



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

MARLUCY BEZERRA OLIVEIRA

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DO
ÓLEO ESSENCIAL DO *Citrus limon* Linneo (LIMÃO) FRENTE AO MOSQUITO
*Aedes aegypti***

São Luís
2012

MARLUCY BEZERRA OLIVEIRA

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DO
ÓLEO ESSENCIAL DO *Citrus limon* Linneo (LIMÃO) FRENTE AO MOSQUITO
*Aedes aegypti***

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

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho.

São Luís
2012

MARLUCY BEZERRA OLIVEIRA

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DO
ÓLEO ESSENCIAL DO *Citrus limon* Linneo (LIMÃO) FRENTE AO MOSQUITO
*Aedes aegypti***

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

Aprovado em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho
Doutor em Química Analítica
(Orientador)

Prof. Dr. Gilmar Silvério da Silva
Doutor em Química Analítica
(Examinador Interno - IFMA)

Profa. Dra. Antônia Alice Costa Rodrigues
Doutora em Fitopatologia
(Examinador Externo – UEMA)

À Deus.

E a minha mãe, Maria José, por ser a
essência da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pois sem ele que não poderia amar e conviver com todas as pessoas que fazem parte da minha vida.

A minha mãe Maria, por ser a razão da minha vida e meu irmão Marlon que mesmo com a distância, o seu amor e carinho o traz para perto de mim.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho, orientador que sempre me acompanhou e apoiou na minha vida acadêmica, desde o início e que sempre será um exemplo de profissional e pessoa, por todos os conhecimentos e apoio fornecido.

À Prof^a Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento pelos seus ensinamentos e conselhos em todos os momentos da minha formação profissional e ajuda nas diversas situações.

Ao Prof Dr. João Mouchrek pela amizade, incentivo e pelo exemplo de pessoa simples e especial, pela disposição a ajudar.

Aos Prof. Msc. Nestor Everton, Prof^a. Especialista Paula Coelho Everton e Msc. Aldemir da Guia Schalcher pelos cuidados e atenção quando requisitados.

Aos amigos dos Laboratórios de Microbiologia e de Físico-Química do PCQA e a todos do Pavilhão Tecnológico da UFMA, especialmente à Jane, Andreson, Amanda, Rayone e Dioneu.

Aos colegas e amigos do curso de Mestrado, pelo incentivo e companheirismo, em particular a Andreson, Alexandre, Natale, Thiessa, Inocêncio, Gilsom, Jonas e Jeferson.

Ao meu namorado, Francisco Cleomo Lima da Silva, 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 do Acqua Laboratório, pela amizade verdadeira.

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

(Albert Einstein)

RESUMO

Pesquisas que demonstram a resistência das larvas do *Aedes aegypti* a pesticidas sintéticos, têm impulsionado a procura por compostos químicos alternativos de origem natural para combater o vetor da dengue. Neste trabalho a partir da extração e do estudo analítico do óleo essencial dos pericarpo do *Citrus limon* Linneo, foi analisado o efeito larvicida do óleo contra larvas em terceiro estágio do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1792), e com base no resultado analítico foi avaliado o efeito do composto majoritário. 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 CL_{50} do óleo, a partir dos métodos de Reed-Muench (1938) e Pizzi (1950), respectivamente. O rendimento do óleo foi de 0,96% m/v. Foram identificados 15 componentes no óleo, e a presença majoritária do limoneno foi confirmada pelas técnicas espectroscópica. O óleo essencial obteve CL_{50} de $14,99 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($\pm 2,45$) $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para o l-limoneno de $26,73 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($\pm 2,02$) $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para o d-limoneno $113,24 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($\pm 2,02$) $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados indicam que o óleo essencial avaliado é composto por substâncias que propiciam efeito larvicida contra *Aedes aegypti*.

Palavras-Chave: Óleo essencial. Pericarpo. *Citrus limon* Linneo. Atividade larvicida. *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Surveys show that the resistance of the larvae of *Aedes aegypti* to synthetic pesticides, have boosted demand for alternative chemical compounds of natural origin to combat the dengue vector. In this work, from the extraction and analytical study of the essential oil of the pericarp of the *Citrus limon* Linneo, the larvicidal effect of the oil against larvae in third phase of the mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1792) was analyzed and based on the analytical result was evaluated the effect of the major compound. The essential oil was extracted quantitatively by hydrodistillation. The essential oil physical-chemical properties (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 l-limonene was confirmed by the spectroscopic techniques. The essential oil got CL₅₀ 14,99 (±2,25) µg mL⁻¹ and l-limonene of 26,73 mg mL⁻¹ (± 2,02) mg mL⁻¹ and the d-limonene 113,24 mg mL⁻¹ (± 2,02) mg 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. Pericarp. *Citrus limon* Linneo. Larvicidal activity. *Aedes aegypti*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- <i>Citrus limon</i> Linneo.....	25
Figura 2- Algumas estruturas de componentes encontrados no óleo essencial do limão (<i>Citrus limon</i>).....	26
Figura 3- Mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	28
Figura 4- Distribuição do <i>Aedes aegypti</i> no mundo em 2012: Países ou área de risco.....	28
Figura 5- <i>Citrus limon</i> Linneo.....	36
Figura 6- Extrator de clevenger.....	37
Figura 7- Óleo extraído do pericarpo do <i>Citrus limon</i> Linneo.....	38
Figura 8- Espectrofotômetro com transformada de Fourier.....	41
Figura 9- Armadilha utilizada para a coleta dos ovos do <i>Aedes aegypti</i>	41
Figura 10- Larvicidas comerciais empregados:Themerfós e Novaluron	42
Figura 11- Larvas no terceiro estágio.....	43
Figura 12- Exsicata da espécie <i>Citrus limon</i> Linneo.....	46
Figura 13- Cinética referente ao rendimento de extração do óleo em função do tempo, com massa de 30g e temperatura de 100°C.....	47
Figura 14- Espectros da região do infravermelho do óleo essencial do <i>Citrus limon</i> Linneo e padrão Limoneno.....	49
Figura 15- Cromatograma da amostra do óleo do pericarpo do <i>Citrus limon</i> Linneo, apresentando os picos selecionados e identificados através da comparação dos respectivos espectros de massas com a espectroteca.....	50
Figura 16- (A) Espectro de massa do Limoneno. (B) Espectro de massa da espectroteca.....	52
Figura 17- Ocorrência da reação de retro-Diels-Alder na fragmentação do limoneno.....	53
Figura 18- (A) Espectro de massa do β -mirceno. (B) Espectro da espectroteca WILEY229.....	53

Figura 19- (A) Espectro de massa do β -pineno. (B) Espectro de massa WILEY229.....	54
Figura 20- Taxa de mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> – expostas a cinco concentrações diferentes do óleo essencial do pericarpo do <i>Citrus limon</i> Linneo, após 24 horas – versus o logaritmo de cada dose aplicada.....	55
Figura 21- Estimativa da CL ₅₀ do óleo essencial do pericarpo de <i>Citrus limon</i> Linneo 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.....	57
Figura 22 – Estimativa da CL50 do óleo essencial do pericarpo de Citrus limon 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
Figura 23 – Taxa de mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> – expostas a cinco concentrações diferentes do padrão de L-limoneno, após 24 horas – versus o logaritmo de cada dose aplicada.....	58
Figura 24 – Estimativa da CL50 do padrão de L-limoneno 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.....	59
Figura 25 – Taxa de mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> – expostas a cinco concentrações diferentes do padrão de D-limoneno, após 24 horas – versus o logaritmo de cada dose aplicada.....	60
Figura 26 – Estimativa da CL ₅₀ do padrão de D-limoneno 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.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos dos óleos essenciais de <i>Citrus limon</i>	48
Tabela 2 – Bandas de absorção do limoneno na região do Infravermelho.....	49
Tabela 3 – Compostos identificados na amostra do pericarpo do <i>Citrus limon</i>	51
Tabela 4 – Mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição em várias concentrações do óleo essencial extraído do pericarpo do <i>Citrus limon</i> Linneo.....	56
Tabela 5 – Mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição em várias concentrações do padrão L-limoneno.....	58
Tabela 6 – Mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição em várias concentrações do padrão D-limoneno.....	59

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.....	20
2.1 Considerações sobre óleos essenciais.....	20
2.2 Aspectos gerais sobre o <i>Citrus limon</i>.....	24
2.3 Aspectos gerais sobre o <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	27
2.4 Técnicas Analíticas.....	30
2.4.1 Cromatografia Gasosa (CG).....	30
2.4.2 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV).....	30
2.4.3 Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (CG-EM).....	31
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Geral.....	34
3.2 Específicos.....	34
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	36
4.1 Método de obtenção do óleo essencial dos pericarpos do <i>Citrus limon</i> Linneo (Limão).....	36
4.1.1 Origem, identificação do material vegetal.....	36
4.1.2 Extração do óleo essencial do pericarpo do <i>Citrus limon</i> Linneo (Limão).....	37
4.1.3 Rendimento da extração do óleo essencial do pericarpo do <i>Citrus limon</i> Linneo (Limão).....	38
4.2 Caracterização Físico-Química.....	39
4.2.1 Densidade.....	39
4.2.2 Solubilidade em etanol (90%).....	39
4.2.3 Índice de refração.....	39
4.2.4 Cor e Aparência.....	39
4.3 Análises Químicas.....	40
4.3.1 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).....	40
4.3.2 Análise Espectrométrica Vibracional na Região do Infravermelho.....	40
4.4. Teste de Toxicidade.....	41
4.4.1 Obtenção e cultivo das larvas do <i>Aedes aegypti</i>	41
4.4.2 Teste larvicida.....	42
4.4.3 Análise Estatística.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1 Identificação botânica.....	46
5.2 Avaliação da cinética de extração do óleo essencial do <i>Citrus limon</i>.....	46
5.3 Características físico-químicas do óleo essencial do pericarpo do <i>Citrus limon</i>	46
5.4 Análise espectroscópica vibracional na região do Infravermelho.....	48
5.5 Avaliação das características químicas dos óleos essenciais obtidas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas (CG-EM)...	50
5.6 Atividade Larvicida.....	56
6. CONCLUSÃO.....	64

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Considerada atualmente com a mais importante arbovirose que afeta seres humanos, a dengue, constitui um sério problema de saúde pública mundial (SANTOS, 2009; DENGUE, 2012). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), nos últimos 50 anos, o número de casos da doença se multiplicou e estima que haja 200 milhões de novos casos por ano (SBMT, 2012).

A dengue tem emergido como um problema mundial desde 1950, atualmente, mais de um terço da população vive em áreas de risco de transmissão do vírus, situado nos trópicos e subtropicais, caracterizado como uma das principais causas de doença e morte nestas regiões. Destacando-se na América do Sul, América Central, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental (CDC DENGUE, 2012).

Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, registraram um total de 286.011 casos de dengue no país de janeiro a abril de 2012, para este mesmo período, foram confirmados 1.083 casos graves e 74 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Cinco anos após ser considerada um problema de saúde mundial, a Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs a erradicação global de doenças transmitidas por vetores para humanos, através da utilização da pulverização de DDT nas residências. No entanto, a ação logo foi interrompida, em 1976, sendo uma das principais causas foi o aparecimento de resistência ao DDT em uma ampla gama dos vetores de mosquitos (BRADLEY, 1998). Em 1975 a OMS informou que 256 milhões de pessoas viviam em áreas onde o DDT e/ou BHC apresentava resistência. Sendo que, já em 1947, os primeiros casos de resistência DDT contra as espécies de *Aedes tritaeniorhynchus* e *Aedes sollicitans*, já ocorriam, um ano logo após a primeira utilização do produto no controle de mosquitos (BROWN, 1986). Desde então, mais de 100 espécies de mosquitos foram relatadas como resistentes a um ou mais inseticidas (WHO, 1992). Os problemas de resistência continuaram sendo um dos principais interruptores ao uso dos inseticidas (RANSON, 2000).

