



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

ANDRESON LEANDRO SANTANA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO
ESSENCIAL DO *Zingiber officinale Roscoe* (GENGIBRE) FRENTE AO
MOSQUITO *Aedes aegypti***

São Luís
2012

ANDRESON LEANDRO SANTANA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO
ESSENCIAL DO *Zingiber officinale Roscoe* (GENGIBRE) FRENTE AO
MOSQUITO *Aedes aegypti***

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

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho

São Luís
2012

ANDRESON LEANDRO SANTANA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO
ESSENCIAL DO *Zingiber officinale Roscoe* (GENGIBRE) FRENTE AO
MOSQUITO *Aedes aegypti***

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

Aprovado em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Víctor Elías Mouchrek Filho
Doutor em Química Analítica
(Orientador)

Prof. Dr. Cícero Wellington Brito Bezerra
Doutor em Química
(Examinador Interno - UFMA)

Prof. Dr. Mariano Ibañez Rojas
Doutor em Química
(Examinador Externo – IFMA/Codó)

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 a FAMÍLIA que tanto amo.

E a meus pais, Raimundo e Ludenir, que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e trabalharam muito para que eu pudesse realizá-los.

AGRADECIMENTOS

Primordialmente, a Deus, responsável pelo dom de viver e por este momento supremo em minha vida.

Aos meus pais, Ludenir e Raimundo, por terem mérito maior pelo que hoje sou; por me compreenderem e me apoiarem em todas as circunstâncias.

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 deste trabalho.

À Prof^a. Especialista Paula Coelho Everton, pela firmeza e confiança que deposita em seus alunos.

À Prof^a Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento pela amizade que nos une. Também, pela convivência descontraída, ensinamentos e ajuda prestada.

Ao Prof Dr. João Mouchrek pela amizade, grande incentivo e pelo exemplo de competência, demonstrando que na vida, com simplicidade encontramos pessoas realmente essenciais.

Aos amigos dos Laboratórios de Microbiologia e de Físico-Química do PCQA e a todos do Pavilhão Tecnológico da UFMA, especialmente à Marlucy, Rayone, Dionei, Karlene, Jackeline e Natale.

Aos colegas e amigos do curso de Mestrado, pelo incentivo e companheirismo, em particular a Inocência, Alexandre, Natale, Sakae, Marluce, Thiessa, Jonas, Darlan e Jeferson.

À minha namorada, Marcia Betânia Lopes Ferreira, pela paciência, companheirismo e compreensão, estando sempre comigo nos momentos de maiores dificuldades.

Aos professores e funcionários da Pós-Graduação em Química da UFMA, pela presteza com que sempre realizaram os seus trabalhos.

Aos amigos e colegas, pelo apoio constante e senso de amizade verdadeira, principalmente a Joseane, Helionaldo e Nilma.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão, FAPEMA, pela concessão da Bolsa.

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais volta ao seu tamanho original”.*

(Albert Einstein)

RESUMO

Na procura pelo controle químico alternativo contra o mosquito *Aedes aegypti*, diversas pesquisas são desenvolvidas e estimuladas no intuito de descobrirem novas substâncias inseticidas de origem vegetal. Neste trabalho a partir da extração e do estudo analítico do óleo essencial dos rizomas do *Zingiber officinale Roscoe*, foi analisado o efeito larvicida do óleo contra larvas em terceiro estágio do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1792). Extraiu-se quantitativamente o óleo essencial por hidrodestilação. Determinaram-se as propriedades físico-químicas do óleo essencial (densidade, índice de refração, solubilidade, cor e aparência). Caracterizou-se analiticamente o óleo por infravermelho (FTIR) e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM). Calculou-se a CL₅₀ do óleo, a partir dos métodos de Reed-Muench (1938) e Pizzi (1950), respectivamente. O rendimento do óleo foi de 0,52% m/v. Foram identificados 18 componentes no óleo, e a presença majoritária do α - zingibereno foi confirmada pelas técnicas espectroscópica. O óleo essencial obteve CL₅₀ de 76,07 ($\pm 2,24$) $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados indicam que o óleo essencial avaliado é composto por substâncias que propiciam efeito larvicida contra *Aedes aegypti*.

Palavras-Chave: Óleo essencial. Rizomas. *Zingiber officinale Roscoe*. Atividade larvicida. *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Looking for the chemical alternative control against the *Aedes aegypti* mosquito, several researches are developed and stimulated aiming discover new insecticide substances of vegetal origin. In this work, from the extraction and analytical study of the essential oil of the rhizomes of the *Zingiber officinale Roscoe*, the larvicidal effect of the oil against larvae in third phase of the mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1792) was analyzed. The essential oil was extracted quantitatively by hydrodistillation. The essential oil physical-chemical proprieties (density, refraction rate, solubility, color and appearance) was determined. The oil was analytically characterized by infra-red (FTIR) and gas chromatography coupled to spectrometer of mass (CG-EM). The oil's CL₅₀ was calculated from the Reed-Muench (1938) and Pizzi (1950) methods, respectively. The oil yield was 0.52% m/v. 18 components were identified in the oil, and the major presence of α -zingiberene was confirmed by the spectroscopic technics. The essential oil got CL₅₀ 76.07 ($\pm 2,24$) $\mu\text{g mL}^{-1}$. The results indicate that the essential oil evaluated is compound by substances that propitiate larvicidal effect against *Aedes aegypti*.

Key-words: Essential oil. Rhizomes. *Zingiber officinale Roscoe*. Larvicidal activity. *Aedes aegypti*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>Zingiber officinale</i> Roscoe: vista geral da planta e do rizoma.....	22
Figura 2 – Algumas estruturas de componentes encontrados no óleo essencial do gengibre (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe)	24
Figura 3 – Mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	28
Figura 4 – Distribuição do <i>Aedes aegypti</i> no mundo em 2011: Países ou área de risco.....	28
Figura 5 – Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	30
Figura 6 – Ovos do <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	31
Figura 7 – Larvas do <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	31
Figura 8 – Pupa do <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).	32
Figura 9 – Extrator de clewenger	37
Figura 10 – Óleo extraído dos rizomas do gengibre.....	37
Figura 11 – Refratômetro	39
Figura 12 – Espectrofotômetro com transformada de Fourier	40
Figura 13 – Armadilha utilizada para a coleta dos ovos do <i>Aedes aegypti</i>	41
Figura 14 – Larvas no terceiro estágio	41
Figura 15 – Cinética referente ao rendimento de extração do óleo em função do tempo, com massa de 400g e temperatura de 100°C.	45
Figura 16 – Espectros da região do infravermelho do óleo essencial do <i>Zingiber officinale</i> Roscoe em estudo.	47
Figura 17 – Cromatograma da amostra do óleo do rizoma do <i>Zingiber officinale</i> Roscoe, apresentando os picos selecionados e identificados através da comparação dos respectivos espectros de massas com a espectroteca.....	49
Figura 18 – Fragmentograma do composto do pico 16 (α -zingibereno) do cromatograma da Figura 17 e sua proposta de identificação. (A) Fragmentograma do óleo essencial do rizoma do gengibre. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca NIST21 do programa.	50
Figura 19 – Fragmentograma do composto do pico 11 (geranial) do cromatograma da Figura 17 e sua proposta de identificação. (A) Fragmentograma do óleo essencial	

do rizoma do gengibre. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca WILEY139 do programa.51

Figura 20 – Fragmentograma do composto do pico 17 (nerolidol) do cromatograma da Figura 17 e sua proposta de identificação. (A) Fragmentograma do óleo essencial do rizoma do gengibre. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca WILEY139 do programa.52

Figura 21 – Fragmentograma do composto do pico 9 (neral) do cromatograma da Figura 17 e sua proposta de identificação. (A) Fragmentograma do óleo essencial do rizoma do gengibre. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca NIST21 do programa.53

Figura 22 – Fragmentograma do composto do pico 18 (β -sesquifelandreno) do cromatograma da Figura 17 e sua proposta de identificação. (A) Fragmentograma do óleo essencial do rizoma do gengibre. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca NIST107 do programa.54

Figura 23 – Taxa de mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* – expostas a oito concentrações diferentes do óleo essencial dos rizomas do *Zingiber officinale* Roscoe, após 24 horas – versus o logaritmo de cada dose aplicada.56

Figura 24 – Estimativa da CL50 do óleo essencial dos rizomas do *Zingiber officinale* Roscoe pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL50 é o ponto de intersecção das duas curvas.57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos dos óleos essenciais de Gengibre.....	46
Tabela 2 – Bandas de absorção do α -zingibereno na região do Infravermelho.	48
Tabela 3– Compostos identificados na amostra do <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	49
Tabela 4- Mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição a várias concentrações do óleo essencial extraído dos rizomas do <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CG	- Cromatografia Gasosa
CL ₅₀	- Concentração letal 50%
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EM	- Espectrometria de Massas
FUNASA	- Fundação Nacional da Saúde
IUPAC	- International Union of Pure and Applied Chemistry
IV	- Infra-Vermelho
mM	- milimolar
ND ^{25°}	- Índice de Refração a 25°C
nm	- nanômetro
OMS	- Organização Mundial de Saúde
ppm	- Partes por Milhão
RMN ¹³ C	- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN ₁ H	- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SE	- Erro padrão
UV	- Ultra-Violeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1 Considerações sobre óleos essenciais	19
2.2 Gengibre (<i>Zingiber officinale Roscoe</i>)	22
2.3 Óleo essencial do Gengibre, <i>Zingiber officinale Roscoe</i>	23
2.4 Aplicabilidade industrial	24
2.5 Técnicas Analíticas	24
2.5.1 Cromatografia Gasosa (CG)	25
2.5.2 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV)	25
2.5.3 Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (CG-EM)	26
2.6 Aspectos sobre o <i>Aedes Aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	27
2.6.1 Ciclo Evolutivo do <i>Aedes aegypti</i>	30
3 OBJETIVOS	34
3.1 Geral	34
3.2 Específicos	34
4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	36
4.1 Obtenção do Óleo Essencial	36
4.1.1 Origem, Coleta e Preparo da Amostra Botânica	36
4.1.2 Extração do óleo essencial	36
4.2 Caracterização Físico-Química	38
4.2.1 Densidade	38
4.2.2 Solubilidade em etanol (70%)	38
4.2.3 Índice de refração	38
4.2.4 Cor e Aparência	39
4.3 Análises Químicas	39
4.3.1 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	39
4.3.2 Análise Espectrométrica Vibracional na Região do Infravermelho	40
4.4 Obtenção e Cultivo das Larvas	40
4.5 Teste de Toxicidade	42
4.5.1 Análise Estatística	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45

5.1 Avaliação da cinética de extração e rendimento dos óleos essenciais ...	45
5.2 Avaliação das características físico-químicas do óleo essencial dos rizomas do <i>Zingiber Officinale Roscoe</i>.....	46
5.3 Análise espectroscópica vibracional na região do Infravermelho.....	47
5.4 Avaliação das características químicas dos óleos essenciais obtidas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas (CG-EM)	48
5.5 Atividade Larvicida.....	55
6 CONCLUSÃO.....	61
7 SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS.....	63
REFERÊNCIAS.....	65

Capítulo 1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Em termos de morbidade e mortalidade, a dengue é considerada atualmente a mais nociva doença viral humana transmitida por mosquitos, sendo um sério problema de saúde pública dos centros urbanos das áreas tropicais da América do Sul, América Central, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental (FUNASA, 2002).

A dengue é uma doença de grande relevância para a medicina, pois é transmitida pelo *Aedes aegypti*, vetor de quatro sorotipos do flavivírus causador da dengue clássico e da febre hemorrágica. Portanto, torna-se necessário 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 estavam sendo adequadamente controladas por aquele produto químico.

Uma alternativa tem sido o uso de plantas, as quais possuem substâncias cujas moléculas possuem ação fagoinibidora, repelente, inseticida, além de serem capazes de alterar a regulação do crescimento. Os óleos essenciais, produzidos no metabolismo secundário das plantas, também têm se apresentado como fontes de materiais com atividade inseticida, larvicida e repelente (COSTA, 2005; MURUGAN et al., 2007).

Nos últimos 30 anos, têm sido aconselhados pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2011) os estudos com extratos de plantas consideradas medicinais (pelo conhecimento popular). A partir de 1978, segundo Soares (2011), a instituição

passou a aconselhar a comunidade científica a intensificar e divulgar os estudos com plantas.

Entre os produtos obtidos de plantas, encontram-se os óleos essenciais de algumas espécies de plantas aromáticas, os quais já são largamente utilizados na indústria para a produção de sabonetes, perfumes e outros produtos de higiene pessoal. Estudos sobre a avaliação das atividades inseticida, bactericida e fungicida dos óleos essenciais de algumas espécies de plantas têm mostrado resultados interessantes, em várias pesquisas pelo mundo todo, e em especial em alguns grupos de pesquisa no Brasil (LEMOS, 1990).

