



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

GILSON VITORINO DE ASSUNÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA
FRENTE ao *Aedes aegypti* do ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE *Citrus sinensis*
L. Osbeck (LARANJA DOCE)**

São Luís

2013

GILSON VITORINO DE ASSUNÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA
FRENTE ao *Aedes aegypti* do ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE *Citrus sinensis*
L. Osbeck (LARANJA DOCE)**

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

Orientador: Prof^o. Dr^o. Victor Elias Mouchrek
Filho

São Luís

2013

GILSON VITORINO DE ASSUNÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA
FRENTE ao *Aedes aegypti* do ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE *Citrus sinensis*
L. Osbeck (LARANJA DOCE)**

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

Aprovado em: / /

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Mariano Oscar Anibal Rojas (IFMA-CODÓ)
(Examinador Externo)
Doutor em Química Analítica

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CCET DA UNIVERSIDADE FEFERAL DO MARANHÃO**

Assunção, Gilson Vitorino de.

Caracterização química e avaliação da atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* do óleo essencial da espécie *Citrus sinensis* L. Osbeck (laranja doce)/ Gilson Vitorino de Assunção – São Luís, 2013.

97f.

Orientador: Victor Elias Mouchrek Filho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós- Graduação em Química, 2013.

1. Óleo essencial – Laranja. 2. Atividade larvicida – *Aedes aegypti*. I.
Título.

CDU 543: 634.31

DEDICO ESTE TRABALHO

Primeiramente, à **Deus** autor e consumidor da vida, toda Honra e toda Glória seja dada a Ele para sempre.

Meus pais, **José Vitorino de Assunção** e **Gilda Assunção** (*in memorian*) e minha irmã **Joana Assunção** (*in memorian*) por todo amor, carinho e dedicação quando em vida.

Minha irmã **Elza** e aos meus irmãos **Ademir e Getúlio**, pelo apoio e incentivo no decorrer da vida.

***“Porque Deus amou de tal maneira o mundo
que deu seu Filho Unigênito, para todo aquele que Nele crer,
não pereça mais tenha a Vida Eterna”.***

Evangelho de João 3:16

“Um mestre funciona como um agente catalisador, cuja simples presença estimula. [...] Ele não pode entregar a você aquilo que conhece, mas pode criar um certo campo de energia no qual suas pétalas podem se abrir, no qual as suas sementes serão encorajadas, em que você pode criar coragem suficiente para dar o salto e colher o fruto no qual o milagre torna-se possível.”

Anônimo

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela proteção, força e paz interior, que me encorajaram nos momentos em que tudo parecia impossível e infindáveis. Sempre atendeu as minhas orações e permitiu que concluísse mais uma etapa da minha vida.

Aos meus **pais** e **irmã** (*in memorian*), pelo amor, cuidado, atenção e dedicação com que me trataram ao longo de minha vida.

Aos meus **irmãos** que estão sempre ao meu lado e em especial ao meu sobrinho **Victor** pelo ajuda e consideração; **Natália** e **Getúlio Jr.**

À **CAPES**, pelo apoio financeiro.

Ao **Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho**, meu orientador, pelo exemplo de amigo, pesquisador, incentivador, pela paciência, pelo grande caráter, repleto de humildade, profissionalismo, que de agrado imediato aceitou-me a ser seu orientando, com as quais pude contar para concretizar esta grande conquista.

Prof. Dr. Mouchrek, pelo exemplo de profissional com extrema competência e experiência dedicado ao longo da sua vida como docente na UFMA, pelos momentos de descontração vivenciados.

Prof. Dra. Adenilde, exemplo de profissional, atenção e presteza.

Prof. Esp. Paula, exemplo de profissional, pelas palavras edificantes.

Prof. Dr. Odair Monteiro, pela ajuda direta neste trabalho quando solicitado.

Prof. Dr. Nestor, pelo exemplo de profissional e pessoa.

Ao **Grupo de Óleos Essenciais e Alimentos** da UFMA.

Aos colegas de Mestrado, **Marlucy** pela ajuda conjunta de pesquisa; Em especial a **Idenilce Monteiro** (“Mel”) e **Mariane Liston** pelo apoio, amizade e trocas de informações; À **Charles e Júlio, Rivelino, Andreson, Inocêncio, Herberth, Tobias, Albuquerque, Amanda, Luís**.

Ao **Prof. Silvio Coêlho** (IFMA-Maracanã), pelo exemplo de profissional, pessoa e ajuda indispensável quanto à coleta da espécie vegetal; Ao **Prof. Eliomar**.

Aos colegas do Pavilhão Tecnológico, **Renan, Diogo, Rayone, Felipe, Dionei, Leidiane, Vânia, Jéssica, “dona Dica” “Zequinha”, Jaqueline** pelo apoio e receptividade no PCQA.

Agradeço à banca de **Qualificação** e **Defesa** em especial ao **Prof. Dr. Gilmar Silvério**, pela pessoa afável, exemplo de profissional, pela colaboração no presente trabalho, tanto na qualificação quanto na defesa e palavras de incentivo; Ao **Prof. Dr. Mariano Rojas**, pelo exemplo de profissional e pessoa, pela colaboração quanto às observações ao presente trabalho.

À **Profa. Sâmia**, pelo exemplo de profissionalismo e pessoa.

Ao **Sr. Pedro Tavares**, coordenador da Secretaria de Vigilância Sanitária e Epidemiológica da Prefeitura de São Luís ao combate da Dengue, supervisores e agentes de saúde, pela ajuda direta nesse trabalho quanto às coletas de partes das larvas e informações passadas.