Segundo Ranson (2000), uma variedade de gêneros como o *Culex* vetor da filariose e encefalite japonesa, o *Aedes* da dengue comum e hemorrágica e *Anopheles* da malária, têm ampliado o número de espécies com resistência. Em particular o *Aedes* tem ampliado sua faixa de resistência na Ásia e na América Latina, levando a um aumento do risco de dengue nestas áreas.

Recentemente no Brasil o controle tem sido feito por meio de aplicações de inseticidas organofosforados e piretróides (BRASIL, 2009). Porém, o uso freqüente 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 (CARVALHO e SILVA, 2000; POLANCZYK et al., 2003; LUNA et al., 2004).

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 continua sendo o desenvolvimento de resistência das larvas, que não mais estavam sendo adequadamente controladas por este produto químico.

Uma das mudanças adotadas pelo Ministério da Saúde em 2011, foi a utilização do Novaluron, e para isto elaborou a Nota Técnica nº 57/2011, que estabelece os procedimentos técnicos para o uso do Novaluron na rotina de controle larvário, o produto mais recente empregado juntamente com organofosforados. O produto tem sido utilizado no controle da proliferação do *Aedes aegypti* no Brasil, consiste em biolarvicida sintético e sua persistência contra as larvas do mosquito é de oito semanas, no entanto, deve ser empregado em baixas concentração para reduzir os riscos de intoxicação e contaminação (Ministério da Saúde, 2011).

Sendo assim, 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 clássica e da febre hemorrágica, gerando por consequência, um problema para as autoridades de saúde em razão das dificuldades enfrentadas para o controle das epidemias produzidas por esse vírus e pela necessidade de ampliação da capacidade instalada dos serviços de saúde, para atendimento aos indivíduos acometidos com formas graves (BARRETO, 2008). Além da importância na saúde, pois em alguns casos pode levar até a morte em outros causa 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). Portanto, torna-se necessário o controle da densidade populacional do *Aedes aegypti*, 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; DENGUE MAPAS, 2012).

A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2012), tem recomendado estudos com extratos de plantas consideradas medicinais (pelo conhecimento empírico popular). A partir de 1978 a instituição passou a aconselhar a comunidade científica a intensificar e divulgar os estudos com plantas (SOARES, 2011).

A procura por metodologias naturais e menos agressivas de controle à insetos tem crescido consideravelmente nos últimos anos, com a busca de extratos vegetais e substâncias naturais que sejam eficazes e ao mesmo tempo isentas de toxicidade para o meio ambiente. Diversos estudos têm demonstrado as propriedades biológicas de várias plantas em particular os óleos essenciais, produzidos no metabolismo secundário das plantas, que têm se apresentado como fontes de materiais com atividade inseticida, moluscicida, larvicida e repelente (COSTA, 2005; MURUGAN et al., 2007; LEITE, 2009; GOVINDARAJAN, 2010)

Com base no exposto, foi avaliado a ação larvicida do óleo essencial extraído do pericarpo do *Citrus limon* Linneo, contra o *Aedes aegypti*, com o objetivo de buscar um produto natural que possa ser usado como alternativa no controle do vetor da dengue.

Fundamentação teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Considerações sobre óleos essenciais

De acordo com Adojar (2010), os óleos essenciais são óleos voláteis, que estão presentes nas plantas como produto natural e que contêm compostos aromáticos voláteis.

A *International Organization for Standardization* (ISO), define óleos voláteis ou essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas por destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (*Rutaceae*). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamadas de óleos essenciais, óleos etéreos ou essências. Essas denominações derivam de algumas de suas características físicas, como por exemplo a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente, advindo, daí, a designação de óleo. Tendo como principal característica, a volatilidade, diferindo-se, assim, dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidas geralmente de sementes. Outra característica importante é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos essenciais, sendo, por isso, também chamados de essências. Eles também são solúveis em solventes orgânicos, como éter, recebendo, por isso, a denominação de óleos etéreos. Em água os óleos essenciais apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são denominadas de hidrolatos (SIMÕES et al., 2007).

Em termos de composição química, os óleos essenciais diferem-se dos vegetais e minerais, sendo os primeiros constituídos por 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).

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

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 são: enfloração (*enfleurage*), arraste por vapor d'água, extração com solventes orgânicos, prensagem e extração por CO₂ supercrítico (MOUCHREK FILHO, 2000).

Os óleos essenciais, na sua maioria, foram extraídos por este processo; serviram para estabelecer as suas próprias características, e pelas quais continuam ainda hoje a ser assim definidas.

Na indústria, o método mais empregado para extraí é a destilação pelo vapor de água em consequência da sua maior simplicidade e economia, permite tratar de uma única vez quantidades enormes de matéria-prima; os alambiques, são simples e de preços acessíveis, em particular os móveis, mais pequenos; exige uma

mão-de-obra pouco especializada e por isso barata. No setor industrial são utilizados a destilação prolonga-se durante um tempo determinado, quer por circunstâncias de caráter técnico, quer de natureza econômica. Com efeito, uma destilação rápida pode conduzir a um produto contendo predominantemente constituintes mais voláteis mas destituídos das melhores características: pelo contrário, uma extração prolongada encarece sempre o óleo essencial, mas também a pode sobrecarregar dos compostos de aromas menos estimados. A experiência determinou, para cada planta, o momento em que deve cessar a operação, para obter o produto de melhor qualidade e a preço mais baixo (MOUCHREK FILHO, 2001).

Em pequena escala, como os óleos essenciais possuem tensão de vapor mais elevada do que água, eles são arrastados pelo vapor d'água, podendo ser empregado um aparelho de Clevenger, quando em pequena escala. O óleo essencial obtido, após separar-se da água, deve ser seco com Na_2SO_4 anidro. Esse procedimento, embora clássico, pode levar à formação de artefatos em função da alta temperatura empregada. Preferencialmente, esse método é utilizado para extrair óleos de plantas frescas (MOUCHREK FILHO, 2000).

A Farmacopéia Brasileira V preconiza o uso de um aparelho tipo Clevenger, com modificações especificadas, como também cuidados a serem adotados como antes da utilização, o aparelho deve ser limpo por lavagens repetidas e sucessivas com acetona, água, mistura sulfocrômica e novamente água. Depois de seco, deve ser montado em local protegido de correntes de ar. A escala graduada deve ser aferida e, se necessário, estabelecer fator de correção para cada aparelho. Quando terminada a operação, deixar esfriar por 10 minutos e ler o volume do óleo essencial recolhido no tubo graduado (FARMACOPEIA, 2010).

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.

A especificação das condições de extração no processo de destilação está diretamente relacionado com a qualidade do óleo essencial, com por exemplo, o tempo de extração do óleo essencial, pois é um dos principais parâmetros físico-químicos da indústria de essências, no que se refere à qualidade e à natureza econômica do processo. Uma destilação rápida, pode conduzir a um produto contendo predominantemente constituintes mais voláteis mais destituídos das melhores características; ao contrário, uma extração prolongada encarece o produto

e também o pode sobrecarregar de compostos de aroma menos estimados (CHAAR, 2000; MOUCHREK, 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, fotociclização (citrais), ruptura oxidativa de propenilfenóis, peroxidação de hidrocarbonetos e decomposição de 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, geralmente empregada juntamente com algum detector, como um espectro de massa, que fragmenta e verifica os elementos oriundos do analito. 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).

2.2 Aspectos gerais sobre o *Citrus limon*

As plantas cítricas foram introduzidas no Brasil pelas primeiras expedições colonizadoras, provavelmente na Bahia. Entretanto, com melhores condições para se cultivar e produzir do que nas próprias regiões de origem, estas plantas se expandiram por todo o país. A citricultura brasileira detém a liderança mundial e tem se destacado pela promoção do crescimento sócio-econômico, contribuindo com a balança comercial nacional e principalmente, como geradora de empregos, diretos e indiretos, na zona rural (CUNHA et al., 1996).

Em meio a outras espécies existentes no Brasil, que pertencem ao gênero *Citrus*, tem o *Citrus limon* Linneo conhecido como limão verdadeiro é o fruto do limoeiro (Figura 1), tendo origem na região sudeste da Ásia, é uma árvore pertencente à família das *Rutaceas*, perenifólia, pequena de 3 - 6 metros de altura, com numerosos ramos e espinhos. Folhas unifolioladas de cor verde, formato lanceolada, elíptico - ovada de 6 - 12,5 cm de comprimento e 3 - 6 cm de largura; ponta obtusa; margem serreada - dentada; pecíolo curto e extensamente alado; folhas verdes; flores solitárias ou em racimos axilares, amareladas em forma de botão; pétalas brancas na parte superior e púrpura abaixo; fruto oblongo ou oval, 7 - 12 cm de comprimento, amarelo claro ou dourado; casca mais ou menos grossa e com presença de glândulas, dependendo das variedades; sementes pequenas, ovais e pontiagudas (OJASTI et al., 2001).

Figura 1 – *Citrus limon* Linneo



Fonte: Elpo, 2009.

Em termos de aplicação, o *Citrus limon* é muito utilizado na culinária, em molhos, aperitivos, sorvetes, licores, o seu óleo extraído da semente da espécie também pode ser aproveitado na indústria alimentícia, pois apresentam alto grau de instauração, baixo teor de ácidos graxos livres como o caprílico, mirístico, palmítico, esteárico, oléico, linoléico, linolênico e araquídico (GRASSI FILHO, 2005, REDA 2005). Além de se fazer parte da composição de produtos de limpeza, perfumaria e medicamentos (AZAMBUJA, 2012).

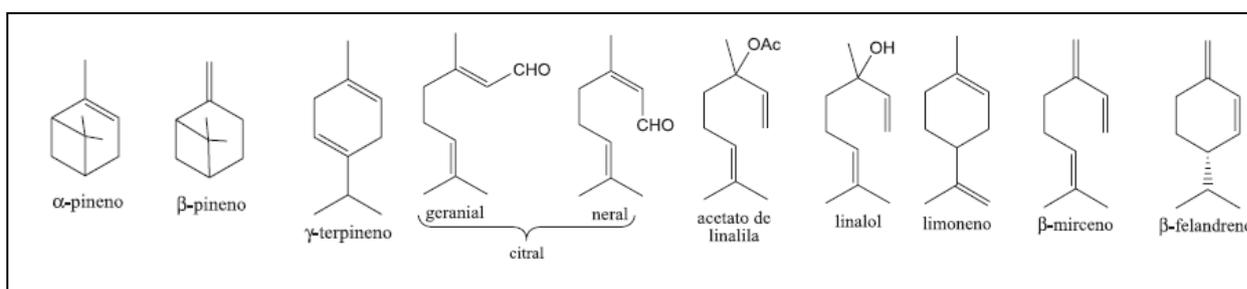
Seu uso na terapia data desde a antiguidade e as propriedades que lhe eram atribuídas são confirmadas em estudos recentes (ARIAS e RAMÓN-LACA, 2005). No Brasil o limão se popularizou devido a sua eficácia no combate de diversas patologias, tais como infecções, febres, aterosclerose, acidez gástrica, alterações do fígado e biliares entre outras, por possuir propriedades antibiótica, antitérmica, antiinflamatória, vermífuga, anti-séptica, antiespasmódica e leishmaniose (RAQUEL, 2007; MOREIRA, 2002). Seus constituintes como o linalol, citral, citronelal, felandrina, hidrocarbonetos terpenicos, limonina, limoleno, ácidos orgânicos (cítrico e málico), bioflavonóides, pectinas, vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, niacina, sais minerais (potássio, fósforo, ferro, cálcio, sódio, magnésio, enxofre, cloro), vitamina C (ácido ascórbico), lhe conferem as propriedades terapêuticas (COELHO, 2000; VENDRUSCOLO et al., 2005; FENNER, 2006; AGRA et al., 2007; PENIDO e SILVA, 2007).