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

Esses extratos 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).

Para o Brasil, pesquisas nesta área têm grande significado. No país, o 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 pelo 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 pode representar uma saída eficiente para esse problema (TELES, 2003).

Nesse contexto, na busca por produtos naturais que possam ser usados como larvicidas contra *Aedes aegypti* no controle da transmissão da dengue, bem como seu uso potencial, foi testado o óleo essencial extraído dos rizomas de uma planta da flora brasileira, o *Zingiber officinale* Roscoe, contra as larvas desse mosquito.

Capítulo 2

Fundamentação Teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Considerações sobre óleos essenciais

A *International Organization for Standardization* (ISO, 2011) 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 prensagem 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 voláteis¹, 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 compostos oxigenados, juntos com outros tipos de substâncias orgânicas. 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.

A constituição química dos óleos essenciais é muito complexa, chegando a algumas centenas de compostos com diferentes funções orgânicas. 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 quantidades (traços).

Alguns 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

¹ 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.

mesma planta podem apresentar composição química, características físico-químicas e odores bem distintos.

Segundo Bakkali *et al.* (2008), os gêneros capazes de elaborar os constituintes que compõem os óleos essenciais estão divididos em várias famílias, tais como: *Myrtaceae*, *Lauraceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Cupressaceae*, *Zingiberaceae*, *Poaceae*, *Myristicaceae*, *Piperaceae*, dentre outras. Geralmente, a síntese e o acúmulo dos óleos essenciais estão associados à presença de estruturas histológicas especializadas, localizadas sobre ou nas proximidades da superfície da planta, tais como em pêlos glandulares (*Lamiaceae*), células parenquimáticas diferenciadas (*Laureaceae*, *Piperaceae*, *Poaceae*), canais oleíferos (*Apiaceae* e *Asteraceae*) ou glândulas secretoras (*Myrtaceae*). Os óleos essenciais podem armazenar-se em todos os órgãos vegetais, tais como: nas flores (laranjeira, bergamoteira), folhas (capim-limão, eucalipto, louro) ou ainda nas cascas dos caules (canelas), madeira (sândalo, pau-rosa), raízes (vetiver), rizomas (cúrcuma, gengibre), frutos (anis-estrelado, funcho, erva doce) ou sementes (noz-moscada) (SIMÕES *et al.*, 2007).

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 são²: enfloração (*enfleurage*), arraste por vapor d'água, extração com solventes orgânicos, prensagem 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.

A conservação dos óleos essenciais, em função da relativa instabilidade das moléculas que os constituem, torna-se difícil, uma vez que podem sofrer diferentes tipos de degradação: fotoisomerização, fotociclicização (citrais), ruptura oxidativa de propenilfenóis, peroxidação de hidrocarbonetos e decomposição de

² Burt (2004) relata que o primeiro autêntico escrito acerca da obtenção de óleo essencial foi por destilação e atribuído ao físico catalão Villanova (que viveu de 1235-1311).

cetonas e álcoois (limoneno), termoisomerização (citrais), dentre outras. Estas degradações podem modificar as propriedades e/ou pôr em dúvida a inocuidade do produto (COSTA, 1994).

Os procedimentos para realização do controle de qualidade de matérias primas vegetais ricas em óleos voláteis são descritos em farmacopéias. Diferentes ensaios podem ser utilizados para a identificação dessas alterações, tais como: avaliação da miscibilidade em etanol, medidas físicas (índice de refração $[\eta]D^{20}$, rotação óptica $[\alpha]D^{20}$, densidade relativa $[d]_{20}$, viscosidade e às vezes ponto de solidificação), determinação de índices de acidez, ésteres do ácido ftálico, em algumas ocasiões, busca de óleos graxos e óleos essenciais resinificados, determinação do resíduo de evaporação, dentre outros. Segundo BRUNETON (2001) a deterioração dos óleos essenciais reduz seu valor comercial, além de constituir um fator de risco quando eles são destinados ao uso externo, já que podem provocar alergias.

Dentre as técnicas utilizadas para separar e quantificar substâncias componentes dos óleos essenciais, a Cromatografia Gasosa (CG) é geralmente a mais utilizada em função do seu alto poder de diferenciação e por ser um método simples usado para separação e quantificação dos componentes de óleos essenciais. No entanto, outros métodos como a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Espectroscopia de Ultravioleta (UV) e Infravermelho (IV) e a Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono 13 (RMN 1H e ^{13}C) também são utilizadas para a análise de óleos essenciais (SIMÕES *et al.*, 2007).

Para ter maior segurança na identificação dos picos e controlar a pureza de um pico cromatográfico, é recomendável analisar um óleo essencial também por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM). Esse método permite como, a CG, a separação dos componentes e fornece, ainda, um espectro de massas para cada pico. O espectro de massa geralmente indica a massa molecular e o padrão de fragmentação. O padrão de fragmentação pode ser comparado com outros constantes da biblioteca de espectros de massas, onde propostas de probabilidade quanto à identidade das substâncias são analisadas (JENNINGS, MITTFELDT, STREMPLE, 1997).

2.2 Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe)

O gengibre, cientificamente conhecido como *Zingiber officinale* Roscoe, foi primeiramente descrito em 1807, pelo botânico inglês William Roscoe. Pertencente à família *Zingiberaceae*, a qual engloba mais de 1.200 espécies de plantas incluídas em 53 gêneros, o gênero *Zingiber*, inclui aproximadamente 85 espécies.

A planta do gengibre é herbácea, perene e produz um rizoma articulado, carnoso, revestido de epiderme rugosa e de cor pardacenta (Figura 1). O rizoma do gengibre apresenta corpo alongado, um pouco achatado, com uma coloração que vai do amarelo couro à marrom brilhante, é estriado na longitudinal, algumas vezes fibroso, com terminações conhecidas como “dedos” que surgem obliquamente dos rizomas. Internamente, de cor marrom-amarelada, apresenta uma endoderme amarela, com numerosos feixes fibrovasculares e abundantes células oleaginosas contendo oleoresina e 0,5% a 1,5% de óleo essencial. Apresenta odor agradável e aromático e sabor fortemente pungente (MAGALHÃES *et al.*, 1997; ZANCAN *et al.*, 2002).

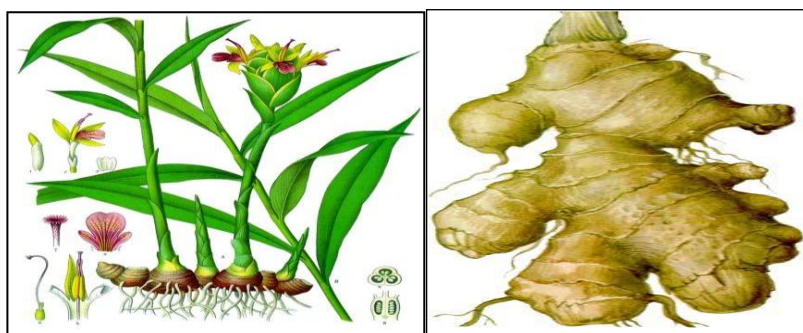


Figura 1 – *Zingiber officinale* Roscoe: vista geral da planta e do rizoma

Fonte: Elpo, (2004)

Segundo Lamas (2011), o gengibre é uma planta herbácea, perene, de cultivo anual, com cerca de 1m de altura, apresentando folhas lineares e sésseis; flores verde-amareladas, rizomas com várias gemas, sabor picante e odor aromático.

O cultivo do gengibre foi introduzido no Brasil logo após o início da colonização européia. No entanto, somente nas últimas décadas, após a introdução de variedades de rizomas gigantes por agricultores japoneses, a cultura do gengibre tornou-se efetivamente comercial no Brasil, especialmente nos litorais de Santa

Catarina, São Paulo e do Paraná. A Índia, China e Nigéria estão entre os principais produtores mundiais de gengibre (ELPO, 2004).

A cultura do gengibre apresenta uma exploração econômica relevante na forma *in natura* (FREITAS, 2006). No entanto, o uso dos rizomas para a obtenção de óleos essenciais, extrato e concentrados de gengibre tem despertado interesse da indústria farmacêutica e cosmética pelos seus princípios ativos (SACCHETTI, 2004; BANDEIRA-PEREIRA et al., 2007).

2.3 Óleo essencial do Gengibre, *Zingiber officinale* Roscoe

Segundo Araújo (1999) o componente majoritário do óleo essencial de gengibre é o zingibereno ($C_{15}H_{24}$) (Figura 2), em média 30% presente no óleo.

Zarate (1992) e colaboradores relatam que a composição do óleo essencial do gengibre pode variar conforme a origem geográfica, secagem, época de colheita e tipo de adubação. Dentre os principais constituintes do óleo essencial do gengibre estão: monoterpenos: (α), (β)-pineno, canfeno, mirceno, limoneno, β -felandreno; sesquiterpenos: zingibereno, curcumeno, β -farneseno, β -cariofileno, bisaboleno, sesquifelandreno; álcoois: 2-butanol, 2-metil-but-3-en-2-ol, citrionelol, zingerenol, β -eudesmol; aldeídos: butanal, 2-metil-butanal, pentanal, citrionelal, neral, geranial; cetonas: gingerona, criptona, carvotanacetona e óxidos como o 1,8-cineol (Figura 2).

Várias propriedades do gengibre foram comprovadas em experimentos científicos, destacando-se as atividades antiinflamatórias, antiemética e antináusea, antimutagênica, antiúlcera, hipoglicêmica, antibacteriana, entre outras. Além das propriedades terapêuticas, o gengibre é usado também na culinária como condimento ou no preparo de bebidas tais como a ginger beer e, principalmente na forma de chás (HABSAH et al., 2000; DEDOV et al., 2002).

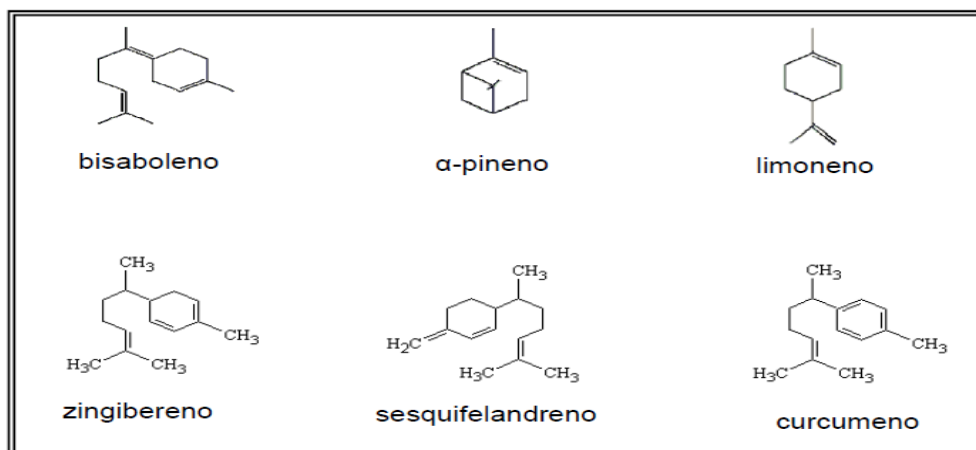


Figura 2 – Algumas estruturas de componentes encontrados no óleo essencial do gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*)

Fonte: Afzal *et al.*, (2001)

As plantas da família *Zingiberaceae*, em geral, apresentam ingredientes pungentes, os quais provocam a sensação de ardência, tais como o 6-gingerol e 6-paradol, os quais possuem efeito antitumoral, analgésico, antipirético, atividade anti-hepatotóxica e antinauseante (GRÉGIO *et al.*, 2006). Cai *et al.*, (2004) citaram o efeito antioxidante de 112 ervas chinesas, dentre elas o gengibre, evidenciando a potencial aplicação desta especiaria como fonte de antioxidantes naturais. Teske e Trentini (1995) relataram que o óleo essencial de gengibre é fototóxico; portanto, nunca se deve usá-lo e expor o corpo ao sol. Usar com moderação em massagens e banhos aromáticos, evitando alergias em peles sensíveis.

2.4 Aplicabilidade industrial

As indústrias utilizam os óleos essenciais para conferir aromas especiais em inúmeros produtos, tais como perfumes, cosméticos, sabonetes, condimentos etc. (BERNALE, 1984; CLAY, 1993; FUH, 1996; ROBLES, 1998). Também para mascarar odores desagradáveis em ambientes de trabalho e instalações sanitárias, e muito usadas como insumos em diversos produtos das indústrias de plásticos, tintas, borrachas, inseticidas e outras (COSTA, 1975; KALIL FILHO, 2000).

2.5 Técnicas Analíticas

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.

