 ago. 2011.