Por apresentar uma vasta variação na sua composição e propriedades a produção de limão, além de destinar-se para o consumo *in natura* e para indústria de suco, destina-se para extração do óleo essencial contido na casca dos frutos. Este óleo é comumente utilizado por indústrias de bebidas de refrigerantes, como

também para fabricação de cosméticos, essências aromáticas (GRASSI FILHO et al., 2005).

O constituinte em majoritário do óleo essencial extraído do *Citrus limon* é o l-limoneno. Com relação aos aldeídos, há um predomínio do citral, ao qual se atribui as propriedades aromáticas deste óleo. Nos óleos de origem italiana, mais ricos, o conteúdo chega a 6%, enquanto os norte americanos não ultrapassam os 3,5%. Além do citral ainda existe como os monoterpenos (α -tujeno, α e β - pipeno, canfeno, mirceno, α e β -felandreno, α e γ -terpineno, terpinoleno, β -ocimeno, p-cimeno, 3-careno); monoterpenos oxigenados (hidrato de sabineno, linalol, endofencol, cânfora, citrnelol, borneol, terinterpineol, nerol, neral, geraniol, geranial, citronelol); sesquiterpenos (σ -elemeno, E-carypheleno, α -trans-bergaboleno, α -humuleno, E- β - farneseno, curcumeno, valenceno, bicilogermacreno, α -muroleno α e bisaboeno); sesquiterpeno oxigenados (álcool carypheleno, germacreno, α -muurolo, α -cadinol, α - bisabolol, E-farnesol) e outros compostos como o ácido palmítico e ácido linoléico. De um modo geral o óleo essencial é descrito em relação a composição com teor de 92 a 94% de hidrocarbonetos e e 6 a 8 % de compostos oxigenados (COELHO, 2000; LOTA et al., 2002; FERHAT et al., 2007; AZUBA, 2012).

Figura 2 - Algumas estruturas de componentes encontrados no óleo essencial do limão



Fonte: Silva et al., 2009.

Embora as atividades farmacológicas de vários óleos essenciais terem sido descritas na literatura, como a antifúngica (CLAUDIO JUNIOR, 2009; MARTINS 2009), como de possuir função moduladora no tratamento de doenças neurodegenerativas, no sistema nervoso central (CAMPELO, 2011), antioxidante

(ADORJAR, 2010) e moluscicida (FERNANDES, 2011), diversas pesquisas são desenvolvidas em busca d

2.3 Aspectos sobre o *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

Quanto ao aspecto epidemiológico, o Ministério da Saúde, define a dengue como uma doença febril aguda, de etiologia viral e de evolução benigna na forma clássica, e grave quando se apresenta na forma hemorrágica. A dengue é, hoje, a mais importante arbovirose (doença transmitida por artrópodes) que afeta o homem e constitui-se em sério problema de saúde pública no mundo, especialmente nos países tropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do *Aedes aegypti*, principal mosquito vetor. (MINISTERIO DA SAÚDE, 2002; 2012)

O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus 1792) (Diptera: Culicidae) é o principal responsável pela transmissão da dengue e da febre amarela, mede menos de um centímetro, tem aparência inofensiva, cor café ou preta e listras brancas no corpo e nas pernas. É doméstico e antropofílico, com atividade hematofágica diurna, costuma picar nas primeiras horas da manhã e nas últimas da tarde, evitando o sol forte, mas, mesmo nas horas quentes, ele pode atacar à sombra, dentro ou fora de casa, utiliza-se preferencialmente de depósitos artificiais de água parada, limpa ou suja, para colocar seus ovos. O ciclo do *Aedes aegypti* é composto por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto. Na fase do acasalamento, em que as fêmeas precisam de sangue para garantir o desenvolvimento dos ovos, ocorre a transmissão da doença (CDC, 2011; MOSQUITO DA DENGUE, 2011) osquito da dengue, 2011).

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 3).

Figura 3 - Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)



Fonte: Arbovírus, 2012.

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).

Segundo a OMS 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco para transmissão da dengue, sendo um dos principais causadores de doença e morte na faixa intertropical. A distribuição do *Aedes aegypti* no mundo em 2012 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 2012: Países ou área de risco.



Fonte: Healthmap, 2012.

A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde registrou um total de 286.011 casos de dengue no País de janeiro a abril de 2012. Deste total, foram confirmados 1.083 casos graves. Na Região Sudeste foram confirmados 425 casos graves, com destaque para o Rio de Janeiro (263) e Espírito Santo (109). No Nordeste, ocorreram 385 casos graves, sendo que Bahia (102) e Rio Grande do Norte (84) apresentaram o maior número de registros. Já no Centro-Oeste (com 193 casos graves), destacam-se Goiás (104) e Mato Grosso (69). Por fim, na Região Norte houve registro de 72 casos, com a maior parte ocorrendo no Estado do Pará (41). Em relação às mortes, foram confirmados 74 óbitos (PORTAL DA SAÚDE, 2012).

O *Aedes aegypti* é um vetor oriundo do continente africano (CHIARAVALLOTI-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 quase todo o país (NEVES et al., 1995).

As mudanças demográficas ocorridas nos países subdesenvolvidos, a partir dos anos 60, geradas por intenso fluxo migratório rural-urbano, resultaram em crescimento desordenado das cidades, nas quais se destacam a carência de facilidades – em particular, de habitação e saneamento básico e pela falta de abastecimento de água, havendo a necessidade de armazená-la precariamente, tal como pela ausência de destino adequado do lixo ocorre a proliferação de criadouros potenciais do *Aedes aegypti*, ou seja, depósitos improvisados para água potável e recipientes em que a água é acumulada, constituídos principalmente por latas, plásticos e garrafas usadas. A indústria moderna, por outro lado, privilegia a produção de material descartável. O vírus do dengue tem sua propagação facilitada pela intensidade e freqüência dos meios de transporte, os quais favorecem também a disseminação dos vetores da doença (TAUIL, 2001).

Percebe-se que o mosquito *Aedes aegypti*, encontrou no mundo moderno condições muito favoráveis para uma rápida expansão, pela urbanização de forma

desordenada; pela intensa utilização de materiais não biodegradáveis e pelas mudanças climáticas (FUNASA, 2002).

2.4 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.

2.4.1 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 e SMITH, 1996; SCHREIER, 1984). Assim, a cromatografia permite determinar, qualitativamente e quantitativamente, as frações individuais obtidas nos cromatogramas.

2.4.2 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 e SIMON, 1987).

Dois 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).

2.4.3 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).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Extrair, caracterizar e avaliar a atividade larvicida do óleo essencial extraído do fruto do *Citrus limon* Linneo (limão) frente ao mosquito *Aedes aegypti*.

3.2 Específicos

- ✓ Coletar e identificar botanicamente o *Citrus limon* Linneo (Limão);
- ✓ Extrair quantitativamente o óleo essencial do pericarpo do limão *Citrus limon* Linneo (Limão) pelo método de hidrodestilação;
- ✓ Determinar as características físico-químicas do óleo essencial, no que se refere à densidade, índice de refração, solubilidade em álcool a 90%, cor e aparência;
- ✓ Caracterizar analiticamente e quantificar os componentes majoritários da mistura dos óleos essenciais por CG-EM e espectroscopia vibracional na região do infravermelho;
- ✓ Avaliar a atividade larvicida do óleo essencial do pericarpo do *Citrus limon* Linneo (Limão) frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti* e calcular a concentração letal a 50% (CL50) do óleo a partir do teste de toxicidade;
- ✓ Comparar a atividade larvicida do óleo essencial do pericarpo do *Citrus limon* Linneo (Limão), com o componente majoritário frente ao *Aedes aegypti*.

Metodologia

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

O presente trabalho foi desenvolvido empregando metodologias descritas na literatura, para sua execução foram utilizados diversos equipamentos disponibilizados pelos seguintes laboratórios: no Laboratório de Físico-Química do Pavilhão Tecnológico, Núcleo de Combustível, Catálise e Ambiental (NCCA), Herbário Ático, Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Central Analítica da Unicamp.

4.1 Método de obtenção do óleo essencial dos pericarpos do *Citrus limon* Linneo (Limão)

4.1.1 Origem, identificação do material vegetal

Os frutos utilizados nesta pesquisa foram adquiridos em um sítio localizado na estrada da mata, Povoado Matinha, São José de Ribamar, Maranhão, durante o mês de junho de 2011. Os frutos foram acondicionados em sacos de polietileno e transportados ao Laboratório de Físico-Química e Microbiologia do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão – UFMA.

Figura 5- *Citrus limon* Linneo



Fonte: Autor (2012).

Para identificação da planta foram seguidas orientações técnicas para coleta como retirar partes estruturais vegetativas representativas e reprodutivas

(flores e frutos), não contendo partes danificadas, com tamanho entre aproximadamente 30 a 40 cm, em seguida acondicionadas em papel de jornal e transportadas ao Herbário Ático da Universidade Federal do Maranhão, onde foram selecionadas as partes mais representativas dispostas em jornais e acondicionados entre folhas de papelão, presos por um barbante. Estes foram prensados e secos a 37 – 40°C por 24 horas e depois foram presas e montadas em cartolina na qual foi afixada uma ficha contendo: família, nome científico, hábito, habitat, local e data de coleta, nome vulgar, determinador.

4.1.2 Extração do óleo essencial do pericarpo do *Citrus limon* Linneo (Limão)

Para a extração do óleo foi empregado o processo por hidrodestilação utilizando-se um sistema de Clevenger modificado em vidro acoplado a um balão de fundo redondo de 1000 mL, tendo como fonte de calor uma manta de aquecimento (Figura 6) a 100°C (FARMACOPEIA, 2010). Para cada batelada de extração foram utilizados 30 g do pericarpo do fruto com 300 mL de água destilada. Após 3,5 h cessou-se a destilação e o óleo obtido foi centrifugado para separação de resíduos de água e seco por meio da percolação com Na₂SO₄, sendo então armazenados em ampolas âmbar e lacrados por aquecimento (Figura 7). As amostras foram acondicionadas sob refrigeração para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis, sendo posteriormente submetidos às análises.

Figura 6- Extrator de clevenger



Fonte: Autor (2012).

Figura 7- Óleo extraído do pericarpo do *Citrus limon* Linneo



Fonte: Autor, (2012).

4.1.3 Rendimento da extração do óleo essencial do pericarpo do *Citrus limon* Linneo (Limão)

O cálculo do rendimento da extração foi avaliado de duas formas, uma, baseado na relação massa/volume, onde o volume foi sendo observado no próprio sistema de extração, sendo feitas seis extrações nos tempos 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; e 5,0 horas, e o melhor tempo foi determinado em função do rendimento de cada óleo essencial. A outra forma, expressa em porcentagem, na relação massa / massa pela medida da densidade, observando o volume máximo obtido de cada óleo por massa(g) dos vegetais em estudos, conforme fórmula abaixo (FARMACOPEIA, 2010; 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

Para a caracterização das propriedades físico-químicas do óleo essencial, foi determinada a densidade, solubilidade em etanol (90% v/v), índice de refração, cor e aparência.

4.2.1 Densidade

Determinou-se a densidade do óleo essencial utilizando um picnômetro de 1,0 mL, previamente seco, tarado e aferido, onde se adicionaram as amostras à 25°C, pesando-as em seguida (IAL, 2008).

4.2.2 Solubilidade em etanol (90%)

Para se determinar a solubilidade, foi colocado um volume constante de cada óleo essencial e adicionado volumes proporcionais da solução alcoólica previamente prepara a 90% (v/v) até solubilização total (FARMACOPEIA, 2010).

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 (FARMACOPEIA, 2010).

4.2.4 Cor e Aparência

A análise foi realizada visualmente, comparando as cores dos óleos essenciais com as cores conhecidas e já descritas na literatura e para a aparência se fez uma inspeção do óleo no que diz respeito a sua transparência ou limpidez (IAL, 2008).

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 de alta pureza 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 $1,0\ \mu\text{L}$ (injetor automático CP-8410) das amostras diluídas na proporção de $20\ \mu\text{L}$ em $1,5\text{ mL}$ de hexano.