2.5.1 Cromatografia Gasosa (CG)

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

2.5.2 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV)

Como alternativa para avaliações cromatográficas de compostos voláteis, podem ser usadas técnicas que proporcionam informação direta acerca da composição de uma amostra particular sem prévia separação dos componentes, isto é, os métodos espectroscópicos.

A espectroscopia na região do infravermelho pode ser usada para obter informações acerca dos grupos funcionais da composição dos óleos essenciais, principalmente grupos contendo oxigênio, uma vez que as vibrações moleculares são perceptíveis nessa região do espectro. Apesar de ser uma técnica altamente sensível, é pouco seletiva no caso de misturas de multicomponentes, e difícil para fazer medidas quantitativas de concentrações de componentes individuais (RALPH, 1983).

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) é uma das ferramentas mais comuns para a identificação de compostos orgânicos e inorgânicos puros, pois, com exceção de poucas moléculas homonucleares (como O_2 , N_2 e Cl_2), todas as espécies moleculares absorvem radiação no IV. A intensidade de absorção é uma função da variação do momento de dipolo envolvido na vibração (CRACKER; SIMON, 1987).

Duas categorias básicas de vibrações moleculares são conhecidas: as vibrações de deformações axiais e as de deformações angulares. Uma vibração de deformação axial (estiramento) envolve uma mudança contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos. Vibrações de deformação angular são caracterizadas pela mudança no ângulo entre duas ligações. O espectro IV é obtido depois que uma transformação de Fourier converte o interferograma do domínio do tempo à forma mais familiar do domínio de frequências. O interferograma é uma série oscilatória de combinações destrutivas ou construtivas, resultando de uma variação completa de comprimentos de onda (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

2.5.3 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 sequências 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).

2.6 Aspectos sobre o *Aedes Aegypti* (Linnaeus, 1762)

A dengue, infecção viral transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, é considerada uma das maiores preocupações mundiais de Saúde Pública. A enfermidade apresenta ampla incidência nos países tropicais e subtropicais, e estima-se que aproximadamente 1,3 bilhões de pessoas estejam em risco de serem infectadas com o vírus da dengue (WHO 2004).

O mosquito *Aedes aegypti* L. é o principal inseto transmissor da dengue nos países tropicais (Figura 3). É doméstico e antropofílico, com atividade hematofágica diurna e utiliza-se preferencialmente de depósitos artificiais de água limpa para colocar seus ovos (CDC, 2011).



Figura 3 – Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)
Fonte: Arbovírus, 2011.

Nas Américas, o *Aedes aegypti*, é responsável por frequentes epidemias e a circulação dos quatro sorotipos do vírus no continente (WHO 1997).

A distribuição do *Aedes aegypti* no mundo em 2011 mostrando países e suas áreas de risco onde há uma maior concentração do mosquito transmissor (Figura 4).

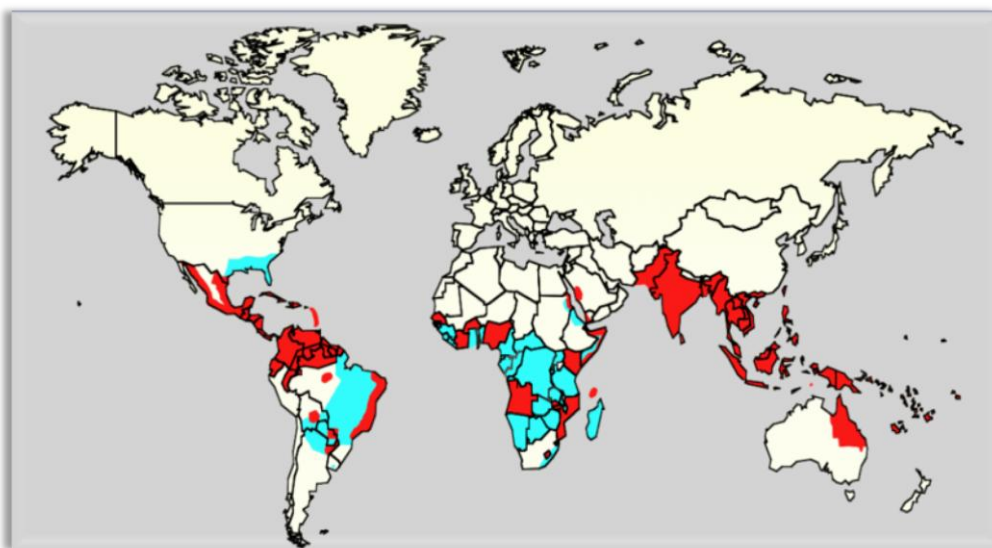


Figura 4 – Distribuição do *Aedes aegypti* no mundo em 2011: Países ou área de risco.
Fonte: Arbovírus, 2011.

No Brasil, um levantamento realizado pelo ministério da saúde permitiu identificar onde estão concentrados os focos de reprodução do mosquito transmissor. Nos municípios em situação de risco, mais de 3,9% dos imóveis pesquisados apresentaram larvas do mosquito. Já nas cidades em situação de alerta, o índice de infestação é de 1% a 3,9% e, no caso das cidades com baixo risco, o índice fica abaixo de 1% (PORTAL DA SAÚDE, 2012).

O *Aedes aegypti* é um vetor oriundo do continente africano (CHIARAVALLOTTI-NETO, 1997), trazido juntamente com os escravos (CHIEFFI, 1985). Foi erradicado do Brasil pela primeira vez em 1958, mas, em 1967, reapareceu em São Luís e Belém, sendo em seguida eliminado (FRANCO, 1976). Em 1976, com origem em um foco em Salvador, inicia-se a recolonização no Brasil.

Em 1977, foi encontrado no Rio de Janeiro e Santos; em 1979, em Natal, e em 1981, no Paraná (MARQUES, 1985; NEVES *et al.*, 1995). Durante esses anos, as medidas de controle eram esporádicas e isoladas. Isso fez com que em 1985-1986, o *Aedes aegypti* fosse encontrado em praticamente em todos os estados brasileiros (NEVES *et al.*, 1995).

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).

Nas regiões Norte e Centro-Oeste, a maior presença do mosquito da dengue está concentrada no lixo. Já no Sudeste e no Sul, a concentração está nos depósitos domiciliares (pratinhos de plantas, calhas, entre outros locais). No Nordeste, o problema é com os depósitos de águas, principalmente as caixas d'água (PORTAL DA SAÚDE, 2012).

Segundo o Portal da Saúde (2012), dos sorotipos virais, 1.537 amostras foram inoculadas em todo o país sendo que 219 foram consideradas positivas. A proporção de amostras positivas demonstra um equilíbrio nos isolamentos dos sorotipos DENV 4 (46%) e DENV1 (51%). O sorotipo DENV 2 foi isolado em baixa proporção (3%) e o DENV 3 não foi identificado na amostra. Foi observada uma maior predominância do DENV 4 nas regiões Norte e Nordeste e nas regiões Sudeste, Centro Oeste e Sul o predomínio do DENV 1.

2.6.1 Ciclo Evolutivo 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 em duas fases ecológicas distintas e interdependentes: a aquática com três etapas de desenvolvimento (o ovo, a larva e a pupa) e a terrestre que corresponde ao mosquito adulto (Figura 5).

A duração do ciclo de vida, em condições favoráveis (oferta de alimentos e temperatura) é de aproximadamente 10 dias, a partir da ovoposição até a fase adulta (USP, 2011).

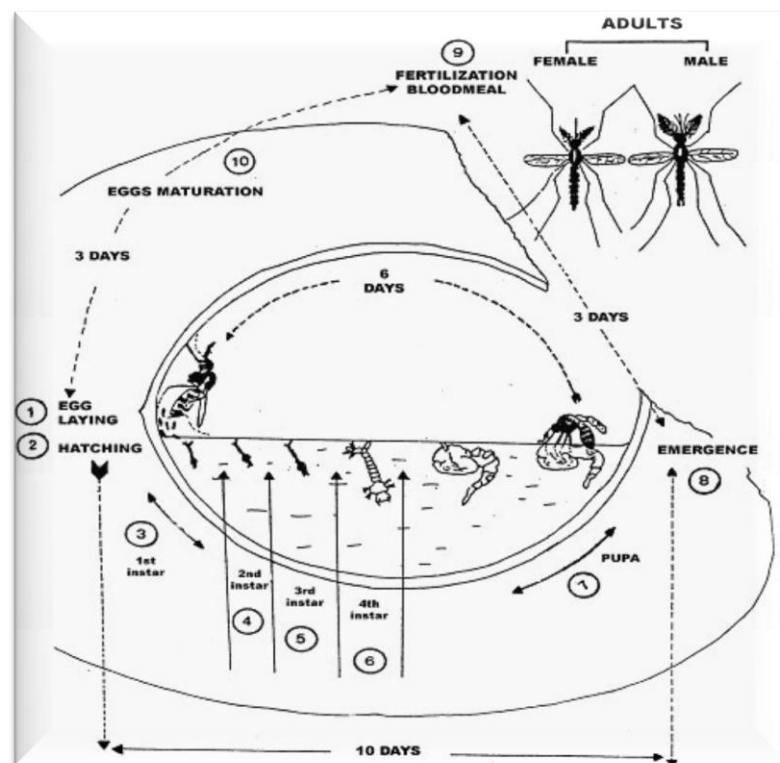


Figura 5 – Ciclo de vida do *Aedes aegypti*
Fonte: Arbovírus, 2011.

a) Ovo: O ovo (Figura 6), mede aproximadamente 1mm de comprimento, com contorno alongado e fusiforme.

Os ovos são depositados pelas fêmeas, fora da água, mas próximos da superfície, ficando aderidos a superfície dos recipientes.



Figura 6 – Ovos do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)
Fonte: Arbovírus, 2011

Os ovos são incubados por 2 a 3 dias, em condições de elevados níveis de umidade e temperatura. Após este período estarão prontos para eclodir.

Os ovos são mais resistentes à dessecação após o final do desenvolvimento embrionário, podendo persistir por 6 a 8 meses.

b) Larva: nesta fase o *Aedes aegypti* (Figura 7) possui aspecto vermiforme, sifão curto, grosso e mais escuro que o corpo e possui quatro estágios evolutivos. As larvas são providas de grande mobilidade e têm como função primária o crescimento. Alimentam-se de substâncias orgânicas, bactérias, fungos e protozoários existentes na água. As larvas não toleram elevadas concentrações de matéria orgânica. Em boas condições (temperatura de 25°C a 29°C e oferta de alimentos) a fase larval dura de 5 a 10 dias, mas pode se prolongar por algumas semanas dependendo das condições da água.



Figura 7 – Larvas do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).
Fonte: Arbovírus, 2011.

c) Pupa: é o último estágio da fase aquática (Figura 8) 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. A pupa não se alimenta, apenas respira e é dotada de boa motilidade. Raramente é afetada por ação de larvicida. Em condições favoráveis a duração da fase pupal é de 2 dias.



Figura 8 – Pupa do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).
Fonte: Arbovírus, 2011.

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 3). 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

Extrair, caracterizar e avaliar a atividade larvícida do óleo essencial *Zingiber officinale* Roscoe (Gengibre) frente ao mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).

3.2 Específicos

- a) Coletar e identificar botanicamente o *Zingiber officinale* Roscoe (Gengibre);
- b) Determinar as propriedades físico-químicas do óleo essencial;
- c) Caracterizar quimicamente e quantificar os componentes majoritários do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e espectroscopia vibracional na região do infravermelho;
- d) Calcular a CL_{50} do óleo essencial a partir do teste de toxicidade (atividade larvícida frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti*).

A blue rectangular box with a gradient from dark blue at the top to light blue at the bottom.

Capítulo 4

Metodología Experimental

4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Físico-Química do Pavilhão Tecnológico, Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Central Analítica da Unicamp, Central Analítica da UFMA, Núcleo de Combustível, Catálise e Ambiental (NCCA).

Esta pesquisa envolveu a utilização de vários equipamentos e a metodologia adotada envolveu atividades usuais em um tratamento analítico e em análises físico-químicas, espectroscopia vibracional na região do infravermelho e cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas para a caracterização do óleo essencial do rizoma do *Zingiber officinale* Roscoe. Realizou-se o teste de atividade larvícida calculando-se a CL_{50} segundo o método Reed-Muench (COLEGATE e MOLYNEUX, 1993).

4.1 Obtenção do Óleo Essencial

4.1.1 Origem, Coleta e Preparo da Amostra Botânica

Os rizomas de gengibre foram obtidos em supermercado da rede varejista de São Luís, identificados como *Zingiber officinale* Roscoe, registrado no Herbário Ático Seabra (SLS) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) sob o número de registro 1125 e levados ao laboratório de Físico-Química de Alimentos do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), para extração do óleo essencial.