Aos amigos do CEFET, **Antônio, Victor, João, Joelkson, Márcia, Frank, Rivelino**, pelos bons momentos passados juntos, que perduram até hoje.

À amiga **Gracimar Ribeiro**, exemplo de pessoa prestativa e pelas palavras confortantes nas horas em que mais precisei de atenção e ajuda.

Aos Professores e Funcionários da Pós-Graduação em Química da UFMA, na gestão do **Prof. Dr. Hildo** e suas secretárias **Kleyce, Lucinete e Soliana**.

À todos que torceram, oraram e contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade: **Meu Muito Obrigado!**

RESUMO

Estudos são desenvolvidos no sentido de encontrar substâncias de origem vegetal, como controle químico alternativo ao combate do vetor da dengue, uma vez em que até o presente momento não há vacina validada para a mesma. No referido trabalho, a partir da extração e do estudo analítico do óleo essencial das cascas frescas de *Citrus sinensis* L.Osbeck, foi possível analisar o efeito larvicida do óleo contra as larvas em terceiro estágio do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). Extraíu-se quantitativamente o óleo pelo processo de hidrodestilação, usando aparelho do tipo Clevenger. 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), identificando desta forma o seu composto majoritário. Calculou-se a CL₅₀ do óleo, a partir dos métodos de Reed-Muench (1938) e Pizzi (1950), respectivamente. O rendimento do óleo foi de 2,47% m/m. Através das técnicas espectroscópicas utilizadas, foi possível identificar 15 compostos, justificando a presença do d-Limoneno como constituinte majoritário. O óleo essencial exibiu CL₅₀ de 99,014 ($\pm 2,098$) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o padrão d-Limoneno 126,037 ($\pm 2,092$) $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Os resultados apresentados indicam que o óleo essencial *Citrus sinensis* L. Osbeck, é constituído por substâncias que possuem efeito larvicida frente ao *Aedes aegypti*.

Palavras-Chave: Óleo essencial. *Citrus sinensis* L.Osbeck. d-Limoneno. Atividade larvicida. *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Studies are conducted to find substances of vegetable origin, such as alternative chemical control to combat the dengue vector, once there is no validated vaccine for that. In this paper, from the extraction and analytical study of the essential oil of the fresh peel of *Citrus sinensis* L.Osbeck was possible to analyze the larvicidal effect of the oil against third stage larvae of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). The oil was extracted quantitatively by steam distillation process using Clevenger type apparatus. The physico-chemical properties of essential oil were determined (density, refractive index, solubility, color and appearance). The oil was characterized analytically by infrared (FTIR) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), thus identifying its major compound. LC₅₀ from the oil was calculated from the Reed-Muench method (1938) and Pizzi (1950), respectively. The yield of oil was 2.47% m/m. Through spectroscopic techniques used, it was possible to identify 15 compounds, justifying presence of d-limonene as a major constituent. The essential oil exhibited LC₅₀ of 99.014 ($\pm$ 2.098) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and the standard d-Limonene 126.037 ($\pm$ 2.092) $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The results indicate that the essential oil *Citrus sinensis* L. Osbeck comprises substances with larvicidal effect against mosquito *Aedes aegypti*.

Keywords: Essential oil. *Citrus sinensis* L.Osbeck. d-limonene. Larvicidal activity. *Aedes aegypti*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Frutos e pericarpo da espécie <i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck. estudada.....	33
Figura 2	- Árvore de <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck estudada laranja doce var:pêra).....	34
Figura 3	- Estruturas enantioméricas do Limoneno.....	36
Figura 4	- Estruturas químicas dos constituintes identificados no óleo essencial das cascas de <i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck estudado.....	36
Figura 5	- Mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus,1762).....	37
Figura 6	- Ocorrência e distribuição do <i>Aedes aegypti</i> no mundo.....	39
Figura 7	- Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	40
Figura 8	- Ovos <i>Aedes aegypti</i>	41
Figura 9	- Larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	41
Figura 10	- <i>Aedes aegypti</i> em fase de pupa.....	42
Figura 11	- <i>Aedes aegypti</i> adulto.....	42
Figura 12	- Localização da área de coleta de <i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck.....	51
Figura 13	- Extrator de Clevenger.....	53
Figura 14	- Óleo essencial extraído das cascas da laranja doce.....	53
Figura 15	- Aparelho Cromatógrafo à gás acoplado a Espectrômetro de massas.....	56
Figura 16	- Espectrofotômetro com Transformada de Fourier.....	57
Figura 17	- Armadilha utilizada para a coleta dos ovos do <i>Aedes aegypti</i>	58
Figura 18	- Larvicidas comerciais usados: Temefós e Novaluron.....	59
Figura 19	- Larvas do <i>Aedes aegypti</i> em terceiro estágio.....	60
Figura 20	- Exsicata da espécie <i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck.....	63
Figura 21	- Curva cinética referente ao rendimento de extração do óleo em função do tempo, com massa de 300g e temperatura de 100°C	64
Figura 22	- Cascas da laranja doce, padrão d-Limoneno e óleo essencial extraído.....	