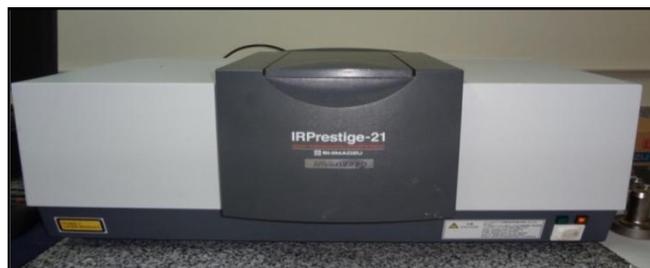
4.3.2 Análise Espectrométrica Vibracional na Região do Infravermelho

Analisou-se o óleo essencial por infravermelho no espectrômetro IR PRESTIGE-21, Fourier transform infrared spectrophotometer SHIMADZU (Figura 8). As amostras foram analisadas diretamente em janelas de KBr, usado como agente dispersante.

A caracterização na região do infravermelho foi obtida na região entre 4000 a $500\ \text{cm}^{-1}$.

Os espectros obtidos foram tratados mediante modelos de deconvoluções matemáticas com o objetivo de determinar os parâmetros espectrocópicos (altura, meia-largura e intensidade dos picos) de modo mais preciso. Sendo empregado o sistema computacional Peak Fit®, com linha de base *linear* D2, filtro de 75, largura da banda de 10,99850, amplitude de escaneamento de 100%.

Figura 8- Espectrofotômetro com transformada de Fourier.



Fonte: Autor (2012)

4.4 Teste de toxicidade

4.4.1 Obtenção e cultivo das larvas do *Aedes aegypti*

Os ovos foram coletados na Universidade Federal do Maranhão, Campus do Bacanga em São Luís Maranhão, através de armadilhas denominadas ovitrampas. Estas consistem de baldes pretos, de polietileno, com capacidade de 500 mL cada um, onde foi colocada água e inserida duas palhetas de eucatex para a ovoposição do mosquito (Figura 9). As armadilhas foram inspecionadas semanalmente para a substituição das palhetas e recolhimento dos ovos e encaminhados para o Laboratório de Físico-Química e Microbiologia do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Figura 9: Armadilha utilizada para a coleta dos ovos do *Aedes aegypti*.



Fonte: Autor (2012).

Inicialmente, os ovos do *Aedes aegypti* foram colocados para eclodir a temperatura ambiente (31°C aproximadamente) em recipiente de polietileno

contendo água mineral. As larvas obtidas foram alimentadas com ração para gato até atingirem o terceiro e quarto estágio, quando foram feitos os experimentos.

4.4.2 Teste larvicida

Estes foram feitos de acordo com a metodologia proposta por SILVA (2006). Inicialmente, foi preparada uma solução-mãe de 1.000 ppm através da pesagem 50 mg do óleo para uma solução formada por 49,75 mL de água destilada e 0,25 mL de tween-80. Desta solução, foram preparadas cinco soluções nas concentrações 30, 40, 50, 60, 70, 80 ppm. Para cada concentração foram utilizadas 10 larvas e 30 mL de cada solução nas concentrações citadas. Todos os testes foram realizados em triplicata e como controle negativo foi utilizado uma solução formada por 49,75mL de água para 0,25mL de tween-80, e como controle positivo, uma solução de temefós (O,O,O',O'-tetrametil O,O'-tiodi-p-fenileno bis (fosforotioato) a 100 ppm, equivalente a concentração utilizada pela fundação nacional de saúde (Funasa) para o controle larvicida do vetor, além do Novaluron (\pm -1-[3-cloro-4-(1-1-3-trifluoro-2-trifluoromethoxyethoxy) phenyl-3-(2,6-difluorobenzoyl) urea a 0,02 mg/L, dose adotada pelo Ministério da Saúde, que indica pelo OMS no intervalo de 0,01 a 0,05 mg/L (Figura 10).

Figura 10 - Larvicidas comerciais empregados: Themerfós e Novaluron.



Fonte: Autor, (2012).

Para quantificar a eficiência do óleo essencial como larvicida foram consideradas mortas, as larvas que não reagiram ao toque ou moribundas após 24 horas do início do experimento.

As larvas foram identificadas como *Aedes aegypti* (Figura 11), por técnicos do Laboratório do Núcleo de Patologia Tropical e Medicina Social do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão.

Figura 11- Larvas no terceiro estágio



Fonte: Autor, (2012).

4.4.3 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, conseqüentemente, 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, foi 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 e 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} .

Resultados e discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação botânica

Os frutos foram identificados como pertencentes à espécie *Citrus limon*, a planta está registrada no Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão sob o número 01072 (Figura 12).

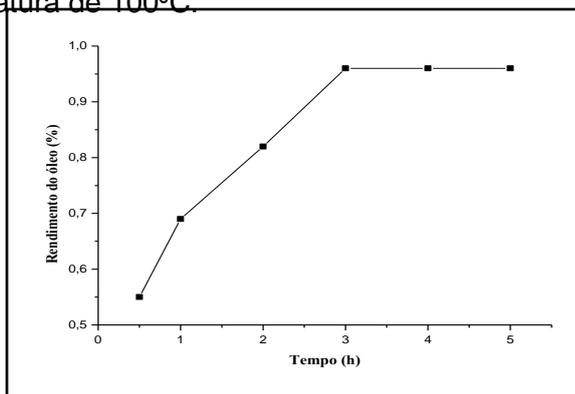
Figura 12- Exsicata da espécie *Citrus limon*.



5.2 Avaliação da cinética de extração do óleo essencial do *Citrus limon*

No gráfico da figura 13, pode ser observado os rendimentos obtidos durante um período de 3 horas, empregando 30 g da amostra e 300 mL de água destilada, com temperatura de 100°C.

Figura 13: Cinética referente ao rendimento de extração do óleo em função do tempo, com massa de 30g e temperatura de 100°C.



Nas condições determinada para extração do óleo essencial, observa-se que os tempos máximos de rendimento do óleo essencial extraído e do volume obtidos das cascas do *Citrus limon* ocorre em 3 h, e volume de 0,35 mL.

O rendimento da extração foi calculado diante da quantidade de óleo que se obteve a partir de uma massa de 30 g do material vegetal. Em média foi obtido um volume de 0,35 mL, sendo o rendimento m/v de 1,17% e como a densidade é de 0,823 g.mL⁻¹ (tabela 5.1), tem-se um rendimento m/m de 0,96%.

Ao extrair o óleo essencial do pericarpo do *Citrus limon*, Fernandes (2010), obteve um rendimento de 0,96% em m/m para um tempo o mesmo tempo de extração. Os volumes extraídos do óleo essencial estudado em relação ao mencionado 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.

5.3 Características físico-químicas do óleo essencial do pericarpo do *Citrus limon*

As características físico-químicas do óleo extraído da espécie *Citrus limon*, estão descritas na tabela 1, juntamente com demais dados descritos na literatura (FERNANDES, 2010).

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos dos óleos essenciais de *Citrus limon*

Propriedades Físico-Químicas	Óleo essencial estudado	Óleo essencial <i>Citrus limon</i> (Fernandes, 2010)
Densidade (g/mL) (25°C)	0,823	0,822
Solubilidade em álcool 90% (v/v)	1:3	1:3
Índice de refração ($N_D^{25^\circ}$)	1,4753	1,4754
Rendimento (%)	0,96	0,96
Cor	Incolor	Incolor
Aparência	Límpido	Límpido

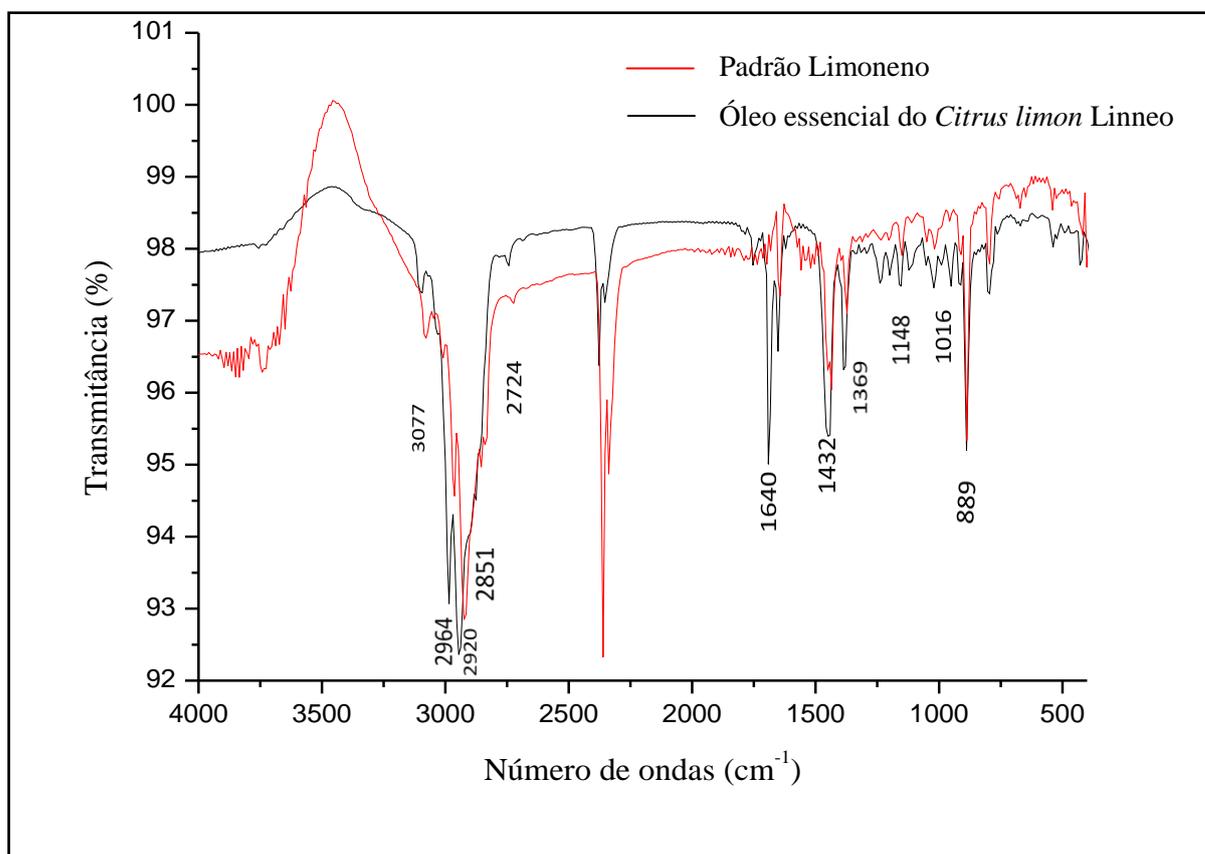
Comparando os resultados descritos na tabela, do estudo e os realizado por Fernandes (2010), possui valores semelhantes nas propriedades pesquisadas. As pequenas diferenças nos valores encontrados podem ser atribuídas a fatores tais como época de coleta, diferentes tipos de solo, condições e tempo de armazenamento.

5.4 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.

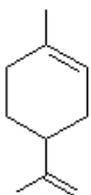
Os espectros na região do infravermelho do óleo essencial extraído do pericarpo do *Citrus limon* e do padrão de Limoneno podem ser observados na figura 14, onde as bandas de absorção possuem as mesmas frequências.

Figura 14 – Espectros da região do infravermelho do óleo essencial do *Citrus limon* e padrão Limoneno.



As bandas de absorção compreendida nas regiões de 2724 a 3077 cm^{-1} na Figura 14 são atribuídas a estiramentos C—H fracas resultantes de vibrações de alquenos e as vibrações de deformação axial da ligação C=C acopla-se com a vibração de deformação axial das ligações C—C adjacentes, nas regiões 889 a 1640 cm^{-1} (SILVERSTEIN, 2007).