4.1.2 Extração do óleo essencial

Para a extração do óleo essencial do *Zingiber Officinale* Roscoe 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 (Figura 9). A cada rotina de extração do óleo essencial, foram pesadas 400g dos rizomas e a seguir triturados com água destilada na proporção 1:10 e colocadas em um 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 Na_2SO_4 anidro. Essas operações foram realizadas em triplicatas e as amostras armazenadas em ampolas de vidro âmbar sob refrigeração para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis. Posteriormente esses óleos foram submetidos às análises (Figura 10).



Figura 9 – Extrator de Clevenger



Figura 10 – Óleo extraído dos rizomas do gengibre.

O rendimento do óleo essencial foi expresso em % na relação massa/volume pela medida da densidade, observando o volume (mL) de óleo essencial obtido após a extração do óleo por massa (g) de material vegetal, conforme a fórmula descrita abaixo (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 1996; FABROWSKI, 2002).

$$\left[\%R = \frac{V(mL) \times d}{m(g)} \times 100 \right] \quad (1)$$

Onde:

V = volume de óleo após processo de extração;

d = densidade do óleo;

m = massa em gramas da planta

4.2 Caracterização Físico-Química

As propriedades físico-químicas do óleo essencial determinadas foram: densidade, solubilidade em etanol a 70% v/v, índice de refração, cor e aparência.

4.2.1 Densidade

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

4.2.2 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.

4.2.3 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 (Figura 11).



Figura 11 – Refratômetro

4.2.4 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.

4.3 Análises Químicas

Utilizaram-se as técnicas de Cromatografia a Gás Acoplada a Espectrometria de Massas e Análise Espectrométrica Vibracional na Região do Infravermelho.

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

As análises por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas por impacto de elétrons e analisador íon trap (CG-EM-IE-Ion trap), foram realizadas em equipamento Varian 2100, utilizando hélio como gás de arraste com fluxo na coluna de 1 mL min^{-1} ; temperatura do injetor: 270°C , split 1:50; coluna capilar ($15\text{ m} \times 0,25\text{ mm}$) com fase estacionária VF-1ms (100% metilsiloxano $0,25\mu\text{m}$) e programação de temperatura do forno de 60 a 200°C com taxa de aquecimento de $8^{\circ}\text{C min}^{-1}$, e de 200 a 290°C com taxa de aquecimento de $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$. No Espectrômetro de Massas as temperaturas do manifold, ion trap e da linha de transferência foram de 50°C , 190°C e 200°C , respectivamente. Foram injetadas

alíquotas de 1,0 μL (injetor automático CP-8410) das amostras diluídas na proporção de 20 μL em 1,5mL de hexano.

4.3.2 Análise Espectrométrica Vibracional na Região do Infravermelho

Analisou-se o óleo essencial por infravermelho no espectrômetro IR PRESTIGE-21, FOURIER TRANSFORM INFRARED ESPECTROPHOTOMETER SHIMADZU (Figura 12). As amostras foram analisadas diretamente em janelas de KBr.



Figura 12 – Espectrofotômetro com transformada de Fourier

4.4 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 de aproximadamente 20cmx5cm com uma parte imersa e outra não (Figura 13). 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 13 – Armadilha utilizada para a coleta dos ovos do *Aedes aegypti*.
Fonte: Teles, 2003.

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 estágio do desenvolvimento (Figura 14), 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.

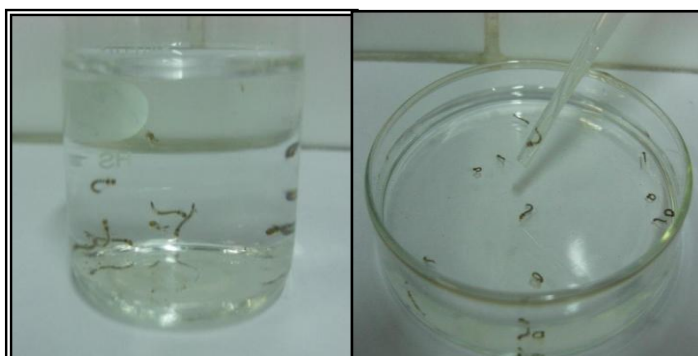


Figura 14 – Larvas no terceiro estágio

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.

4.5 Teste de Toxicidade

Para realização do teste de toxicidade, as larvas selecionadas no terceiro estágio (Figura 14) foram transferidas para um béquer contendo 20mL de água mineral (26-28°C). Dez 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 temephos 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 (tensoativo hidrofílico que facilita a aplicação em emulsões do tipo óleo em água). 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.

4.5.1 Análise Estatística

Após os testes, montou-se uma tabela com os valores das oito concentrações, logaritmo 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% (CL₅₀), 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 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: $(SE)^2 = 0,79 \times h \times R/20$. Finalmente, o valor do intervalo de confiança é igual 2×10^{SE} .

Capítulo 5

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da cinética de extração e rendimento dos óleos essenciais

A determinação das condições de extração de óleos voláteis é uma etapa muito importante por ser um fator determinante na relação entre a composição química e a qualidade do óleo extraído.

Segundo Mouchrek Filho (2000), o tempo de extração do óleo essencial é um dos principais parâmetros físico-químicos da indústria de essências, no que se refere à qualidade e à natureza econômica. 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).

O trabalho de extração do óleo essencial estudado foi realizado num tempo de 5 horas, para uma massa de 400 g/amostra e volume de 4 litros, com uma temperatura de 100°C. Pode-se observar o tempo máximo de extração dos óleos (Figura 15).

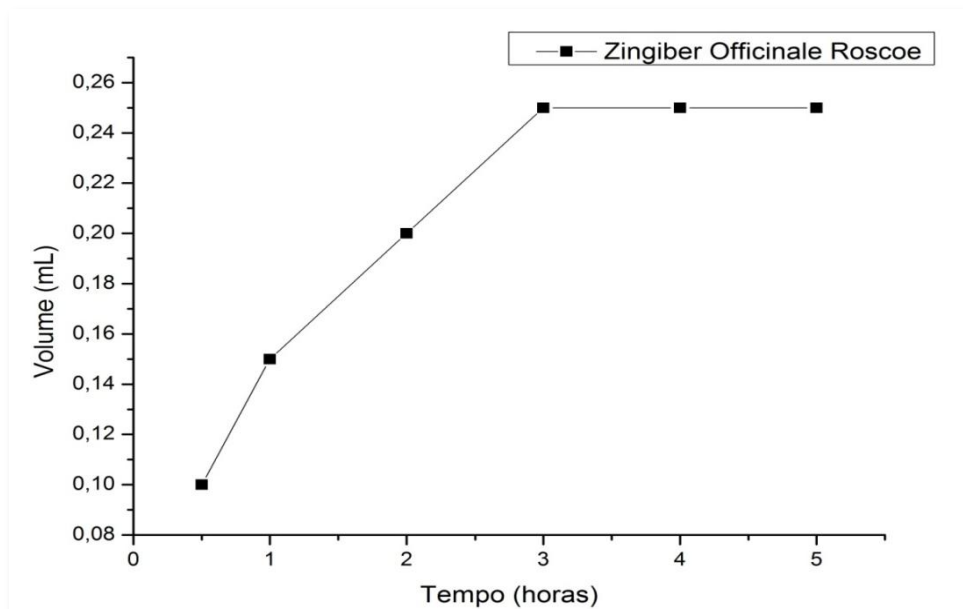


Figura 15 – Cinética referente ao rendimento de extração do óleo em função do tempo, com massa de 400g e temperatura de 100°C.

A Figura 15 mostra que os tempos máximos de rendimento dos óleos essenciais em estudos e dos volumes obtidos, com relação ao tempo do rizoma de

Zingiber officinale Roscoe foi de 3,5 horas, para um volume de 0,25mL.

O rendimento da extração foi calculado diante da quantidade de óleo que se obteve a partir de uma determinada massa do vegetal. Neste experimento partiu-se de uma massa de 400 g dos rizomas do *Zingiber officinale* Roscoe sendo obtido em média 0,25 mL de óleo. O rendimento m/v foi de 0,52% e a densidade encontrada é de 0,8280 g.mL⁻¹ (Tabela 1).

Ao extrair o óleo essencial do rizoma do gengibre, Martins (2010), obteve um rendimento de 0,37% para um tempo de 4 horas, Tripathi, Dubey e Shukla (2008) de 0,8% e Maia, Bovi e Duarte (1991) num tempo de 7 horas ficou no intervalo de 0,56-0,92%. Os volumes extraídos do óleo essencial estudado em relação aos da literatura estão bem próximos.

Conforme Özcan e Chalchat (2002), a variação sazonal e a localidade são fatores importantes para diferentes variedades de plantas com relação aos rendimentos de extração encontrados na literatura.

5.2 Avaliação das características físico-químicas do óleo essencial dos rizomas do *Zingiber Officinale* Roscoe

Os parâmetros físico-químicos do óleo essencial são importantes na determinação e controle da qualidade. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos dos óleos essenciais de Gengibre

Propriedades Físico-Químicas	Óleo essencial estudado
Densidade (g/mL) (25°C)	0,8280
Solubilidade em álcool 70% (v/v)	1:5
Índice de refração (N _D ^{25°})	1,4830
Rendimento (%)	0,52
Cor	Amarelo
Aparência	Límpido

Investigando os componentes do óleo extraído dos rizomas do gengibre, foi encontrado para densidade valores no intervalo de 0,8282-0,9714g/mL (Miyazawa e Kameoka, 1988; Fernandes 2010; Martins, 2010). Já o índice de refração, os valores encontrados para esta análise foram no intervalo de 1,4826-1,5101 (Fernandes, 2010; Martins, 2010; Tripathi, Dubey e Shukla, 2008). No que

diz respeito à solubilidade em álcool 70%, cor e aparência, os valores obtidos nesse estudo para estas análises, tiveram valores idênticos aos da literatura.

Comparando os valores para o óleo essencial estudado com os da literatura, pode-se observar que há uma similaridade entre eles, no que diz respeito aos parâmetros analisados. As pequenas diferenças nos valores encontrados podem ser atribuídas a fatores tais como época de coleta, diferentes tipos de solo, condições e tempo de armazenamento.

5.3 Análise espectroscópica vibracional na região do Infravermelho

A espectrometria na região do infravermelho é uma importante técnica de caracterização de compostos orgânicos, pois é capaz de reconhecer as mudanças estruturais em diferentes compostos. Esta se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula.

Os espectros na região do infravermelho do óleo essencial extraído do rizoma do gengibre em estudo e do óleo do gengibre retirado da literatura podem ser observados na figura 16, onde as bandas de absorção possuem as mesmas frequências.

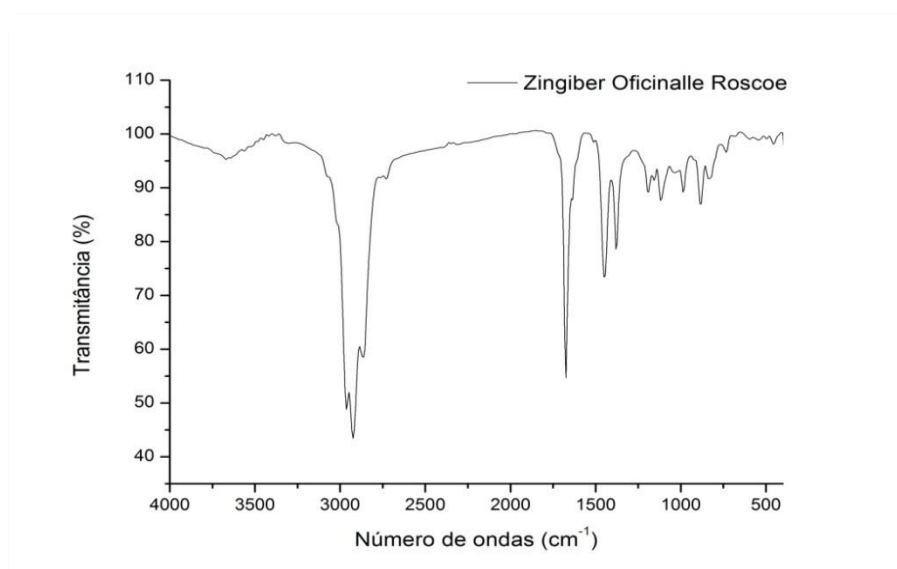
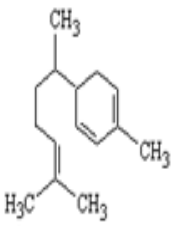


Figura 16 – Espectros da região do infravermelho do óleo essencial do *Zingiber officinale Roscoe* em estudo.

A Tabela 2 apresenta o número de ondas dos principais estiramentos do óleo essencial de *Zingiber officinale Roscoe*.

Tabela 2 – Bandas de absorção do α -zingibereno na região do Infravermelho.