Figura 23	- Espectros na região do infravermelho do padrão d-Limoneno e óleo essencial <i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck.....	68
Figura 24	- Cromatograma da amostra do óleo do pericarpo de <i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck, apresentando os picos selecionados e identificados através da comparação dos respectivos espectros de massas com a espectroteca WILEY 229.....	69
Figura 25	- (I) Espectro de massa do d-Limoneno. (II) Espectro de massa da espectroteca WILEY 229.....	71
Figura 26	- Ocorrência da reação de retro-Diels-Alder na fragmentação do Limoneno.....	72
Figura 27	- (I) Espectro de massa do Linalol. (II) Espectro de massa da espectroteca WILEY229.....	72
Figura 28	- (I) Espectro de massa do β -Mirceno. (II) Espectro de massa da espectroteca WILEY229.....	73
Figura 29	- Clivagem alílica.....	74
Figura 30	- Taxa de mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> expostas a seis concentrações diferentes do óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck, após 24 horas versus o logaritmo de cada dose aplicada.....	77
Figura 31	- Acumulados mortos óleo essencial <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas em função do logaritmo decimal da dose aplicada.....	78
Figura 32	- Acumulados vivos óleo essencial <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas em função do logaritmo decimal da dose aplicada.....	78
Figura 33	- Estimativa da CL ₅₀ do óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck, 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.....	79
Figura 34	- Taxa de mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> expostas a sete concentrações diferentes do padrão d-Limoneno, após 24 horas versus o logaritmo de cada dose	

	aplicada.....	80
Figura 35	- Acumulados mortos do padrão d-Limoneno pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada.....	81
Figura 36	- Acumulados vivos do padrão d-Limoneno pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicad.....	81
Figura 37	- Estimativa da CL_{50} do padrão 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.....	82
Figura 38	- Comparação entre as taxas de mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> proporcionadas pelo Óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck versus padrão d-Limoneno.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Propriedades físico-químicas obtidos do Óleo essencial <i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck.....	66
Tabela 2	- Principais bandas de absorção e modos vibracionais do padrão d-Limoneno e do óleo essencial das cascas de <i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck na região do infravermelho.....	68
Tabela 3	- Compostos identificados na amostra do óleo essencial extraídos das cascas de <i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck.....	70
Tabela 4	- Constituintes químicos majoritários reportados na literatura, para óleos essenciais extraídos das cascas da laranja doce coletadas em várias partes do mundo.....	74
Tabela 5	- Mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição em várias concentrações do óleo essencial extraído das cascas da laranja doce var: pêra.....	76
Tabela 6	- Mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição em várias concentrações do padrão d-Limoneno.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
b.l.u	- Base Livre de Umidade
CG	- Cromatografia Gasosa
CL ₅₀	- Concentração Letal à 50%
CNPMPF	- Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura
EM	- Espectrometria de Massas
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Agropecuária
Ev	- Elétron Volt
FUNASA	- Fundação Nacional de Saúde
IE	- Impactos de Elétrons
IC	- Intervalo de Confiança
IFMA	- Instituto Federal do Maranhão
ISO	- International Standard Organization
IV	- Infravermelho
IAL	- Instituto Adolf Lutz
LIRAA	- Levantamento Infestação Rápida por <i>Aedes Aegypti</i>
M ⁺	- Íon Molecular
m/z	- Relação massa-carga
m/m	- Relação massa-massa
mL	- Mililitros
ND ²⁵	- Índice de Refração a 25°C

OECSLO	- Óleo Essencial <i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck
OMS	- Organização Mundial de Saúde
OPAS	- Organização Panamericana de Saúde
SE	- Erro Padrão
UFMA	- Universidade Federal do Maranhão
USP	- Universidade Federal de São Paulo
v/v	- Relação volume/volume
µg	- Micrograma

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1	INTRODUÇÃO.....	21
---	-----------------	----

CAPÍTULO 2

2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	26
2.1	Considerações sobre Óleos essenciais.....	26
2.1.2	Processos de Extração.....	28
2.1.2.1	Extração por Enfloração.....	28
2.1.2.2	Extração por Prensagem.....	29
2.1.2.3	Extração com Solventes Orgânicos.....	29
2.1.2.4	Extração por Fluido Supercrítico.....	29
2.1.2.5	Extração com Arraste por vapor d'água.....	30
2.1.3	Fatores que afetam a extração.....	30
2.2	Aspectos gerais sobre <i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck (Laranja doce).....	32
2.3	Aspectos sobre o Limoneno.....	35
2.4	Aspectos gerais sobre o <i>Aedes Aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	36
2.4.1	O Ciclo de Vida do <i>Aedes aegypti</i>	40
2.4.1.1	O ovo.....	41
2.4.1.2	A larva.....	41
2.4.1.3	A pupa.....	42
2.4.1.4	O adulto.....	42
2.5	Técnicas Analíticas.....	43
2.5.1	Cromatografia gasosa (CG).....	43
2.5.2	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV).....	43
2.5.3	Cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG – EM).....	44

CAPÍTULO 3

3	OBJETIVOS.....	47
3.1	Geral.....	47

3.2	Específicos.....	17
-----	------------------	----

CAPÍTULO 4

4	PARTE EXPERIMENTAL.....	49
4.1	Equipamentos analíticos e acessórios.....	49
4.2	Materiais e reagentes.....	50
4.3	Metodologia experimental.....	51
4.3.1	Método de obtenção do óleo essencial dos pericarpos de <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck (laranja doce).....	51
4.3.1.1	Origem, coleta e identificação do material vegetal.....	51
4.3.1.2	Preparo das exsicatas.....	52
4.3.1.3	Extração do óleo essencial.....	52
4.3.1.4	Rendimento da extração do óleo essencial da <i>citrus sinensis</i> L. Osbeck.....	54
4.4	Caracterização Físico-química do óleo essencial.....	54
4.4.1	Umidade (%).....	55
4.4.2	Densidade.....	55
4.4.3	Solubilidade em etanol (90%).....	55
4.4.4	Índice de Refração.....	55
4.4.5	Cor e Aparência.....	55
4.5	Análises Químicas.....	56
4.5.1	Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).....	56
4.5.2	Análise Espectrométrica Vibracional na Região do Infravermelho.....	57
4.6	Teste de Toxicidade.....	57
4.6.1	Obtenção e cultivo das larvas do <i>Aedes aegypti</i>	57
4.6.2	Teste Larvicida.....	59
4.6.3	Análise Estatística.....	60