Tabela 2 - Principais bandas de absorção e modos vibracionais do padrão de limoneno e do óleo essencial da casca do *Citrus limon* na região do infravermelho

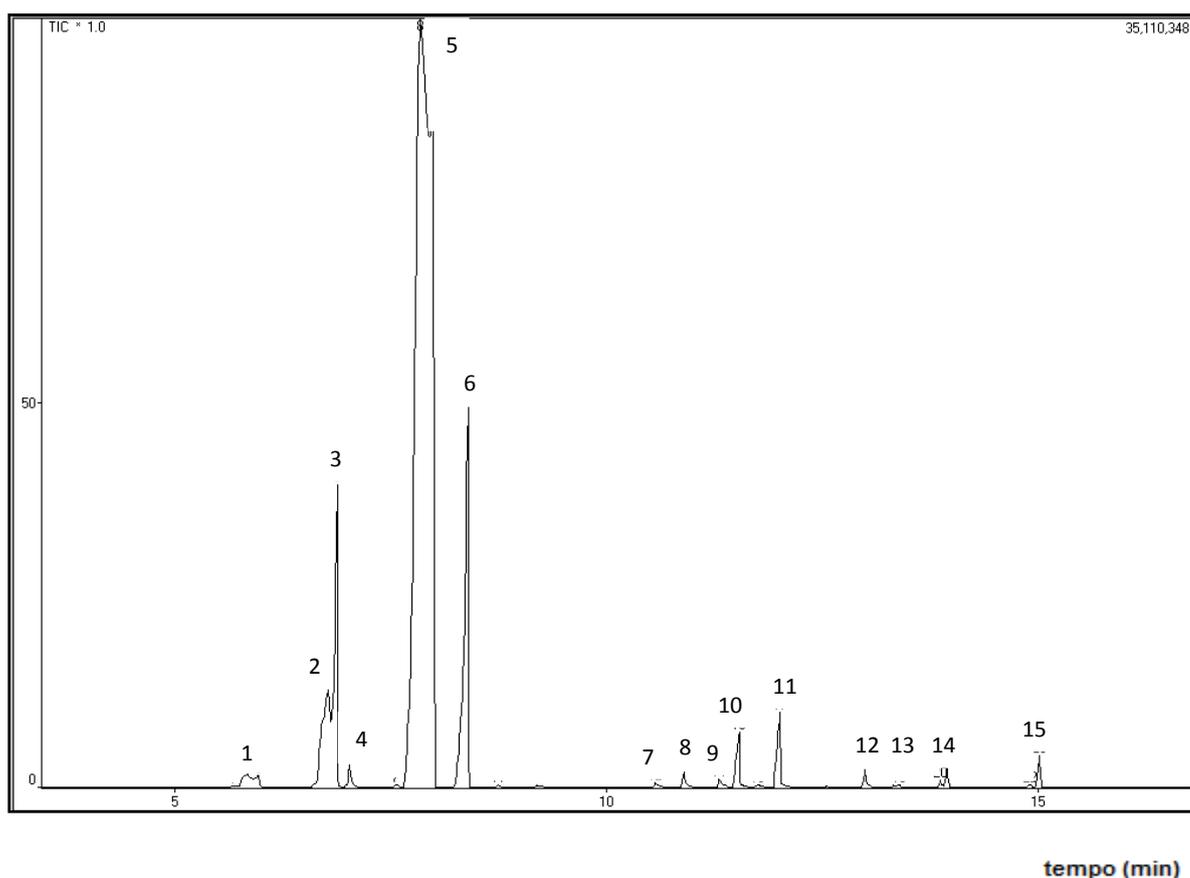
Composto (limoneno)	Tipo de deformação	Grupo Funcional	Tipo de ligação	Absorção (cm^{-1})	
				Limoneno	Óleo
	Axial	Alqueno	C—H	3076	3077
	Axial	Metila	C—H	2962	2964
	Axial	Alifático	C=C	1639	1640

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

O cromatograma do óleo essencial do *Citrus limon* 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 pericarpo do *Citrus limon* pode ser observados na Figura 15.

Figura 15 – Cromatograma da amostra do óleo do pericarpo do *Citrus limon*, 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 *Citrus limon* em ordem de tempo de retenção.

Tabela 3 – Compostos identificados na amostra do pericarpo do *Citrus limon*.

Pico ¹	tr ² (min.)	Componentes	% A ⁴	Qualidade ⁴
1	5,858	α -Pineno	0,72	95
2	6,775	Sabineno	5,08	92
3	6,875	β -Pineno	4,91	93
4	7,033	β -Mirceno	0,45	91
5	7,845	Limoneno	58,81	90
6	8,408	γ -Terpineno	9,01	93
7	10,575	Terpine-4-ol	0,13	89
8	10,892	α -Terpinenol	0,31	96
9	11,308	Trans-geraniol	0,25	92
10	11,525	β -Citral (neral)	1,11	93
11	12,000	α -Citral (geranial)	1,61	92
12	13,000	Acetato de geranil	0,32	93
13	13,400	α -Muleno	0,11	85
14	13,950	Bergamoleno	0,29	92
15	15,017	β-Bisaboleno	0,50	92

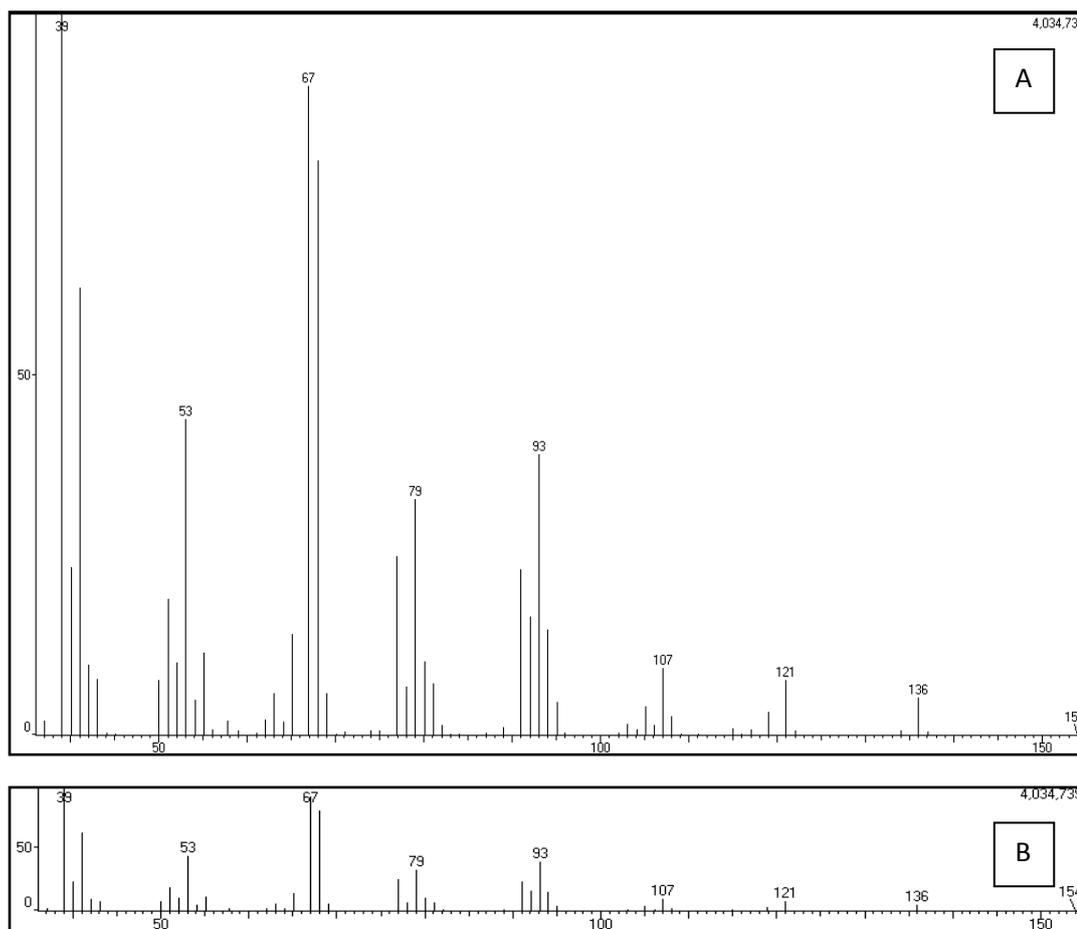
Nota: ¹Número do pico pela ordem de eluição da coluna; ²tr: Tempo de retenção dos composto na coluna em minutos; %A⁴: Porcentagem da área normalizada a qual indica a distribuição relativa dos componentes na amostras e Qualidade⁴: índice de pesquisa na base de dados que reflete a similaridade do espectro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

O constituinte majoritário do óleo foi o limoneno com 58,81%, seguido em ordem decrescente de teor, o γ -terpineno com 9,01%, sabineno com 5,08%, β -pineno com 4,91%, β -citral com 1,61%, α -citral com 1,11%, α -pineno com 0,72, β -bisaboleno com 0,50, α -terpinenol com 0,31%, mirceno com 0,45%, bergaboleno com 0,29%, acetato de geranil com 0,32%, trans-geraniol com 0,25%, terpine-4-ol com 0,13% e α -humuleno com 0,11%.

Nas Figuras 16-21 podem ser observados os fragmentogramas correspondentes a alguns componentes identificados no óleo essencial.

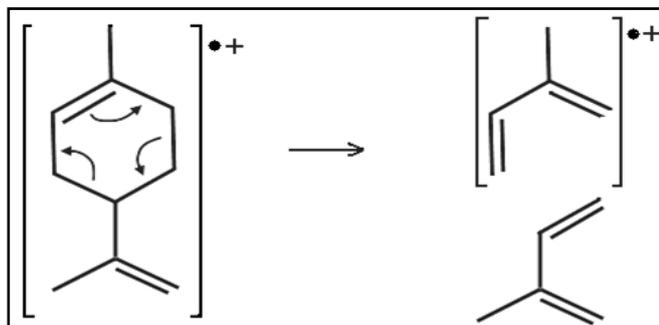
De acordo com o banco de dados da espectroteca WILEY 229 e de padrões constantes na literatura (ADAMS, 2007), o pico 5 da Figura 15 corresponde ao limoneno, $C_{10}H_{18}$, evidenciado pela presença do íon molecular $m/z=136$ observado no espectro de massas da Figura 16.

Figura 16- (A) Espectro de massa do Limoneno. (B) Espectro de massa da espectroteca WILEY 229.