Composto (zingibereno)	Tipo de deformação	Grupo Funcional	Tipo de ligação	Absorção zingibereno (cm^{-1})	Absorção do óleo (cm^{-1})
 α -zingibereno	Estiramento de forte intensidade	Alcanos	C – H	3000-2850	3000-2850
	Estiramento de média intensidade	Alcenos	C = C	1680-1600	1680-1600
	Estiramento de média intensidade	Alcanos	- CH ₃	1450-1375	1450-1375
	Estiramento fora do plano	Alcenos	= C - H	1000-650	1000-650

Fonte: SILVERSTEIN et al., 2007

A Figura 16, mostra as bandas de absorção na região de $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ que são atribuídas a estiramentos C-H fortes resultantes de vibrações de alquenos. Na região compreendida entre $1000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$, é decorrente de uma deformação angular simétrica do plano de =C-H de alquenos (SILVERSTEIN et al., 2007).

5.4 Avaliação das características químicas dos óleos essenciais obtidas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas (CG-EM)

O cromatograma do óleo essencial do *Zingiber officinale Roscoe* obtidos mostram os componentes majoritários e alguns minoritários.

Os espectros obtidos na CG/EM, a comparação com os dados da biblioteca do instrumento e a dedução dos fragmentos dos compostos voláteis no óleo essencial extraído do rizoma de *Zingiber officinale Roscoe* podem ser observados na Figura 17.

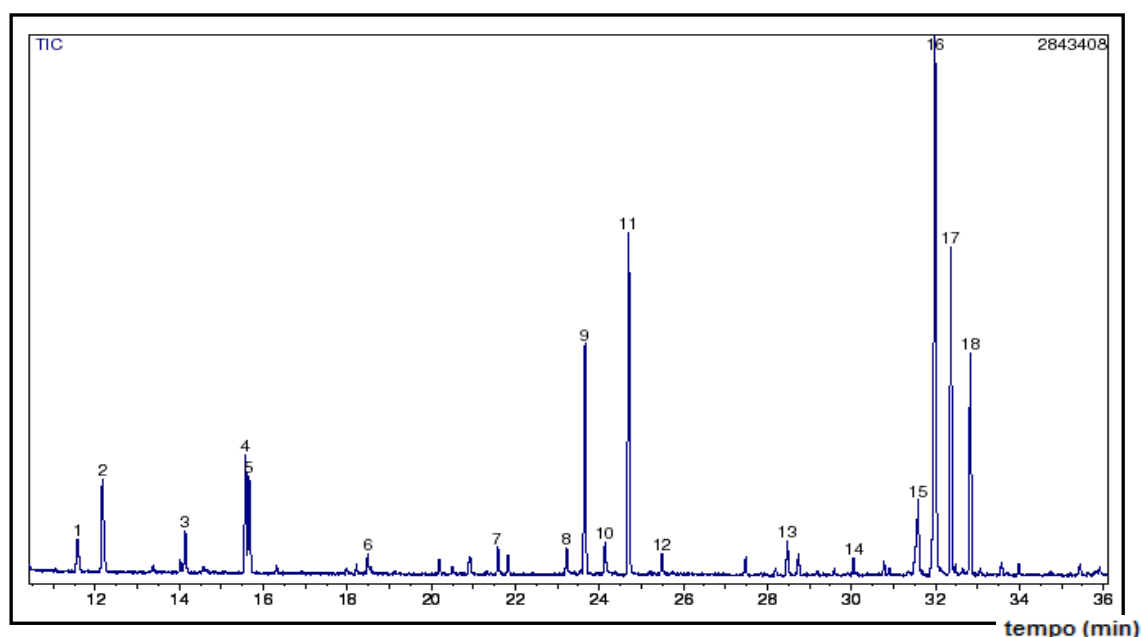


Figura 17 – Cromatograma da amostra do óleo do rizoma do *Zingiber officinale* Roscoe, apresentando os picos selecionados e identificados através da comparação dos respectivos espectros de massas com a espectroteca.

Na Tabela 3, pode-se observar os constituintes identificados no óleo essencial do *Zingiber officinale* Roscoe em ordem de tempo de retenção.

Tabela 3– Compostos identificados na amostra do *Zingiber officinale* Roscoe.

Pico ¹	tr ² (min.)	Componentes	% A ⁴	Qualidade ⁴
1	11,52	α -Pineno	1,46	-
2	12,17	Canfeno	5,02	90
3	14,14	β -Mirceno	1,29	86
4	15,76	Sabineno	5,23	91
5	15,66	1,8-Cineol	4,35	83
6	18,48	Linalol	0,50	-
7	21,59	4,4-Dimetil-2-pentinal	0,80	78
8	23,22	terc-Dodeciltiol	0,71	79
9	23,65	Neral	9,64	94
10	24,13	Nerol	1,07	90
11	24,70	Geranial	14,06	95
12	25,48	2-Undecanona	0,63	89
13	28,47	Farnesol	1,27	74
14	30,05	1,1-Diciclopropiletileno	0,55	74
15	31,59	ar-Curcumeno	3,33	87
16	31,99	α-Zingibereno	27,14	92
17	32,37	Nerolidol	13,51	92
18	32,83	β-Sesquifelandreno	9,45	92

Nota: ¹Número do pico pela ordem de eluição da coluna; ²tr: Tempo de retenção dos composto na coluna em minutos; %A⁴: Porcentagem da área normalizada a qual indica a distribuição relativa dos componentes na amostras e Qualidade⁴: índice de pesquisa na base de dados que reflete a similaridade do espectro de massas obtido com os registros nas bibliotecas utilizadas.

O constituinte majoritário do óleo foi o α -zingibereno (sesquiterpeno) com 27,14%, seguido pelo geranial (monoterpeno oxigenado) com 14,06%, nerolidol (sesquiterpeno) com 13,51%, neral (monoterpeno oxigenado) com 9,64%, sesquifelandreno com 9,45%, sabineno (monoterpeno hidrocarbono) com 5,23%, canfeno (monoterpeno hidrocarbono) com 5,02%, 1,8-cineol (monoterpeno oxigenado) com 4,35%, ar-curcumeno (sesquiterpeno) com 3,33%, α -pineno (monoterpeno) com 1,46%, do β -mirceno (monoterpeno) com 1,29%, farnesol com 1,27%, nerol (monoterpeno) com 1,07%, 4,4-dimetil-2-pentinal com 0,80%, terc-dodeciltiol com 0,71%, 2-undecanona com 0,63%, 1,1-diciclopropiletileno com 0,55% e linalol (monoterpeno) com 0,50%.

Nas Figuras 18-22 podem ser observados os fragmentogramas correspondentes aos cinco constituintes majoritários identificados no óleo essencial do gengibre.

A Figura 18 mostra o fragmentograma referente ao componente majoritário, no qual, o íon molecular $[M^+]$ apresenta a relação $m/z = 204$, confirmando a fórmula $C_{15}H_{24}$, que caracteriza o composto como zingibereno (ADAMS, 1995).

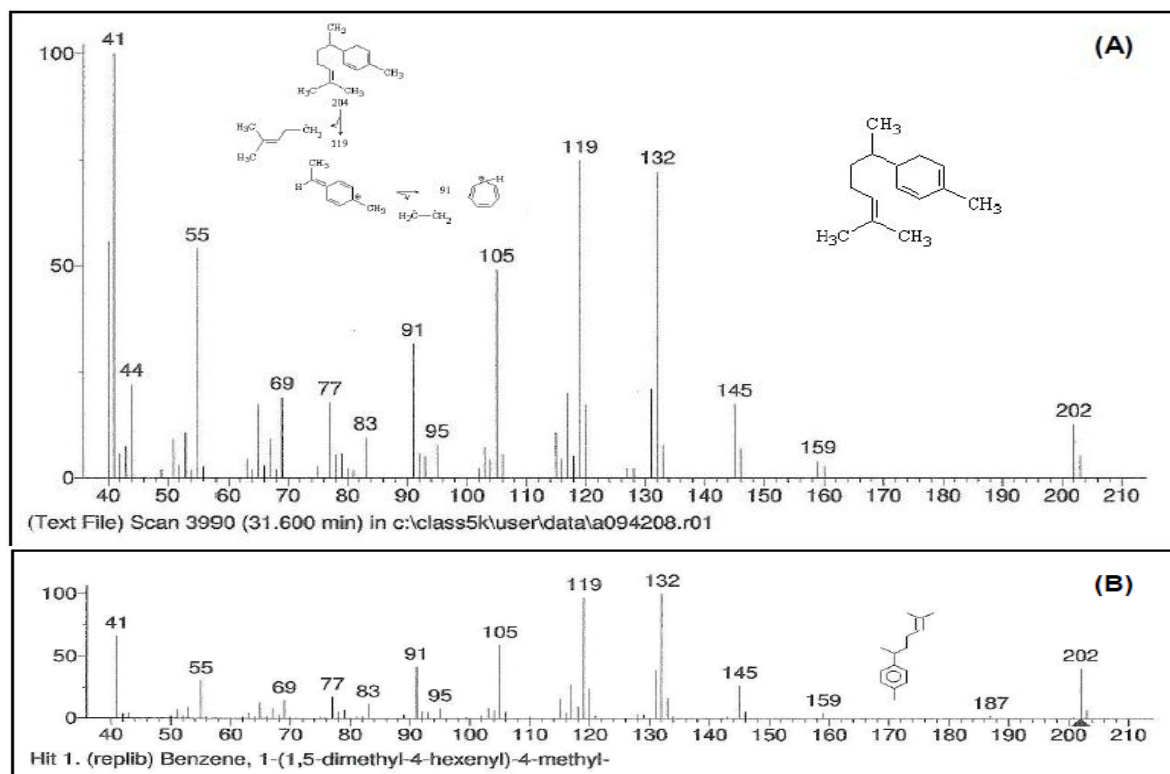


Figura 18 – Fragmentograma do composto do pico 16 (α -zingibereno) do cromatograma da Figura 17 e sua proposta de identificação. (A) Fragmentograma do óleo essencial do rizoma do gengibre. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca NIST21 do programa.

O pico intenso em $m/z = 119$ [$M - 85$] caracteriza a perda do grupamento hexil (C_6H_{13}) radical monovalente derivado da molécula de hexano presente na fórmula estrutural do zingibereno. Enquanto, o pico em $m/z = 91$ indica a formação de um anel de benzeno com cadeia lateral alquila. O íon de massa 91 é denominado de cátion tropílio (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

A Figura 19 é referente ao fragmentograma do geranial, o pico do íon molecular $m/z = 152$ [M^+], confirmando como $C_{10}H_{16}O$ a fórmula do geranial.

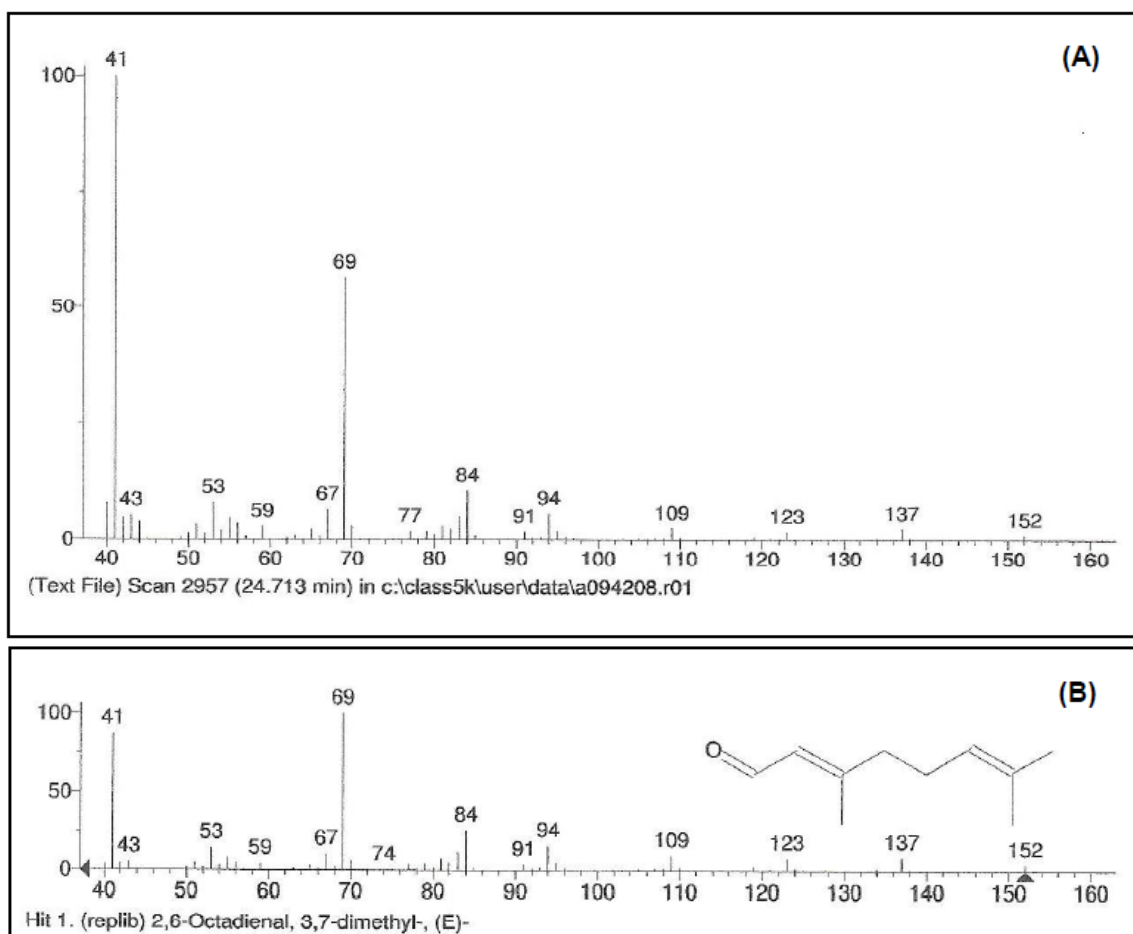


Figura 19 – Fragmentograma do composto do pico 11 (geranial) do cromatograma da Figura 17 e sua proposta de identificação. (A) Fragmentograma do óleo essencial do rizoma do gengibre. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca WILEY139 do programa.