CAPÍTULO 5

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.1	Identificação botânica de <i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck (laranja doce)	

	pela sua exsicata.....	63
5.2	Avaliação cinética de extração do óleo essencial <i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck.....	63
5.3	Avaliação das características físico-químicas do óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck.....	65
5.4	Análise Espectroscópica Vibracional na Região do Infravermelho.....	67
5.5	Avaliação das características químicas dos óleos essenciais obtidas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas (CG-EM).....	69
5.6	Atividade Larvicida.....	76
	CAPÍTULO 6	
6	CONCLUSÃO.....	86
	REFERÊNCIAS.....	87

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a dengue é considerada como 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 (Ministério da Saúde, 2002; 2012). De acordo com a (OMS, 2012), cerca de 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco e estima-se 200 milhões de infecções por ano para transmissão da dengue, o vírus é endêmico em mais de 100 países (MURRELL *et al.*, 2011). De acordo com pesquisa recente, realizados por pesquisadores da Universidade de Oxford e da Fundação Wellcome (RFI, 2013), este número subiu consideravelmente para 390 milhões de pessoas infectadas por essa doença, ou seja, quase ao triplo na qual a OMS estima.

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 consolidados até a sétima semana epidemiológica pelo Programa Regional da Dengue (OMS/ OPAS, 2013), registraram 279.540 casos da doença, 1.752 caso graves e 84 óbitos na Região das Américas. Os países que registraram os maiores números de casos graves foram: México (543), Venezuela (377) e Brasil (324), o que equivale a 71% dos casos graves. Quanto aos óbitos destaca-se a situação do Brasil (33), Paraguai (27) e República Dominicana (15). A incidência desta doença ocorre em todos estados brasileiros. O Ministério da Saúde, através do Levantamento de Infestação Rápido por *Aedes aegypti* (LIRAA), o qual apresenta dados sobre as situações gerais a respeito da doença por todas regiões do país. Dados reportados por este órgão brasileiro no ano de 2013, foram notificados 635.161 mil casos de dengue, 1.243 casos graves e 108 óbitos até o primeiro trimestre de este ano.

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 (Dicloro Difenil

Tricloroetano), nas residências. No entanto, a ação logo foi interrompida, em 1976, sendo uma das principais causas foi o aparecimento de resistência ao mesmo 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 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 motivos para não utilização dos inseticidas 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*, ampliaram sua faixa de resistência na Ásia e na América Latina, levando a um aumento do risco de dengue nestas áreas (RANSON, 2000).

No Brasil, recentemente o controle tem sido feito por meio de aplicações de inseticidas organofosforados e piretróides (BRASIL, 2009), no entanto, 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).

O organofosforado themephos, tem sido usado ao longo de décadas, por mais de trinta anos para o controle do *Aedes aegypti* (BARRETO, 2005), embora esteja sendo substituído gradativamente em razão dos mosquitos adquirirem resistências ao mesmo.

O Ministério da Saúde em 2011, adotou algumas mudanças para utilização do Novaluron (composto emulsionável) e com esse objetivo elaborou a Nota Técnica nº 57/2011, que estabelece os procedimentos técnicos para o uso do produto 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 concentrações para reduzir os riscos de intoxicação e contaminação

(Ministério da Saúde, 2011). 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 partir de 1978 a Organização Mundial de Saúde (OMS,2012), este órgão passou a aconselhar a comunidade científica a intensificar e divulgar os estudos com plantas (SOARES, 2011).

A pesquisa sistemática para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica pode ser executada por meio de vários processos. Os mais utilizados são a síntese de novas moléculas, a modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas, com propriedades farmacológicas definidas e extração, isolamento e purificação de novos compostos, de fontes naturais, especialmente de origem vegetal, a qual se caracteriza como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamentos. Por outro lado, as plantas medicinais devem ser consideradas não apenas como matéria-prima, ponto de partida para a descoberta de novas moléculas, mas também como um recurso natural potencialmente ativo na forma de fitoterápico padronizado e eficaz (DISTASI,1996). Estudos com plantas medicinais tem sido responsáveis por inúmeras e importantes descobertas; o desenvolvimento desta área de pesquisa deve-se a vários fatores, dos quais se destaca a participação de um número cada vez maior de profissionais, no entanto, resultados promissores dependem de um maior comprometimento entre os diversos campos multidisciplinares, que compõem o estudo das plantas medicinais, pois a continuidade de tais estudos de forma isolada perpetuará a falta de recursos, impedindo consequentemente o desenvolvimento de novos medicamentos.

Atualmente há uma tendência mundial em resgatar hábitos de vida mais saudáveis, o que aumenta a utilização de plantas nas mais variadas formas e usos (PEREIRA, 2008). Isso impulsiona uma maior amplitude de estudos que busquem a caracterização, identificação e isolamento de novos compostos de plantas com propriedades medicinais e atividades farmacológicas.