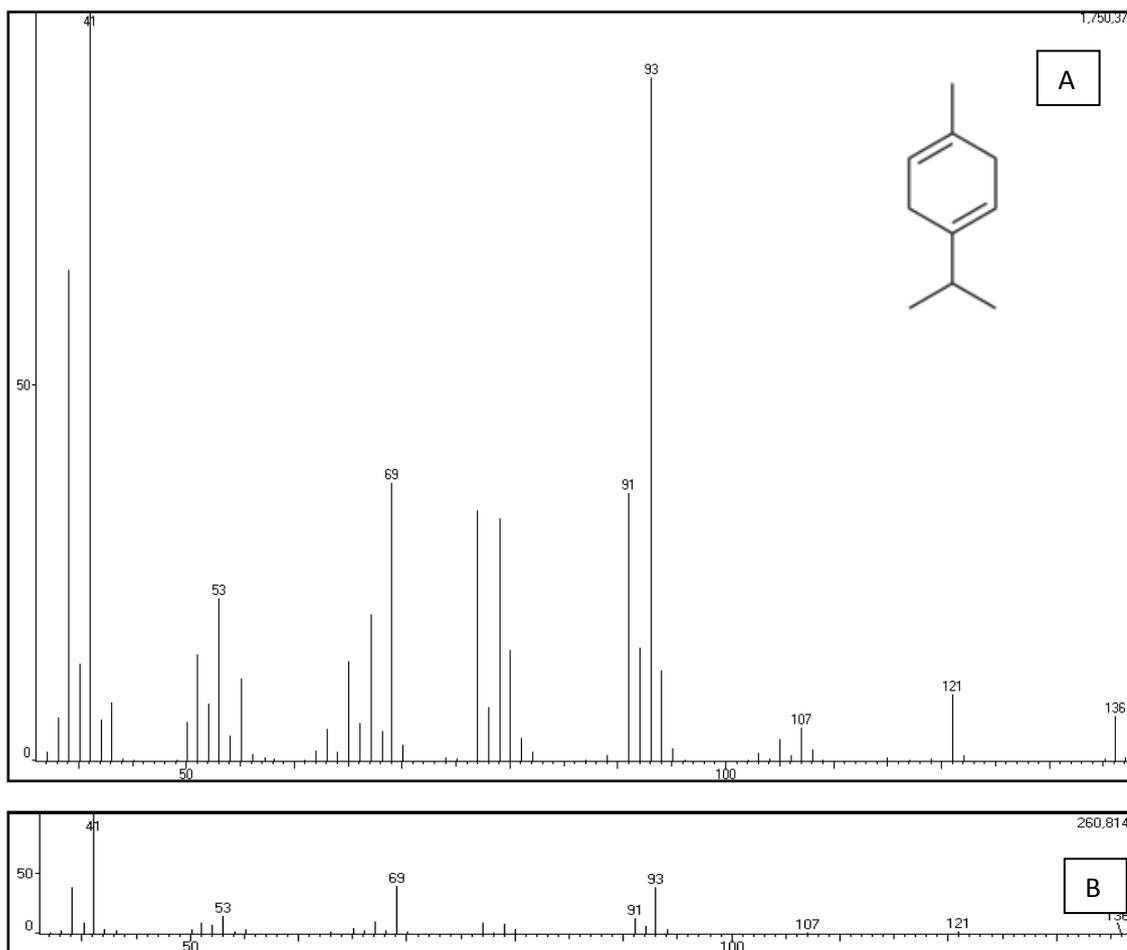
O referido espectro de massas mostra ainda picos característicos de hidrocarbonetos: o pico m/z 121 [M-15] é referente à perda do grupo metila, enquanto que os picos m/z 107 [M-15-14] e m/z 93 [M-15-14-14] são decorrentes da subsequente perda do grupo metileno. O aparecimento do pico com m/z 68 ($C_5H_8^+$)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

Figura 17- Ocorrência da reação de retro-Diels-Alder na fragmentação do limoneno.



Na Figura 18 o espectro de massas corresponde ao constituinte identificado como Sabineno e os possíveis fragmento.

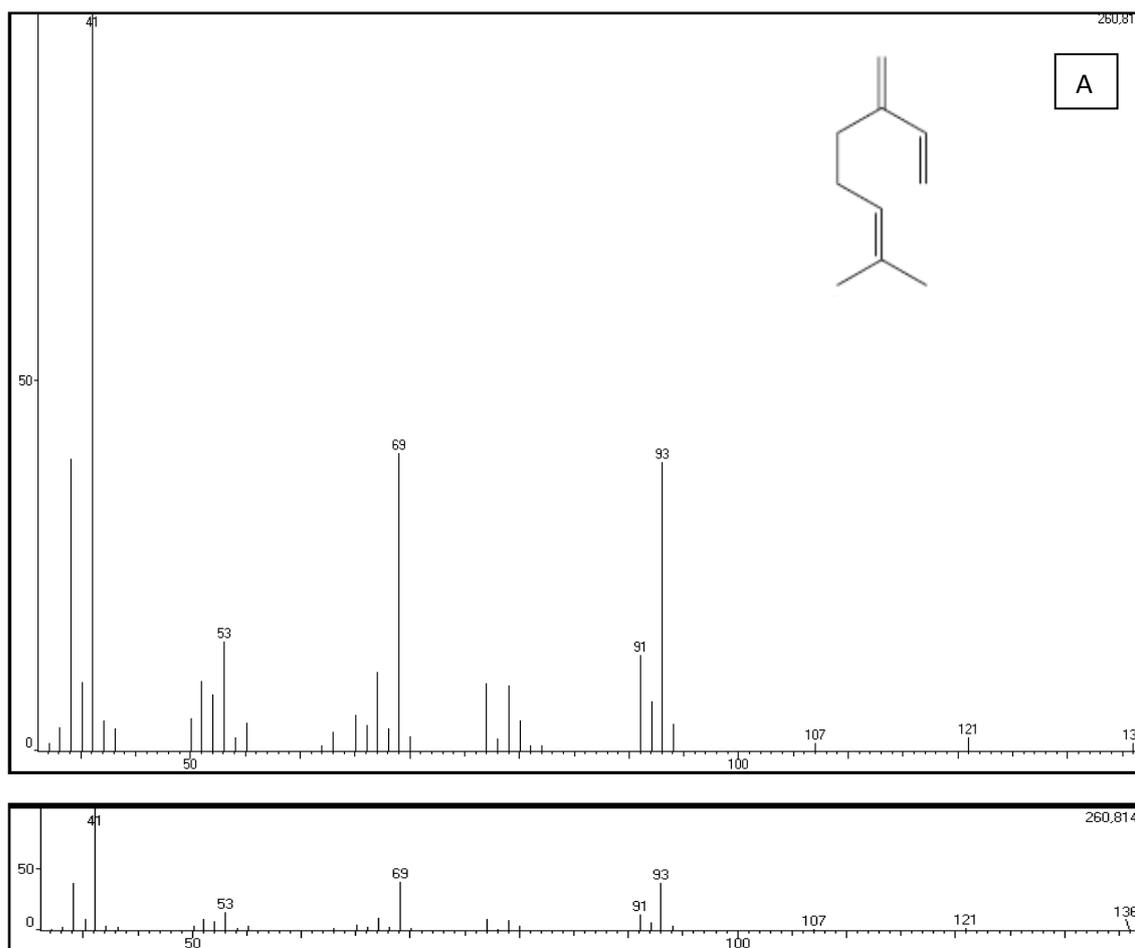
Figura 18. (A) Espectro de massa do Sabineno. (B) Espectro de massa da espectroteca WILEY 229.



A fragmentação do sabineno pode ser observada na Figura 5.24, onde apresenta o pico molecular m/z 136, mostrando ainda o pico m/z 121 referente a perda do grupo metila, enquanto o pico m/z 93, cuja estrutura $C_7H_9^+$, pode ser em decorrência da isomerização seguida de clivagem alílica e o pico m/z 79 originados subsequente pela perda do grupo metileno.

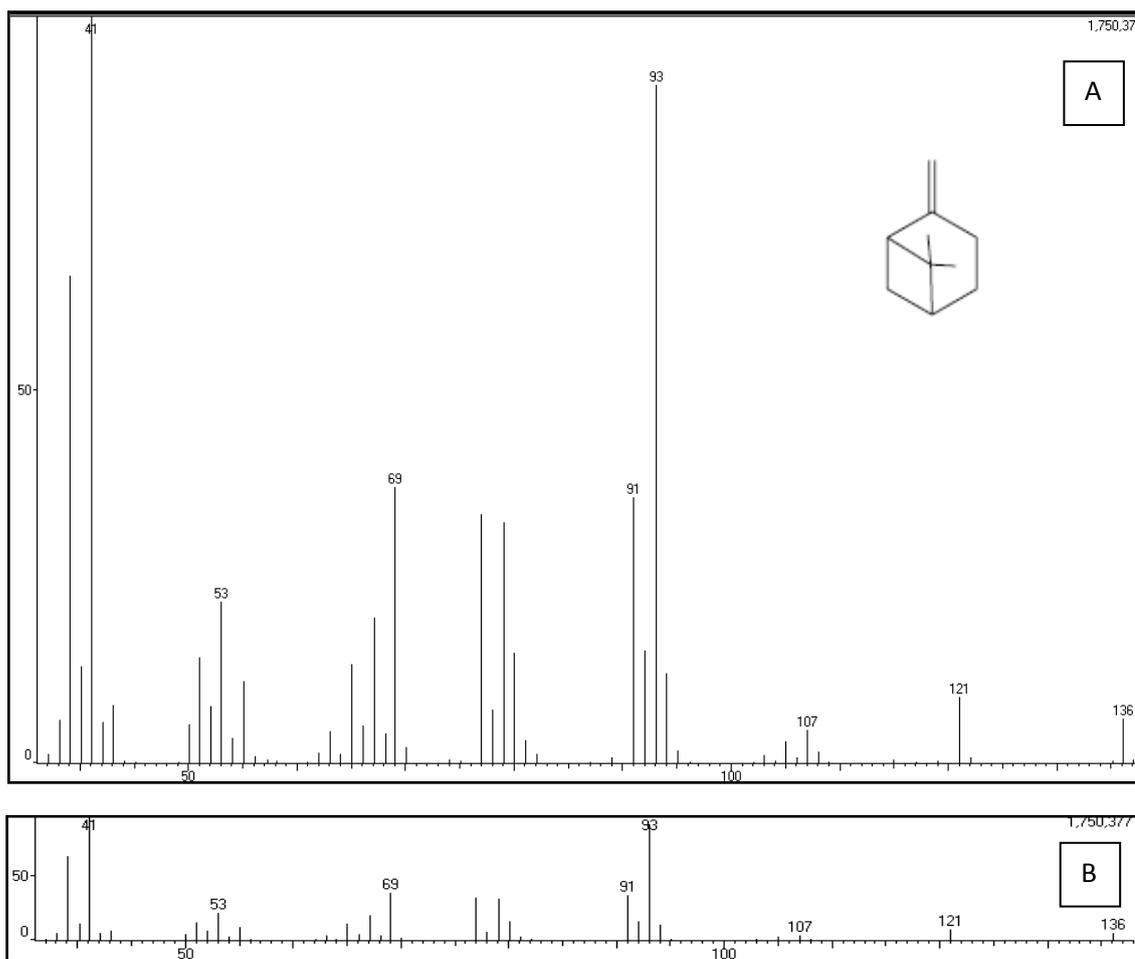
O pico 4 da figura 15 foi identificado, segundo a espectroteca WILEY229 e a literatura (ADAMS, 2007), como sendo o β - mirceno de fórmula $C_{10}H_{16}$ e massa molecular correspondente a 136 g mol^{-1} (Figura 18). Esse hidrocarboneto monoterpênico apresenta o pico molecular m/z 136 e o pico intenso em m/z 93, o qual é referente à estrutura $C_7H_9^+$ formada por isomerização, seguida de clivagem alílica (SILVERSTEIN et al, 2007).

Figura 19: (A) Espectro de massa do Sabineno. (B) Espectro de massa WILEY229.



O pico 3 da figura 15 foi identificado, segundo a espectroteca e a literatura (ADAMS, 2007; FEITOSA et al., 2009), como sendo o β -pineno de fórmula $C_{10}H_{16}$ e massa molecular correspondente a 136 g mol^{-1} (Figura 19). Esse hidrocarboneto monoterpênico apresenta o pico molecular m/z 136 e o pico característico em m/z 121 [M-15], referente à perda do grupo metil. O espectro de massa apresenta ainda os picos em m/z 107 [M-15-14] e m/z 93 [M-15-14-14], os quais são originados da subsequente perda do grupo metileno. O pico em m/z 41 é atribuído ao fragmento $C_3H_5^+$ formado durante a clivagem da ligação carbono-carbono, acompanhado de perda de hidrogênio. O pico em m/z 69 refere-se ao fragmento $C_5H_9^+$, resultante de clivagem alílica (SILVERSTEIN et al., 2007).

Figura 20: (A) Espectro de massa do β -pineno. (B) Espectro de massa WILEY229.



5.6 Atividade Larvicida

A atividade larvicida do óleo essencial extraído do pericarpo do *Citrus limon* foi testado em oito concentrações diferentes: 5, 10, 30, 50 e 70 mg L⁻¹, sendo *n*, o número de larvas do mosquito *Aedes aegypti* utilizadas no ensaio larvicida para cada concentração (totalizando 10 larvas por ensaio).