A Figura 20 mostra o fragmentograma referente ao nerolidol. O pico do íon molecular $m/z = 222$, equivale a $C_{15}H_{26}O$ a fórmula molecular do nerolidol.

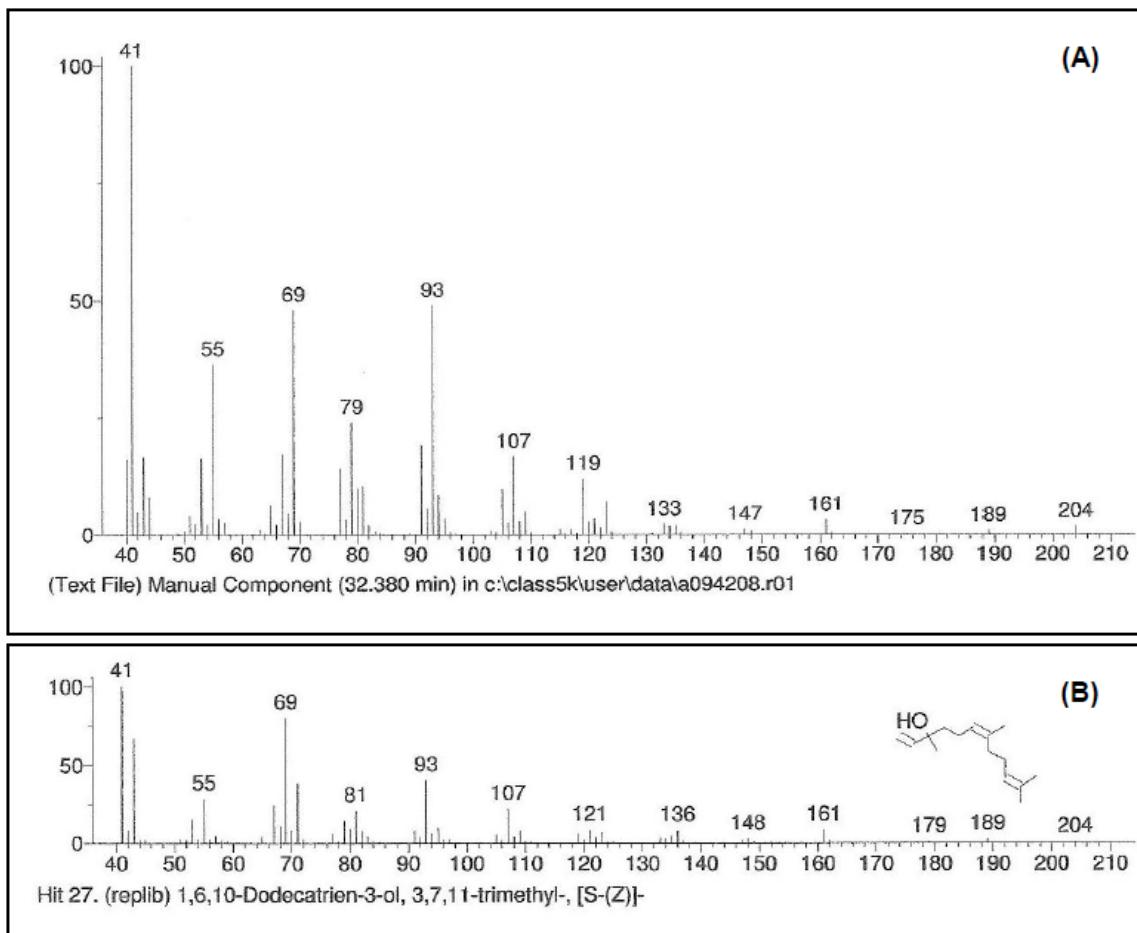


Figura 20 – Fragmentograma do composto do pico 17 (nerolidol) do cromatograma da Figura 17 e sua proposta de identificação. (A) Fragmentograma do óleo essencial do rizoma do gengibre. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca WILEY139 do programa.

A ausência do pico do íon molecular no espectro pode ser em decorrência da instabilidade desse álcool. O pico $m/z = 204$ $[M - 18]$ é provavelmente resultante da perda de uma molécula de H_2O .

A Figura 21 representa o fragmentograma do neral. Percebe-se que o pico do íon molecular $m/z = 152 [M^+]$ (o qual não aparece no espectro por causa da sua instabilidade), corresponde à fórmula $C_{10}H_{16}O$ identificado como sendo o neral. O pico 137 $[M^+ - 15]$ corresponde à perda de uma metila (CH_3).

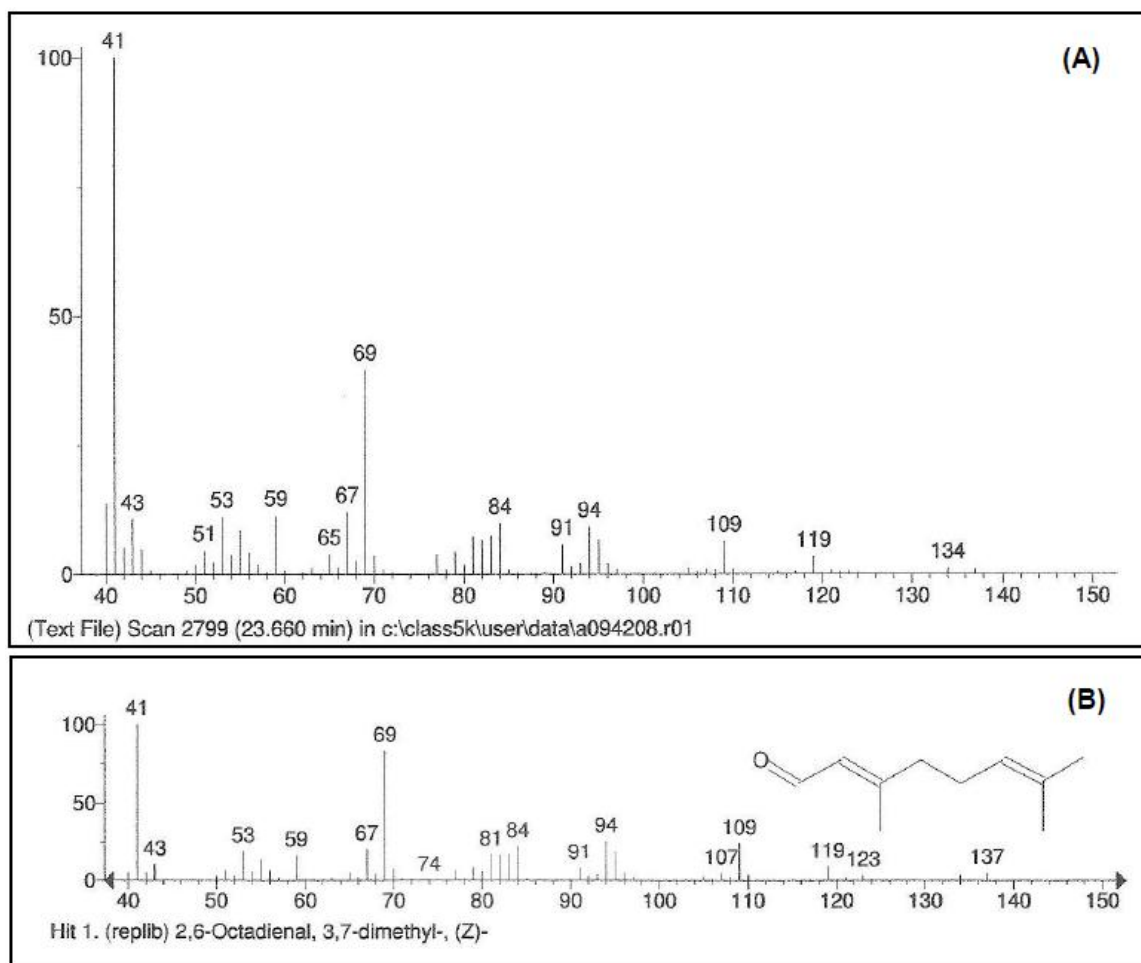


Figura 21 – Fragmentograma do composto do pico 9 (neral) do cromatograma da Figura 17 e sua proposta de identificação. (A) Fragmentograma do óleo essencial do rizoma do gengibre. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca NIST21 do programa.

A Figura 22 refere-se à fórmula molecular $C_{15}H_{24}$ relativa ao β -sesquifelandreno, onde pode ser observado o pico do íon molecular $m/z = 204$.

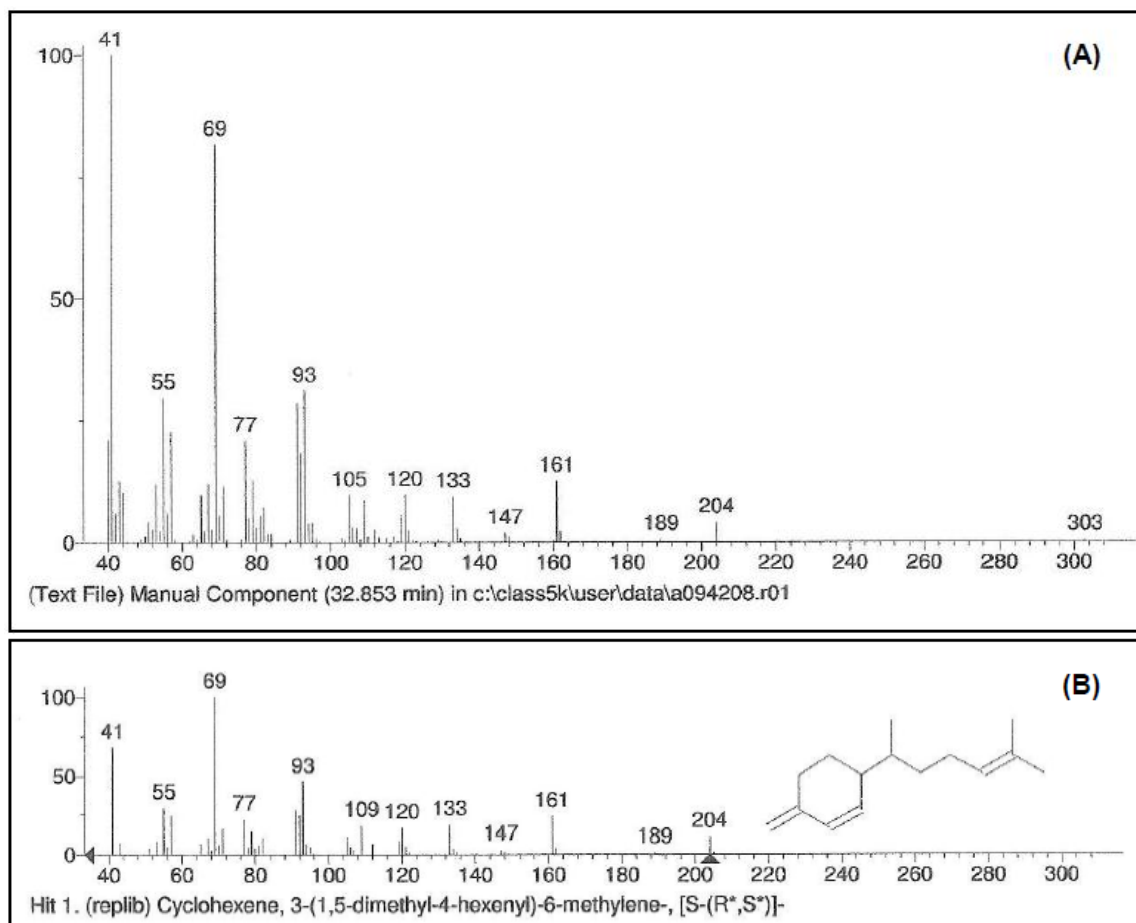


Figura 22 – Fragmentograma do composto do pico 18 (β -sesquifelandreno) do cromatograma da Figura 17 e sua proposta de identificação. (A) Fragmentograma do óleo essencial do rizoma do gengibre. (B) Proposta de identificação segundo a espectroteca NIST107 do programa.