Dessa forma, Díaz e Jorge (2001) explanam que numerosas investigações têm sido realizadas em busca de novos compostos com atividades biológicas a partir de fontes naturais, destacando-se os óleos essenciais de plantas

medicinais e aromáticas, conhecidos pelas suas propriedades larvicidas, antimicrobianas, antifúngicas, dentre outras.

Tal fato, conforme Srinivasan *et al.* (2001), levou a OMS a compilar um inventário com mais de 20.000 espécies de plantas medicinais. Produtos de origem vegetal são amplamente reconhecidos por sua diversidade química, como por sua considerável aplicação em diversas áreas, incluindo a indústria farmacêutica (PENIDO *et al.* 2007), as plantas oferecem uma fonte alternativa de controle porque contêm uma série de bioativos químicos.

Dessa maneira tem crescido a busca por extratos vegetais e substâncias naturais que sejam efetivas no combate ao mosquito adulto e/ou à larva de *Aedes aegypti* e que sejam isentas de toxicidade para o ambiente. A resistência resulta no aumento da frequência de aplicação de inseticida, dosagens crescentes, rendimentos diminuídos, danos ambientais e surgimento de doenças, quando os vetores não podem ser controlados (SIMAS *et al.*, 2004).

Porém, o uso freqüente e em doses cada vez maiores desses produtos, tem desenvolvido resistência pelo mosquito aos pesticidas comumente utilizados, dificultando o trabalho. Verificou-se a existência de populações resistentes a inseticidas organofosforados (LIMA, *et al.*, 2003; BRAGA, *et al.*, 2004), requerendo, dessa forma, a necessidade de novas pesquisas em busca de compostos com essa atividade.

Nesse sentido, os óleos essenciais, produzidos no metabolismo secundário das plantas, também têm se apresentado como fontes de materiais com atividade inseticida, larvicida e repelente (COSTA *et al.*, 2005; MURUGAN *et al.*, 2007).

No presente estudo, foi possível extrair o óleo essencial da espécie vegetal *Citrus sinensis* L.Osbeck (laranja doce: variedade: pêra) e desenvolver por meio de metodologias simples e de baixo custo, estudar as suas características físicas de sua composição química e principalmente de testá-lo como larvicida junto às larvas do mosquito *Aedes aegypti* em terceiro estágio.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Considerações sobre óleos essenciais

A *International Standard Organization* (ISO), óleos essenciais são definidos como os “produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d’água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (Rutaceae)”.

ANVISA (2007), óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste a vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado). Podem apresentar isoladamente ou misturados entre si, desterpenados ou concentrados.

De acordo com Mouchrek Filho (2000), o termo “óleo essencial” é empregado para designar líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte quase sempre agradável e são extraídos de plantas por algum processo específico, sendo o mais frequente a destilação por arraste de vapor d’água. São ainda misturas complexas de substâncias orgânicas voláteis, formadas por componentes de consistência semelhante ao óleo, constituídos basicamente de terpenos, terpenos oxigenados, sesquiterpenos oxigenados, ácidos graxos, materiais corantes, etc (TELES, 2003).

Esses produtos obtidos dos metabólitos secundários apresentam-se em misturas de compostos em diferentes concentrações, constituídos principalmente por derivados de fenilpropanóides e ou/ terpenóides, com predominância deste último. O termo terpenóides é empregado para designar todas as substâncias cuja biossíntese deriva de unidades de isoprenos, composto com cinco átomos de carbono. Os terpenóides mais frequentes em óleos essenciais são pertencentes das classes dos monoterpenos e sesquiterpenos compostos que apresentam em suas estruturas uma e duas unidades de isopreno, respectivamente (GOUNARIS, 2010; SARKER *et al.*, 2006; SIMÕES *et al.*, 2007)

Com o descobrimento e a elucidação das centenas de componentes dos óleos essenciais nas últimas décadas, tem sido possível entender a complexidade e a diversidade que existe neste grupo de produtos naturais, o qual consiste normalmente de monoterpenos (C₁₀) e sesquiterpenos (C₁₅), fenilpropenos e outros componentes voláteis (FRANZ, 2010).

A estrutura química geral dos terpenos é $C_{10}H_{16}$, como por exemplo, o Limoneno o qual está presente na maioria das vezes em compostos cítricos, ocorrem também como diterpenos, triterpenos e tetraterpenos (C_{20} , C_{30} e C_{40}), bem como hemiterpenos (C_5); e sesquiterpenos (C_{15}); quando os compostos contêm elementos adicionais, geralmente o oxigênio, são denominados terpenóides. Terpenóides são sintetizados a partir de unidades de acetato, e como tal eles compartilham suas origens com ácidos graxos. Eles diferem dos ácidos graxos que contêm extensas ramificações e ciclização. Exemplos de terpenóides comuns são o metanol e cânfora (monoterpenos) e farnesol e artemisin (sesquiterpenos), (COWAN, 1999).

Para uma mesma espécie de planta, o número de compostos, suas quantidades relativas e o rendimento de óleos essenciais variam consideravelmente, isto pode ser atribuído ao método de extração do óleo essencial, além das diferenças climáticas, localização e fatores agronômicos como fertilização, irrigação, colheita e especialmente a fase de desenvolvimento da planta na data da colheita (BAKKALI *et al.*, 2008).

Este grande número de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, apresentam inúmeras atividades biológicas, avaliadas em vários estudos, como larvicida, antiinflamatória, pesticida, inseticida, moluscicida, carrapaticida, antioxidante, anti-séptica, herbicida, antioxidante, entre outras atividades (CHENG, 2003).

Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com 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 em forma de traços (SIMÕES *et al.*, 2007).

De uma forma geral, os óleos essenciais apresentam diferentes propriedades biológicas, como a ação larvicida (FURTADO *et al.*, 2005), atividade antioxidante (WANNES *et al.*, 2010), fungicida (CARMO *et al.*, 2008), atividade antitumoral (SILVA, 2008) e ação antimicrobiana (BAKKALI *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2009).

O crescente desenvolvimento comercial e industrial na área dos óleos essenciais acompanha alterações globais e flutuações da origem dos mesmos,

ocorrendo atualmente com a maior produção em países fora da Europa, tais como o Brasil (29%), a Índia (26%), os Estados Unidos (17%) e a China (9%), (SCHMID, 2010).

No entanto, o consumo e a preocupação com o controle de qualidade e com os aspectos relacionados com a saúde humana, são particularmente significativos. Com o incremento do volume de trocas comerciais nos mercados de óleos essenciais, as normas têm tido importância igualmente crescente, em especial na identificação e padronização dos níveis de qualidade dos óleos essenciais mais utilizados (REVISTA DE FITOTERAPIA, 2011)

Dentre os produtos naturais empregados em abordagens terapêuticas, os óleos essenciais, utilizados frequentemente na aromaterapia, são descritos como produtos com grande potencial terapêutico e farmacológico (EDRIS, 2007).

As propriedades farmacológicas atribuídas aos mesmos são diversas e algumas são preconizadas por apresentarem vantagens importantes quando comparadas a outros medicamentos, como por exemplo, a sua volatilidade, que os torna ideal para uso em nebulizações, banhos de imersão ou simplesmente em inalações. A volatilidade e o baixo peso molecular de seus componentes possibilitam que eles sejam rapidamente eliminados do organismo através das vias metabólicas (BANDONI; CZEPAK, 2008).

2.1.2 Processos de extração

Existem vários métodos de extração dos óleos essenciais, variando de acordo com a região que a planta se encontra e com a proposta de utilização do mesmo. Os mais comuns são: Enfloração, Prensagem, Extração com Solventes Orgânicos, Extração por Fluido Supercrítico e Arraste por Vapor d'água. No presente trabalho o método adotado para extração foi a hidrodestilação.

2.1.2.1 Enfloração

Este método já foi bastante utilizado, mas atualmente é empregado apenas por algumas indústrias de perfumes, no caso de algumas plantas com baixo teor de óleo de alto valor comercial. É empregada para extrair óleo essencial de pétalas de flores onde as pétalas são depositadas, a temperatura ambiente, sobre

uma camada de gordura, durante certo tempo. Em seguida, estas pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Para se obter o óleo essencial, o álcool é destilado a baixa temperatura e o produto assim obtido possui alto valor comercial (WILLIANS, 1996).

2.1.2.2 Prensagem

Na prensagem os pericarpos de frutos cítricos são prensados e a camada que contém o óleo essencial é, então, separada. Posteriormente, o óleo essencial é separado da emulsão formada com a água por decantação, centrifugação ou destilação fracionada (SIMÕES *et al.*, 1999), quanto ao processo industrial, o óleo essencial é extraído por expressão, tendo o mesmo como subproduto (frutas cítricas).

2.1.2.3 Solventes Orgânicos

Geralmente são usados diclorometano, éter ou éter de petróleo, no entanto esses solventes extraem compostos lipofílicos não voláteis, obtendo-se assim um óleo impuro, sem valor comercial (SIMÕES; SPITZER, 2004).

2.1.2.4 Fluido Supercrítico

Pela extração por fluido supercrítico consegue-se recuperar os aromas naturais de vários tipos não somente óleo essencial, de modo bastante eficiente e, atualmente, é um dos métodos de escolha para extração industrial de óleos essenciais. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO₂ é primeiramente liquefeito por compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31 °C. Nessa temperatura, o CO₂ atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga a de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO₂ retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação (SIMÕES; SPITZER, 1999).

2.1.2.5 Arraste por vapor d'água

Empregando-se o aparelho de Clevenger, o óleo é arrastado pelo vapor d'água por ter tensão de vapor mais elevada, formando uma camada de óleo de densidade menor sobre o hidrolato que circula pelo sistema, sendo então separado deste. É o método preconizado pela Farmacopéia Brasileira para extração de óleos voláteis (SIMÕES e SPITZER, 2004). No entanto, as altas temperaturas e a própria água podem causar degradação ou modificações químicas dos constituintes dos óleos voláteis (PELLATI *et al.*, 2005).

Na indústria de óleos essenciais existem três tipos de extrações, distinguidas pela forma como se estabelece o contato entre a amostra e a água, na fase líquida ou de vapor; a primeira é chamada de hidrodestilação, onde a amostra fica imersa na água contida numa caldeira; a segunda de destilação pela água e vapor, onde uma rede colocada na parte inferior de uma caldeira mais alta separa a água da amostra e a terceira de destilação pelo vapor de água, onde a amostra é colocada em uma caldeira e o vapor de água ali injetado provém de um gerador próprio, independente (WILLIAMS, 1996).

2.1.3 Fatores que afetam a extração

Entre os fatores que afetam a produção natural dos óleos voláteis e a sua composição nas plantas pode-se destacar:

- a) **Localização geográfica:** As diferentes características geográficas e edafoclimáticas interferem diretamente sobre o modo como as plantas adaptam-se e desenvolvem-se, influenciando assim na produção dos metabólitos secundários produzidos de acordo com a sua necessidade (HARTMANN, 2007).
- b) **Sazonalidade:** A variação climática própria das estações do ano pode influenciar na composição química dos óleos voláteis, como em cujo teor de monoterpenos oxigenados é maior no inverno e de sesquiterpenos hidrocarbonetos é maior no verão (HUSSAIN *et al.*, 2008).