Para cada concentração os testes foram realizados em triplicata. Os dados sobre o número de larvas vivas e de larvas mortas foram encontrados através de uma média das três repetições para cada uma das 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 do pericarpo do *Citrus limon*.

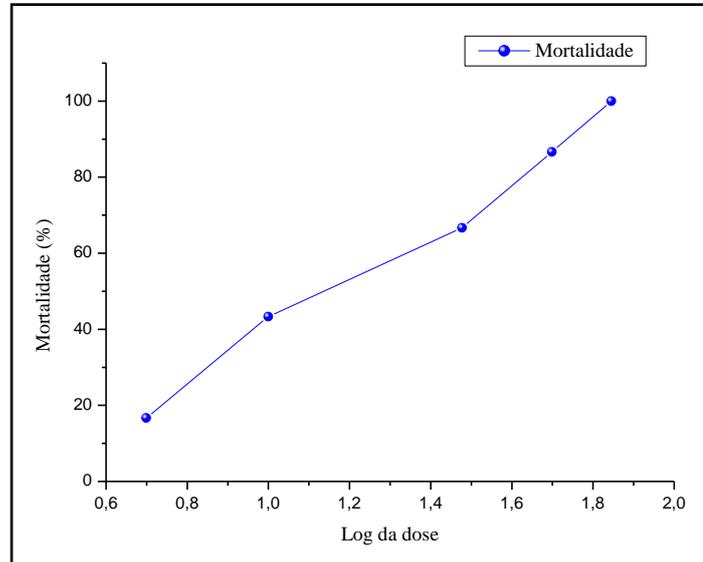
Dose (mg/L)	Log dose	Mortos	Vivos	Acumulados mortos	Acumulados vivos	Mortalidade %
70	1,8451	10,0000	0,0000	31,3331	0,0000	100
50	1,6989	8,6666	1,3334	21,3331	1,3334	86,6660
30	1,4771	6,6666	3,3334	12,6665	4,6668	66,6660
10	1,0000	4,3333	5,6667	5,9999	10,6667	43,3330
5	0,6989	1,6666	8,3334	1,6666	19,0001	16,6660

Número de larvas (*n* = 10).

De acordo com a Tabela 4, a concentração de 5 µg mL⁻¹ do óleo essencial do pericapo do *Citrus limon* apresentou a menor atividade larvicida, matando, em média, uma larva, o que corresponde a 16% de mortalidade. Na concentração de 30 µg mL⁻¹ apresentou uma mortalidade de 66%. A partir da concentração de 70 µg mL⁻¹ do óleo essencial a atividade larvicida começou a crescer exponencialmente, até provocar a morte de 100% dos indivíduos testados.

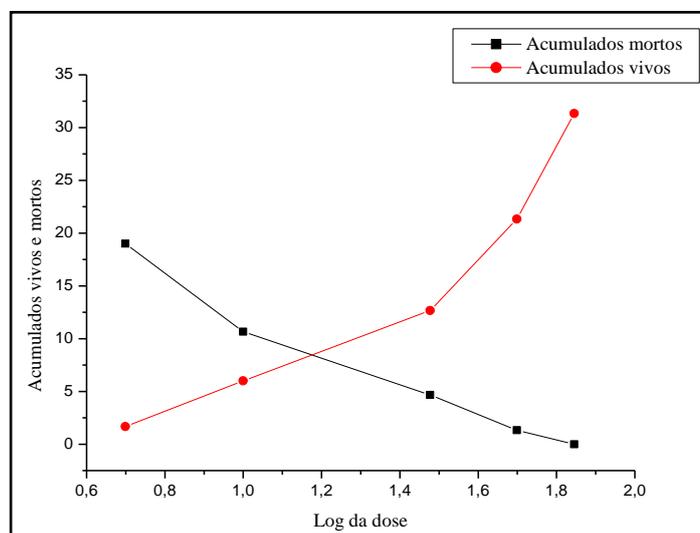
A taxa de percentagem da mortalidade das larvas frente o óleo é mostrada na Figura 21, mostrando-se o crescimento exponencial a partir do Log dose 1,4771.

Figura 21 – Taxa de mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* – expostas a cinco concentrações diferentes do óleo essencial do pericarpo do *Citrus limon*, após 24 horas – versus o logaritmo de cada dose aplicada.



A Figura 21 mostra que a Concentração Letal 50% (CL_{50}), concentração na qual cinquenta por cento das larvas testadas morrem, foi encontrada próxima ao Log dose 1,1769 (abaixo da concentração de $20\mu\text{g mL}^{-1}$). De acordo com Cheng et al. (2003) valores de $CL_{50} < 100\mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados ativos.

Figura 22 – Estimativa da CL_{50} do óleo essencial do pericarpo de *Citrus limon* 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.



Em paralelo e seguindo os mesmos procedimentos na avaliação da toxicidade do óleo essencial extraído do fruto do *Citrus limon*, foram realizados para o padrões de L- limoneno e D-limoneno.

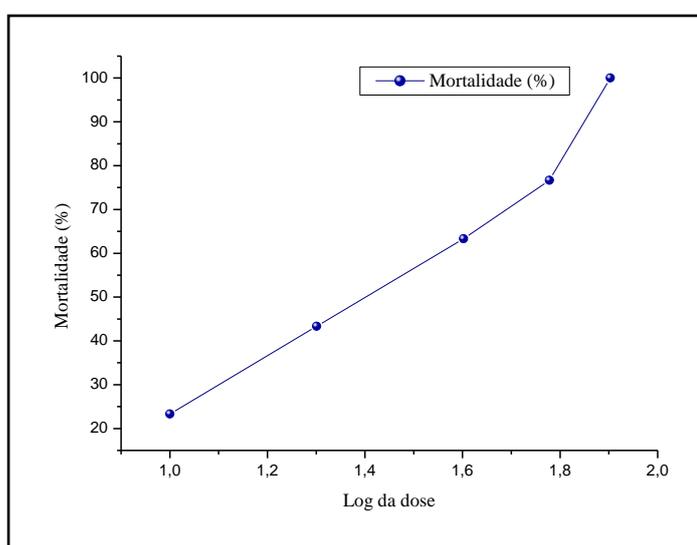
Na tabela 5, estão descritos as concentrações e os valores obtidos durante o teste larvicida empregando o padrão L-limoneno.

Tabela 5 – Mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição em várias concentrações do padrão L-limoneno.

Dose (mg/L)	Log dose	Mortos	Vivos	Acumulados mortos	Acumulados vivos	Mortalidade %
80	1,9030	10,0000	0,0000	30,6665	0,0000	100
60	1,7781	7,6666	2,3334	20,6665	2,3334	76,6660
40	1,6020	6,3333	3,6667	12,9999	6,0001	63,3330
20	1,3010	4,3333	5,6667	6,6666	11,6668	43,3330
10	1,0000	2,3333	7,6667	2,3333	19,3335	23,3330

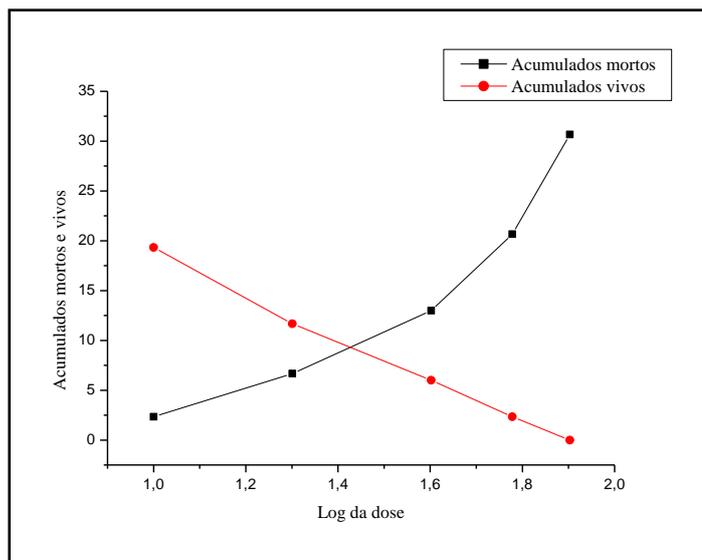
A taxa de percentagem da mortalidade das larvas frente o padrão de L-limoneno é mostrada na Figura 23, mostrando-se o crescimento exponencial a partir do Log dose 1,6020.

Figura 23 – Taxa de mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* – expostas a cinco concentrações diferentes do padrão de L-limoneno, após 24 horas – versus o logaritmo de cada dose aplicada.



A Figura 24 mostra que a Concentração Letal 50% (CL₅₀), concentração na qual cinquenta por cento das larvas testadas morrem, foi encontrada próxima ao Log dose 1,4270 (abaixo da concentração de 30µg mL⁻¹).

Figura 24 – Estimativa da CL₅₀ do padrão de L-limoneno 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.



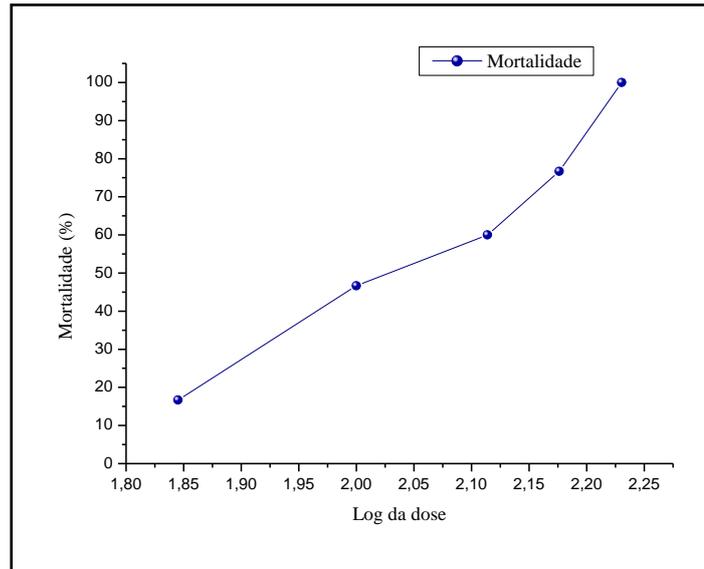
Na tabela 6, estão descritos as concentrações e os valores obtidos durante o teste larvicida empregando o padrão D-limoneno.

Tabela 6 – Mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição em várias concentrações do padrão D-limoneno.

Dose (mg/L)	Log dose	Mortos	Vivos	Acumulados mortos	Acumulados vivos	Mortalidade %
170	2,2304	10,0000	0,0000	29,9998	0,0000	100
150	2,1761	7,6666	2,3334	19,9998	2,3334	76,6660
130	2,1139	6,0000	4,0000	12,3332	6,3334	60,0000
100	2,0000	4,6666	5,3334	6,3332	11,6668	46,6666
70	1,8451	1,6666	8,3334	1,6666	20,0002	16,6666

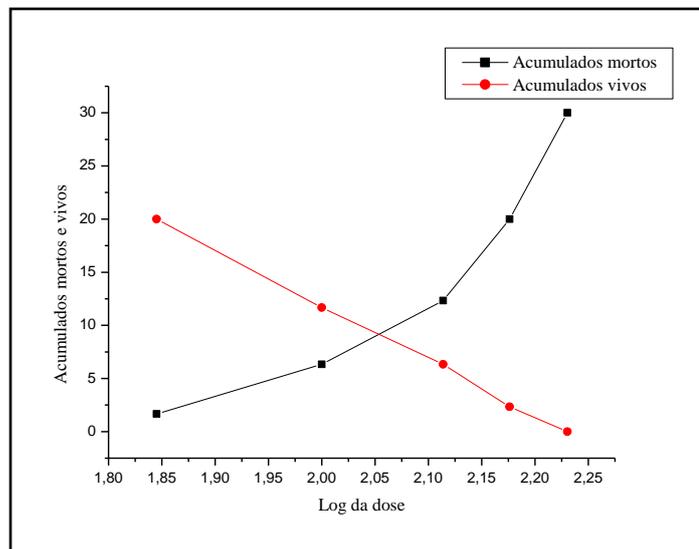
A taxa de percentagem da mortalidade das larvas frente o padrão de D-limoneno é mostrada na Figura 25, mostrando-se o crescimento exponencial a partir do Log dose 2,1139.