Os resultados encontrados na presente pesquisa quanto à composição química do óleo essencial do gengibre revelaram que os mesmos foram semelhantes aos obtidos por Onyenekwe e Hashimoto (1999) que ao analisarem a composição do óleo essencial do gengibre nigeriano constataram que o zingibereno foi o componente majoritário com 29,54% do total do óleo. Outros compostos como o β -sesquifelandreno (18,42%), α -pineno (0,21%), canfeno (0,61%) e sabineno (traços) também foram identificados. Singh *et al.*, (2008) investigando sobre as atividades química, antioxidante e antimicrobiana do óleo e oleoresinas do gengibre identificaram cinquenta e sete componentes, representando cerca de 92,7% do total do óleo, dentre estes o geranial (25,9%), α -zingibereno (9,5%), (E,E)- α -farneseno

(7,6%), neral (7,6%), curcumeno (6,6%), β -sesquifelandreno (5,1%), 1,8-cineol (1,9%) dentre outros.

Yu *et al.*, (2007) ao analisarem os componentes do óleo essencial do gengibre fresco pela cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa identificaram cerca de cinquenta e quatro compostos os quais incluíam o β -felandreno (22,84%), α -zingibereno (15,48%), canfeno (7,30%), β -sesquifelandreno (5,54%), geranial (5,25%), e o α -pineno (2,13%). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Chrubasik, Pittler e Roufogalis (2005) que analisando o óleo essencial de gengibre usando a mesma técnica (CG-EM) identificaram sessenta e seis compostos dos quais o canfeno o β -felandreno e o 1,8 cineol foram os componentes majoritários. Outros constituintes incluindo o zingibereno, β -bisaboleno, β -sesquifelandreno e o α -farneseno acíclico também foram identificados.

Langner, Greifenberg e Gruenwald (1998) relataram que os componentes do óleo essencial de gengibre são caracterizados como sendo pertencentes principalmente ao grupo dos monoterpenoides (β -feniladreno, canfeno, cineol, geraniol, curcumeno, citral, terpineol, borneol) e sesquiterpenoides (α -zingibereno (30-70%), β -sesquifelandreno (15-20%), β -bisaboleno (10-15%), α -farneseno, ar-curcumeno, zingiberol).

5.5 Atividade Larvícida

A atividade larvícida do óleo essencial extraído dos rizomas do *Zingiber officinale* Roscoe foi testado em oito concentrações diferentes: 20, 50, 70, 100, 120, 140, 150 e 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo n , o número de larvas do mosquito *Aedes aegypti* utilizadas no ensaio larvícida 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 oito concentrações testadas (Tabela 4).

Tabela 4 – Mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição em várias concentrações do óleo essencial extraído dos rizomas do *Zingiber officinale Roscoe*.

Dose, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Log dose	Mortos	Vivos	Acumul. mortos	Acumul. vivos	Mortalidade %
160	2,2041	10	0	53	0	100
150	2,1761	9	1	43	1	90
140	2,1461	9	1	34	2	90
120	2,0792	8	2	25	4	80
100	2,0000	8	2	17	6	80
70	1,8451	5	5	9	11	50
50	1,6990	3	7	4	18	30
20	1,3010	1	9	1	27	10

Número de larvas ($n = 10$).

De acordo com a Tabela 4, a concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ do óleo essencial dos rizomas do *Zingiber officinale Roscoe* apresentou a menor atividade larvicida, matando, em média, uma larva, o que corresponde a 10% de mortalidade. Na concentração de $70 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou uma mortalidade de 50 %. A partir da concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ do óleo essencial a atividade larvicida começou a crescer exponencialmente, até provocar a morte de 100% dos indivíduos testados com a concentração de $160 \mu\text{g mL}^{-1}$, ou seja, 10 larvas.

A taxa de percentagem da mortalidade das larvas frente o óleo é mostrada na Figura 23, mostrando-se o crescimento exponencial a partir do Log dose 2,0000 (concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$).

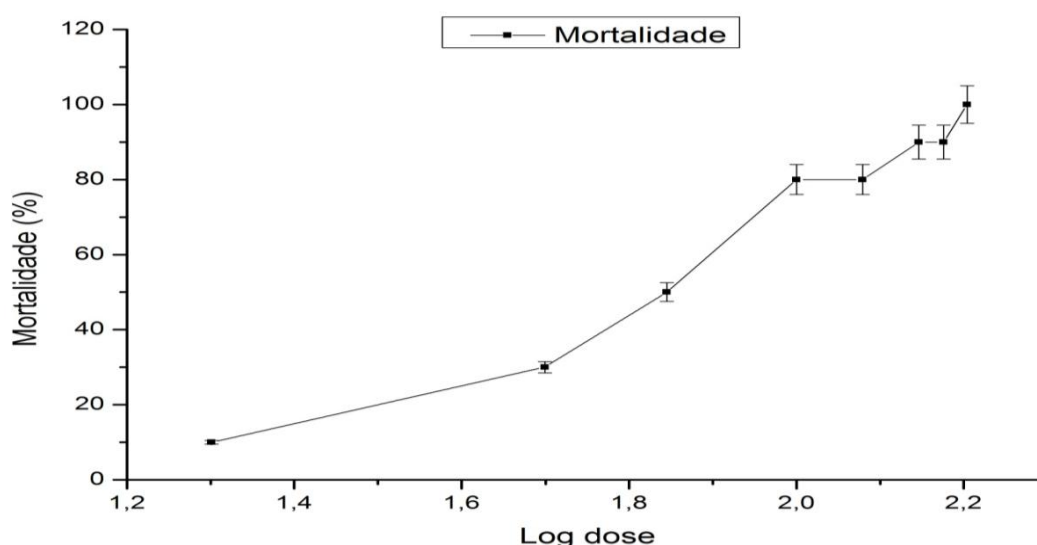


Figura 23 – Taxa de mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* – expostas a oito concentrações diferentes do óleo essencial dos rizomas do *Zingiber officinale Roscoe*, após 24 horas – versus o logaritmo de cada dose aplicada.

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 1,8689 (abaixo da concentração de $80\mu\text{g mL}^{-1}$). De acordo com Cheng et al. (2003) valores de $CL_{50} < 100\mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados ativos.

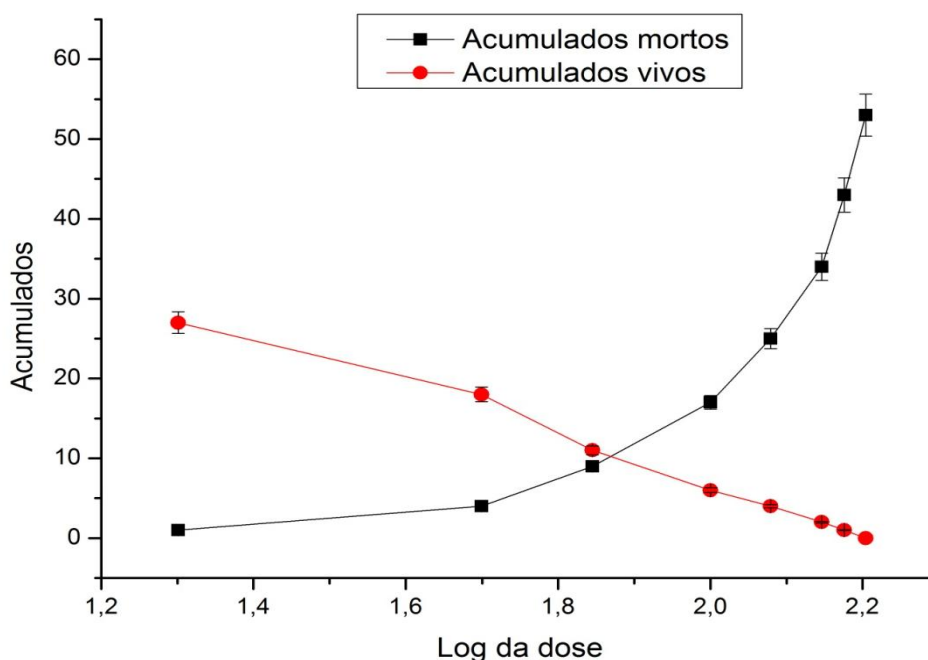


Figura 24 – Estimativa da CL_{50} do óleo essencial dos rizomas do *Zingiber officinale* Roscoe pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL_{50} é o ponto de intersecção das duas curvas.

A dose letal 50% para o óleo essencial dos rizomas do *Zingiber officinale* Roscoe foi calculada através da intersecção das curvas de indivíduos acumulados mortos e indivíduos acumulados vivos da Figura 24, tendo como resultado a concentração de $76,07\mu\text{g mL}^{-1}$ com um intervalo de confiança de $2,24\mu\text{g mL}^{-1}$.

A Concentração Letal (CL_{50}) obtida qualifica o óleo essencial como um agente larvicida em potencial (CHENG, et. al., 2003), que considera bons agentes larvicidas as substâncias com valor de CL_{50} inferior a $100\mu\text{g/mL}$.

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 larvicida (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 larvicida descrita neste estudo, portanto, ao composto α -Zingibereno particularmente; apesar de estar presente em maior quantidade, na ordem de 27%, nos rizomas da amostra de gengibre.

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 larvicida do óleo essencial dos rizomas do gengibre.

Santos *et al.* (2006) reportaram a atividade larvicida 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 larvicida (no presente estudo o primeiro composto apresentou um teor de 1,46%).

Simas *et al.* (2004) pesquisando produtos naturais no controle do 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 larvicida em *Aedes aegypti*, quando se compararam monoterpenos e sesquiterpenos de estruturas correlatas.

Furtado *et al.* (2005) reportaram em seu estudo a ação larvicida 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. Os autores também sugerem a possibilidade de outros compostos serem responsáveis pela atividade larvicida 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, a melhor forma de combater a doença é erradicar o mosquito através do uso de larvicidas em seus locais de reprodução, por exemplo, o temephos que vem sendo utilizado pela Vigilância Sanitária. Entretanto, as larvas e os mosquitos já estão adquirindo resistências aos inseticidas sintéticos. E considerando que os óleos essenciais de muitas plantas são por natureza tóxicas para os mosquitos, e menos agressores ao meio ambiente.

Em comparação ao principal larvicida utilizado no combate ao 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 (AUGUSTO;CAMARA NETO, 2007).

Diante desse panorama, os resultados alcançados com o óleo dos rizomas do *Zingiber officinale Roscoe* 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 dos rizomas do *Zingiber officinale Roscoe* 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 é um promissor agente larvicida natural em locais de crescimento de larvas do *Aedes aegypti*.

Capítulo 6

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram empregadas técnicas que formam um conjunto imprescindível para o estudo analítico de óleos essenciais. Os resultados obtidos mostraram a eficiência das técnicas e dos métodos usados. Com as ferramentas disponíveis, foi possível caracterizar o óleo essencial dos rizomas do *Zingiber officinale Roscoe*. Na identificação do componente majoritário e dos demais componentes, bem como suas quantificações, as técnicas foram precisas e os métodos eficientes, proporcionando um bom desempenho analítico nas determinações. Ficou evidenciado, também, que o óleo essencial da *Zingiber officinale Roscoe* apresenta atividade larvícida frente ao *Aedes aegypti*.

Diante dos resultados obtidos conclui-se que:

1. As técnicas espectroscópicas foram eficientes para a confirmação e identificação do zingibereno como componente majoritário, com teor de 27,14%, e de componentes minoritários no óleo essencial do *Zingiber officinale Roscoe*.

2. O presente estudo demonstrou que a espécie *Zingiber officinale Roscoe*, forneceu uma quantidade de óleo essencial significativa, cujo rendimento foi de 0,52% (m/v);

3. Os estudos das constantes físicas do óleo essencial apresentaram valores semelhantes aos valores obtidos pela literatura;

4. Os resultados sugerem que o óleo essencial do *Zingiber officinale Roscoe* apresenta atividade larvícida contra o *Aedes aegypti* sendo que o óleo essencial apresentou uma CL_{50} , com valor $76,07 (\pm 2,24) \mu\text{g mL}^{-1}$.

5. As larvas do *Aedes aegypti* são susceptíveis a composição do óleo essencial dos rizomas do *Zingiber officinale Roscoe*;

6. Esta propriedade biológica do óleo essencial deve-se muito provavelmente aos sesquiterpenos presentes em sua composição; atuando isoladamente ou de forma sinérgica com outros compostos.