- c) Fase fenológica: A composição química dos óleos voláteis pode variar de acordo com a idade da planta e a fase fenológica em que se encontram, como observado que produz níveis mais altos de sesquiterpenos hidrocarbonetos, considerados mais voláteis, nos meses correspondentes às fases de floração e frutificação, possivelmente para favorecer sua polinização e dispersão (LAGO *et al.*, 2007).
- d) Biotipo: A composição química dos óleos voláteis de plantas aromáticas da mesma espécie que apresentam biotipos com e sem tricomas glandulares pode variar significativamente, em que os monoterpenos ocorrem predominantemente no biotipo glandular (TELLEZ *et al.*, 1999).
- e) Quimiotipo: A evolução das plantas em resposta às condições ambientais sob as quais viveram ao longo do tempo resultou em grande variabilidade genética, que promove diferenças químicas intraespecíficas nos óleos voláteis de plantas da mesma espécie, morfologicamente idênticas e até mesmo cultivadas nas mesmas condições ambientais (LAHLOU, 2004).
- f) Condições de cultivo: A disponibilidade limitada de água pode restringir a biossíntese de terpenóides, como por exemplo, a seca severa reduz a emissão de compostos orgânicos voláteis (OWEN; PEÑUELAS, 2005).
- g) Interação com o meio ambiente: A taxa de emissão de monoterpenos pode aumentar sob injúria e herbivoria (OWEN & PEÑUELAS, 2005).
- h) Defesa contra microrganismos fitopatogênicos: Plantas aromáticas podem responder à invasão de fitopatógenos produzindo fitoalexinas de caráter lipofílico, que podem atuar em nível molecular tendo como

alvo principal a membrana celular desses microrganismos (INOUE *et al.*, 2004).

- i) Atração de polinizadores e dispersores de sementes: Por serem sésseis, as plantas produzem compostos voláteis que atraem agentes polinizadores e dispersores, fato evidenciado por estudos que comprovam que terpenos são reconhecidos pelo aparelho olfativo dos insetos (GERSHENZON; DUDAREVA, 2007).

2.2 Aspectos gerais sobre *Citrus sinensis* L.Osbeck (Laranja doce)

No Brasil, as plantas cítricas foram introduzidas 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), entretanto, estas plantas se expandiram por todo o país, destacando a citricultura brasileira como o país líder-mundial, correspondendo por um terço da produção mundial da fruta e quase 50% do suco fabricado, em que aproximadamente 70% é processado e 30% destina-se para o consumo interno (BIZZO *et al.*, 2009). A região sudeste participa com 84,11% da produção da fruta, seguida pelo nordeste com 8,81%. A participação maior do Sudeste deve-se principalmente ao estado de São Paulo, como maior produtor do país com participação de 80,36%.

Citrus é um gênero de plantas da família Rutaceae, consiste em cerca de 150 gêneros e 2000 espécies (ANWAR *et al.*, 2008), ordem Sapindales originárias do sudeste tropical e subtropical da Ásia (CLAUDIO JÚNIOR, 2009). São espécies cultivadas em mais de 100 países ao redor do mundo em áreas tropicais e subtropicais, onde as temperaturas são sempre quentes (SINGH; RAJAM, 2009). O grupo contém espécies e numerosos híbridos naturais e cultivados, incluindo as frutas habitualmente designadas por citrinos, em que podemos destacar a laranja doce, objeto do referido estudo (Figura1).

Figura 1: Frutos e pericarpo da espécie *Citrus sinensis* L.Osbeck estudada.



Fonte: Autor (2012)

Na Figura 2, é apresentada a árvore da espécie *Citrus sinensis* L. Osbeck estudada no presente trabalho, trata-se de uma planta aromática herbácea, popularmente conhecida como “laranja doce”, com características específicas, medindo aproximadamente 2,20 metros de altura. O termo fruta é aplicado à estrutura que cerca, protege ou guarda as sementes até estarem maduras, no estágio da reprodução das espécies botânicas em todo o reino vegetal (TAYLOR, 2005). Dessa forma, a laranja doce é um dos mais favorecidos frutos do mundo, suas folhas são persistentes, com coloração verde-clara quando novas e passam para o verde mais escuro à medida que envelhecem. Sua forma é elíptica-oval (7-15 cm), fruto é uma baga (fruto carnudo simples, no qual a parede do ovário inteiro amadurece em um pericarpo comestível), dividido também em pericarpo (casca) com muitas sementes, cor verde a amarelo, podendo atingir cerca de 7,5 m ou com idade avançada, até 15 m, cujo endocarpo é dividido também em câmaras, podendo ser globulosos ou subglobulosos (DE ARAÚJO *et al.*, 2003). São ricas em óleos voláteis, flavanóides, cumarinas e pectinas (BRUNETON, 1993, YU *et al.*, 2005), vitamina C (ácido ascórbico) e terpenóides (OTHA; HIROSE, 1966), com propriedades potenciais de promoção à saúde (YU *et al.*, 2005).

Presume-se que a sua originada no sul da China, região nordeste da Índia, ou talvez do sudeste da Ásia, antiga Indochina (MATTOS *et al.*, 2005). Suas plantações predominam em todos os estados brasileiros, sendo que o estado de São Paulo contabiliza 82% dos 18,8 milhões de toneladas de laranja produzidas no Brasil (AMARO, 1999), representando perto da metade da população de plantas desta espécie, estimada em 220 milhões de árvores (SALIBE, 2002).