Figura 25 – Taxa de mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* – expostas a cinco concentrações diferentes do padrão de D-limoneno, após 24 horas – versus o logaritmo de cada dose aplicada.



A Figura 26 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, 1769.

Figura 26 – Estimativa da CL_{50} do padrão de D-limoneno 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 do pericarpo do *Citrus limon* foi calculada através da intersecção das curvas de indivíduos acumulados mortos e indivíduos acumulados vivos da Figura 22, tendo como resultado a concentração de $14,99 \mu\text{g mL}^{-1}$ com um intervalo de confiança de $2,45 \mu\text{g mL}^{-1}$. De acordo com o óleo essencial da espécie é composta por l-limoneno e d-limoneno, seguindo os mesmo procedimentos foi encontrado um valor de CL_{50} de $26,73 \mu\text{g mL}^{-1}$ com um intervalo de confiança de $2,02 \mu\text{g mL}^{-1}$, para um padrão de l-limoneno e para e CL_{50} de $113,24 \mu\text{g mL}^{-1}$ com um intervalo de confiança de $2,02 \mu\text{g mL}^{-1}$, para o d-limoneno.

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 e COTAS, 1998, LIMA, 2009, LEITE, 2009).

Cols (2006) descreve ainda que a continuação da aplicação do temefós, aumenta a pressão seletiva por esse organofosforado e a probabilidade de elevar cada vez mais os níveis de resistência das populações de *A. aegypti* já existente. Além da substituição do larvicida, sugere ainda que se invista em formas de controle alternativas que possam eliminar ou minimiza os riscos de desenvolvimento de resistência aos produtos utilizados. Uma delas é o controle integrado, medida que está sendo incentivada no Brasil, envolvendo o controle químico, biológico e mecânico, com a participação da população e respeitando as peculiaridades de cada área infestada. Dessa forma, estratégias de educação ambiental e educação em saúde devem, necessariamente, ser desenvolvidas. Também é indispensável que haja investimento no sistema de saneamento básico, coleta de lixo e outras formas de manejo urbano que minimize o risco representado por criadouros de *A. aegypti*.

Diante desse panorama, os resultados alcançados com o óleo do pericarpo do *Citrus limon* 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 do pericarpo do *Citrus limon* 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*.

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 do pericarpo do *Citrus limon* Linneo. 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 *Citrus limon* Linneo apresenta atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti*.

Diante dos resultados obtidos conclui-se que:

1. As técnicas espectroscópicas foram eficientes para a confirmação e identificação do limoneno como componente majoritário, com teor de 58,81%, e de componentes minoritários no óleo essencial do *Citrus limon* Linneo.
2. O presente estudo demonstrou que a espécie *Citrus limon* Linneo, forneceu uma quantidade de óleo essencial significativa, cujo rendimento foi de 0,96% (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 *Citrus limon* Linneo apresenta atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* sendo que o óleo essencial apresentou uma CL_{50} , com valor $14,99 (\pm 2,45) \mu\text{g mL}^{-1}$.
5. As larvas do *Aedes aegypti* são susceptíveis a composição do óleo essencial dos pericarpo do *Citrus limon* Linneo;

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

"

Referências

REFERÊNCIAS

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

ADORJAR, B. ; BUCHEBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and fragrance Journal**, v. 25, p. 407- 426, 2010.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F. BARBOSA FILHO, J. M. Synopsis of the plantas known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmagnosia**, v. 17. n1, p.114-140, 2007.

ARAÚJO JÚNIOR, C. P. **Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais de frutas cítricas**. 2009, 80 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

ARBOVIRUS. **Aedes aegypti: ciclo evolutivo**. Disponível em: <http://www.arbovirus.health.nsw.gov.au/areas/arbovirus/mosquit/photos/aedes_aegypti_pupa.jpg> Acessado em: 4. ago. 2012.

ARIAS, B. A.; RAMÓN-LACA, L. Pharmacological proprieties of citrus and the ancient and medieval uses in the Mediterranean region. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, n.1, p.89-95, 2005.

AUGUSTO, L. G da S.; CÂMARA-NETO, H. F. **Dengue: insutentabilidade do PEAa**. Anais do XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, Porto alegre – RS, 2007.

AZAMBUJA, W. **Óleo essencial de limão**. Disponível em: <<http://oleosessenciais.org/oleo-essencial-de-limao/>> . Acesso em: 6 mar. 2012.

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.

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

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.

BRADLEY, D. J. The particular and general. Issues of specificity and verticality in the history of malaria control. **Parassitologia**. v. 40, p.5–10, 1998.

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

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

Brasil. Caderno Saúde Pública, Rio de Janeiro, v.18(1),p.187-195, jan-fev, 2002.
BROWN, A.W.A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review.
Journal American Mosquito Control Association.v. 2, p40-123, 1986.

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

CAMPELO, M. L.; LIMA, S.G.; FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M. Evaluation of central nervous system effects of Citrus limon essential oil in mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**.v.21(4), p.668-673, Jul./Aug. 2011.

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 sidoide against Aedes aegypti. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n. 98, p. 569-71, 2003.

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

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

CDC. **Dengue - Centers for disease control and prevention**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/dengue/>> Acesso em: set. 2012

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.

CLÁUDIO JUNIOR, P. A. **Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais de frutas cítricas**, 2009, 80 f. Dissertação (Mestrado em Química)- pós-graduação em química Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009

COELHO, A. M.; PAULA, J. E.; ESPÍNDOLA, L. Atividade larvicida de extratos vegetais sobre Aedes aegypti (L.)(Diptera: Culicidae), em condições de laboratório. **Biossay**, v. 4, 2000

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

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 *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia/Brazilian Journal of Pharmacognosy.**, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005

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

CUNHA, S. et al. Cultivo dos Citros. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMP. 13p. 1996

Dengue mapas. Disponível em: <http://www.dengue.org.br/dengue_mapas.html> . Acesso em: set. 2012

Dengue. Disponível em: <www.portal.saude.gov.br> . Acesso: jun. 2012

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. 5. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2010, 1.320p

FEITOSA, E. M. A.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTIAGO, G. M. P.; LEMOS, T. L. G.; OLIVEIRA, C. F.; VASCONCELOS, J. N.; LIMA, J. Q.; MALCHER, G. T.; NASCIMENTO, R. F.; BRAZ-FILHO, R. Chemical composition and larvicidal activity of *rollinia leptopetala* (Annonaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, 20(2): S1, 2009

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L. A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira Ciência Farmacologia**, v. 42, n. 3, 2006

FERHAT, M.A.; MEKLATI, B.Y.; CHEMAT, T.F. Comparison of different isolation methods of essential oils from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave "dry" distillation. **Flavour and fragrance Journal**, v. 22, p.494-504, 2007

FERNANDES, R. P. **Caracterização química, avaliação da toxicidade e atividade moluscicida dos óleos essenciais da folha de *Pimenta dioica* Lindl, casca de *Citrus limon* Linneo e rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe**. 2011. 130 p. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, UFPA, Paraíba, 2011

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

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

GOVINDARAJAN, M. Larvicidal and repellent activities of *Sida acuta* Burm. F. (Family: *Malvaceae*) against three important vector mosquitoes. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.691-695, 2010

GRASSI FILHO, H.; PENTEADO, B.B.; SANTOS, C.H. Preparo de amostras e métodos para a determinação do teor de Óleo essencial de frutos de limoeiro. **Revista Brasileira. Fruticultura**. Jaboticabal - SP, v. 27, n. 1, p. 191-193, Abril 2005

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

KARR, L.L.; COTAS, J.R. Insecticidal properties of dlimonelene. **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 Proteeae: a review of 132 cases during a decade (1991-2000). **Scandinavian Journal of Infections Diseases**. v. 35, n. 2, p. 98-103, Feb. 2003

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

LEITE, A.M.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; DINIZ, M. F. F. M.; LEITE, S.P.; XAVIER, A.L.; MEDEIROS, I.A. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.4, p. 842-846, out./dez. 2009

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

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; MELO, B. A.; RODRIGUES, V. G.; GUIMARÃES, P. L. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Amazônica**. v.39, n.2, p.377-382, 2009

LOTA, M.L; SERRA, D. DE R.; TOMI, F.; JACQUEMOND, C.; CASANOVA, J. Volatile components of peel and leaf oils os lemon and lime species. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v.50, p.796-805, 2002

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.

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, I. M. C. L. B. **Avaliação da ação antigungica de *Citrus Limon* Linn. frente a leveduras do gênero *Candida***. Programa de pós-graduação em odontologia UFPB. Mestrado em Diagnostico Bucal, João Pessoa, 2009

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue: Situação epidemiológica**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/index.cfmportal.boletim>> Acesso em: set. 2012

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento / Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. – Brasília: Fundação Nacional de Saúde., 20p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos, nº 176), 2002

Mosquito da dengue. Disponível em: <http://ambienteacreato.pot.com/2009/03/diferencas-entre-o-pernilongo-comum-e-o.html> Acesso em: abr. 2011

MOREIRA, R. C. R.; REBÊLO, J. M. M.; GAMA, M. E. A.; COSTA, J. M. L. Nível de conhecimentos sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil, **Caderno Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 18(1):187-195, jan-fev, 2002

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.

OJASTI, J; JIMÉNEZ, E G; OTAHOLA, E S; ROMÁN, L B G. **Informe sobre las Especies Exóticas en Venezuela, Caracas**. Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales, 2001.

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.

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.

PENIDO, A.A.B. SILVA, M. W. B. **Guia Fitoterápico**, Facimp. p.11-14, p.59-65, 2007

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-decasos-de-dengue-cai-61-no-primeiro-bimestre.html>> Acesso em: 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, p. 367-378., 1983

RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual Reviews Entomology**, v.45, p.371–391, 2000

RAQUEL PATRO. ***Citrus limon***. Disponível em: < www.jardineiro.net/br/banco/citrus_limon.php>. Acesso em: jun. 2007

REDA, S. Y.; LEAL, E. S.; BATISTA, E. A.; BARANA, A. C.; SCHNITZEL, E. CARNEIRO, P.I.B. Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (*Citrus limonia* osbeck) e limão siciliano (*Citrus limon*), um resíduo agroindustrial. **Ciência Tecnologia Alimentar**, Campinas, v. 25, n.4, p. 672-676, out.-dez. 2005

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

SANTOS, R. B.; LACERDA JÚNIOR, V.; CASTRO, E. V. R.; BALTHAR, V. O.; GRECO, S. J. Uso de quimiométrico e mecânicos- quântico na análise de terpenóides e fenilpropanóides bioativos contra o *Aedes aegypti*. **Orbital**, v.1, n.4, p.273-288, 2009

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

SBMT. Disponível em: < http://www.sbmt.org.br/site/corpo_texto/358. Acesso em: mai. 2012

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

SILVA, R.S. MAGNO,C.R.; RIBEIRO, M. N.; BLOIS , B. S.O.; BLOIS, G.S.O. Óleo essencial de limão no ensino da cromatografia em camada delgada. **Química Nova**, v. 32, N. 8, p. 2234-2237, 2009

SILVA, W. J. **Atividade larvica do óleo essencial de plantas existentes no Estado de Sergipe contra Aedes aegypti Linn**. 2006. 81p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Progama 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 larvica 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

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: jan. 2011

TELES, R. M. **Caracterização química, avaliação térmica e análise larvica 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

TAUIL, P.L. Urbanization and dengue ecology. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.17, p.99-102, 2001

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

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

VENDRUSCOLO, G.S.; RATES, S. M. K. ; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmagnosia**, v.15, n.4,p. 361-372, 2005

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

WHO. Vector resistance to pesticides. Fifteenth report of the expert committee on vector biology and control **Tech. Rep. Ser.v. 818**, p.1–55, 1992