Capítulo 7

Sugestões para Estudos
Futuros

7 SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

- Determinar a perda de massa dos óleos essenciais em estudos através de análise termogravimétrica e análise térmica diferencial (TG-DTA);
- Isolar e testar como agentes larvicidas os componentes majoritários do óleo essencial da *Zingiber officinale Roscoe*.
- Investigar o efeito residual do óleo essencial 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 óleo essencial como larvicida de outros insetos de interesse.
- Testar o hidrolato do óleo essencial da *Zingiber officinale Roscoe* como larvicida do mosquito *Aedes aegypti*.

Capítulo 8

Referências

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. Carol Stream, Illinois: Allured, 1995.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. 4. ed. Carol Stream, Illinois: Allured, 2007.
- AFZAL, M.; AL-HADIDI, D.; MENON, M.; PESEK, J.; DHAMI, M. S. I. Ginger: an ethnomedical chemical and pharmacological review. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, v. 18, n. 3-4, p. 160-190, 2001.
- 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**, n. 51, p. 3260-2, 2003.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 1999.
- ARBOVIRUS. *Aedes aegypti*: **ciclo evolutivo**. Disponível em: <http://www.arbovirus.health.nsw.gov.au/areas/arbovirus/mosquit/photos/aedes_aegypti_pupa.jpg> Acessado em: 22 ago. 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.**, v. 25, n. 6, p. 860-864, 2002.
- AUGUSTO, L. G da S.; CÂMARA-NETO, H. F. **Dengue: insustentabilidade do PEAa**. Anais do XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, Porto alegre – RS, 2007.
- BANDEIRA-PEREIRA, R.C.; SILVA, A.J.R.; BARBOSA, A.L.S.; SABAA-SRUR, A.U.O. Obtenção de óleo essencial e oleoresina de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) por arraste com vapor e extração com solvente. Revista **Universitária Rural Ser Companhia da Vida**. v.27, n.1.2007
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BARRETO, C. F. *Aedes aegypti* - resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, Goiás, v. 1, n. 2, p. 62-73, nov. 2005.
- BERNALE, J. V. **Planta Medicinales amazônicas: Realidade y perspectiva**. Lima: TCA, 1984.

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.

BRUNETON, J. **Farmacognosia**: fitoquímica, plantas medicinales. 2. ed. Zaragoza (España): Editota Acribia, 2001.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n. 3, p.223-253, 2004.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, n. 17, p. 2157-2184, 2004.

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

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**, n. 98, p. 569-71, 2003.

CDC. Centers for Disease Control and Prevent. **Division of vector-borne infections diseases**. Dengue fever. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue>>. Acesso em: 19 abr. 2011.

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

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.

CHIARAVALLOTI-NETO, F. Descrição da colonização de *Aedes aegypti* na região de São José do Rio Preto, São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 30, p. 279-285, 1997.

CHIEFFI, P. P., 1985. Algumas questões decorrentes da reintrodução do *Aedes aegypti* no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 1:193-199.

CHRUBASIK, S.; PITTLER, M.H.; ROUFOGALIS, B.D. Zingiberis rhizome: A comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles. **Phytomedicine International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology**, v. 12, p. 684-701, 2005.

CLAY, J. W. et al. **Selected species and strategies to enhance income generation from Amazonian Forest**. Roma:FAO, 1993.

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

CORRÊA JUNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 151p.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Caloust Gulbekian, 1994.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia/Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

COSTA, O. A. Plantas hipoglicemiantes brasileiras. **Lendra**, v.5, n.6. p. 95-103, dez. 1975.

CRACKER, L. E.; SIMON, J.E. **Herbs, Species and Medicinal Plants**. Phoenix: Oryx, 1987. v.1. 329p.

DEDOV, V. N., TRAN, V. H., DUKE, C.C., CONNOR, M., CHRISTIE, M.J., MANDADI, S., ROUFOGALIS, B. Gingerols: a novel class of vanilloid receptor (VR1) agonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 137, n. 6, p. 793-798, 2002.

ELPO, E. R. S. **Cadeia produtiva do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) no Estado do Paraná: análise e recomendações para melhoria da qualidade**. 2004. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

FABROWSKI, F. J. R. T. BAKER (Myrtaceae). **Eucaliptus smithii como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil**. Curitiba, 2002, 225 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 2002.

FARMACOPEIA BRASILEIRA IV – PARTE 1. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1996, 1.320p.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. **Fennema's Food Chemistry**. 4^a ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. 1100 p.

FERNANDES, R. P. **Caracterização química, avaliação da toxicidade e atividade moluscicida dos óleos essenciais as folha de *Pimenta dioica* Lindl, casca de *Citrus limon* Linneo e rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe**. João Pessoa/PB, Programa de Pós-Graduação em Química, PPGQ, UFPB, 2010. Tese de Doutorado, 149p.

FRANCO, O. **História da Febre Amarela no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. 1976.

FREITAS, A.R. Fatos e Números do Brasil Florestal, **Sociedade Brasileira de Sivicultura**. P.81-82. 2006.

FUH, M. R. et al. **Preparative-scale supercritical-fluid extraction of essential oils from *Syzygium aromaticum* (Clove bud)**. Int-Lab., p. 26, 1996.

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 Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 843-847, Sep.-Oct. 2005.

GRÉGIO, A. M. T.; FORTES, E. S. M.; ROSA, E. A. R.; SIMEONI, R. B.; ROSA, R. T. Ação antibacteriana do *Zingiber officinale* frente à microbiota bucal. **Revista Estudos de Biologia**, v.28, n. 62, p. 61-66, jan./mar. 2006.

HABSAH, M; AMRAN, M; MACKEEN, M. M; LAJIS, N.H; KIKUZAKI, H; NAKATANI, N; RAHMAN, A. A; ALI, A.M. Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, n. 3, p.403-410, 2000.

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

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

ISO. International Organization for Standardization. **International Standards for Business, Government an Society**. Disponível em: <[http:// www.Iso.gov/iso/search.htm?qt=essential+oils&searchsubmit=search&sort=rel&type=simple&published=on](http://www.Iso.gov/iso/search.htm?qt=essential+oils&searchsubmit=search&sort=rel&type=simple&published=on)>. Acesso em: 14 abr. 2011.

JENNINGS, W.; MITTLEFEHLDT, E.; STREMPLE, P. **Analytical gas chromatography**. 2. ed., San Diego: Academic, 1997, 389p.

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.

KARR, L.L.; COTAS, J.R. Insecticidal properties of dlimonene. **J Pest Sci**, n. 3, p. 287-90, 1998.

KIM, B. N.; KIM, N. J.; KIM, M.; KIM, Y. S.; WOO, J. H.; RYU, J. Bacteremia due to Tribe Proteaceae: a review of 132 cases during a decade (1991-2000). **Scandinavian Journal of Infections Diseases**, v. 35, n. 2, p. 98-103, Feb. 2003.

LANGNER, E.; GREIFENBERG, S.; GRUENWALD, J. Ginger: history and use. **Advances and Therapy**, v. 15, n. 1, p. 25-44, 1998.

LAMAS, A.M. **Floricultura tropical: tecnologia de produção**. Curso: floricultura tropical. Técnicas de Cultivo, 2004. Disponível em: <<http://75.152.3?~floriur/curso%20floricultura%20tropical-%20vs%29Nov-2004.pdf>> Acesso em: 20 abr. 2011.

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

LEMO, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; CLARK, A. M.; McCHESNEY, J. D.; Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phytotherapy Research**, v. 4, n. 2, p. 82-84, 1990.

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**, n. 20, p. 5-13, 2009.

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**, n. 23, p. 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**, n. 38, p. 842-843, 2004.

MAIA, N. B.; BOVI, O. A.; DUARTE, F. R. Obtenção e análise do óleo essencial do gengibre: efeito de secagem e processamento. **Bragantia**, Campinas, v. 50, n. 1, p. 83-92, 1991.

MAGALHÃES, M. T., KOKETSU, M., GONÇALVES, S. L., CORNEJO, S. L., MARQUES, F. E. P., ROSAMIGLIA, L. M. Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) brasileiro: aspectos gerais, óleo essencial e oleoresina. Parte (2) – secagem, óleo essencial e oleoresina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.17, n. 2, p. 132-136, 1997.

MARQUES, A. C. Sobre a viabilidade atual de erradicação do *Aedes aegypti* no controle da febre amarela no Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, n. 37, p. 37-46, 1985.

MARTINS, A. G. L. A. **Atividade antibacteriana dos óleos essenciais do manjeriço (*Ocimum basilicum* Linnaeus) e do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de**

hortaliças. João Pessoa/PB, Programa de Pós-Graduação em Química, PPGQ, UFPB, 2010. Tese de Doutorado, 179 p.

MIYAZAWA, M.; KAMEOKA, H. Volatile flavor components of *zingiberis rhizoma* (*Zingiber officinale* Rosc). **Agriculture and Biological Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 2961-2963, 1988.

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.** 2000. 124p. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, São Carlos/SP, 2000.

MURUGAN, K.; MURUGAN, P.; NOORTHEEN, A. Larvicidal and repellent potential of *Albizzia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta:Diptera:Culicidae). **Bioresource Technology**, 98: 198–201, 2007.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O. & LINARDI, P. M. Culicídeos. In: NEVES, D. P.(Org.), **Parasitologia Humana**. São Paulo: Editora Atheneu. pp. 383-397. 1995.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **OMS apóia estudo com plantas medicinais.** Disponível em: <http://www.drashi.../fitoterapia_oms_apoia_estudos_com_plantas_medicinais.ht> Acesso em 17 jul. 2011.

ONYENEKWE, P.C. & HASHIMOTO, S. The composition of the essential oil of dried Nigerian ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Eur Food Res Technology**. 209: 407-410.1999.

ÖZCAN, M.; CHALCHAT, J.C. Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum minimum* L. in Turkey. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 20, n. 6, p. 223-228, 2002.

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**, n. 42, p. 352-358, 2005.

PIZZI, M. Sampling variation of the fifty percent end-point, determined by the Reed-Muench (Behrens) Method. **Human Biol.**, n. 22, p. 151-190, 1950.

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

PORTAL DA SAÚDE. Número de casos de dengue cai 61% no primeiro bimestre de 2012. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/4452/162/numero-de-casos-de-dengue-cai-61-no-primeiro-bimestre.html>> Acesso em 07 mar 2012.

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.** 2008. 121p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) -, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, UFPR, Curitiba, 2008.

RALPH, L. S. **Identificação sistemática de compostos orgânicos.** Manual de Laboratório. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1983, p. 367-378.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end-points. **Amer. J. Hyg.**, n. 27, p.493-497, 1938.

ROBLES, C. et al. Essential Oil Composition of *Cistus Albidus* Leaves. **Phytochemistry**, v.48, n.8, p. 1343-1345, 1998.

SACCHETTI, G. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**. V.91, p. 621-632. 2004.

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.**, v. 17, n. 5, p. 1027-1030, 2006.

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

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

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 larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilterpenóides. **Química Nova**, v. 27, n. 01, p. 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.

SINGH, G.; KAPOOR, I.P.S.; SINGH, P.; HELUANI, C.S.; LAMPASONA, M.P.; CATALAN, C.A.N. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 10, p. 3295-3302, 2008.

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 5 jan. 2011.

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

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**. 2003. 99p. Dissertação (Mestrado em Química) -, Programa de Pós-Graduação em Química, UFMA, São Luís, 2003.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. **Compendium de fitoterapia: herbarium**. 3. ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1995. 317 p.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K.; SHUKLA, A. K. Use of the essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 39-46, 2008.

USP, Universidade de São Paulo. **Darvin Futuro: histórico da doença**. Disponível em: http://darwin.futuro.usp.br/site/finlay/quadroteorico/c_historicodoenca.htm > Acesso em: 15 Set 2011.

WHO. World Health Organization. **Dengue bulletin: Epidemic dengue/dengue haemorrhagic fever: A global public health problem in the 21st century**. 1997

WHO. World Health Organization. **Dengue bulletin: Situation of dengue/dengue haemorrhagic fever in SEA countries**. 2004.

YU, Y.; HUANG, T.; YANG, B.; LIU, X.; DUAN, G. Development of gas chromatography-mass spectrometry with microwave distillation and simultaneous solid-phase microextraction for rapid determination of volatile constituents in ginger. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 1, p. 24-31, 2007.

ZANCAN, K. C.; MARQUES, M. O. M.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 24, n. 1, p. 57-76, 2002.

ZARATE, R.; SUKRASNO; YEOMAN, M. M. Application of two rapid techniques of column chromatography to separate the pungent principles of ginger, *Zingiber officinale* Roscoe. **Journal of Chromatography**, v. 609, n. 1-2, p. 407 - 413, 1992.