Figura 2. Árvore de *Citrus sinensis* L. Osbeck estudada (laranja doce pêra)



Fonte: Autor (2012)

Em seu trabalho (SÁ, 2011), fala sobre a investigação de ações do óleo essencial de *Citrus sinensis* L. Osbeck, sobre o sistema nervoso central e ações anticolinesterásica, que poderá possibilitar seu uso como um agente antioxidante sendo uma alternativa para a elaboração de uma futura formulação farmacêutica para auxiliar no tratamento do “Mal de Alzheimer”.

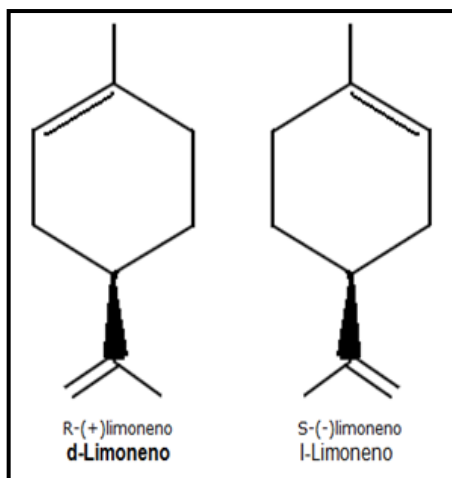
Diversos estudos são realizados em termos de aplicação, o OECSLO, o qual é usado na prevenção e auxílio ao tratamento de alguns tipos de câncer, especialmente nas fases iniciais do desenvolvimento da doença, observando-se melhores resultados foram os de próstata, estômago, fígado, intestinos, pâncreas, mama, pulmão e nas leucemias. Estudos realizados no Hospital Universitário de Saint Radbound (Holanda), age aumentando a atividade de uma enzima desintoxicante, o que acaba por contribuir na eficiência do corpo de eliminar substâncias causadoras de câncer. Na Universidade de Wisconsin-Madison (EUA), o mesmo quando ingerido pode causar completa regressão da maioria dos cânceres de mama, resultando na referendicação dos tumores malignos e benignos, os quias foram realizados em ratos. Em um outro estudo realizado pela Universidade de Palia (China),apresentou resultados excelentes no tratamento de câncer gástrico.Na Universidade de Siena (Itália), departamento de fisiologia, cientistas estiveram estudando o efeito da inalação do óleo essencial de laranja sobre o sistema nervoso

em ratos, os quais puderam avaliar que óleo age baixando o teor de corticosterona nos animais por uma ação direta na hipófise na produção de um hormônio estimulante das supra-renais, tais hormônios estão associados ao estado de estresse e sensação de dor e uma menor produção, significa uma maior capacidade de suportar a dor e uma diminuição dos estados de ansiedade.

2.3 Aspectos sobre o Limoneno

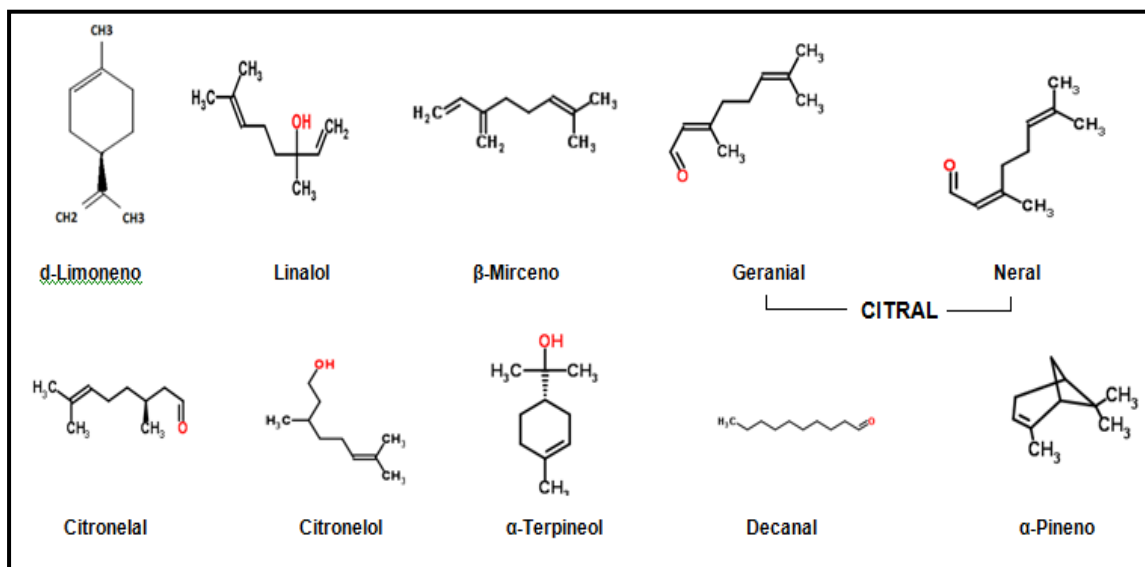
O Limoneno está registrado no CAS (Chemical Abstract Service) sob número 138-86-7, como nome (IUPAC:1-metil-4-isopropenilciclohex-1-eno). É um hidrocarboneto terpênico de fórmula molecular ($C_{10}H_{16}$), massa molecular 136 g/L, cuja molécula por apresentar um centro quiral muitas espécies de plantas podem biosintetizá-lo nas formas de seus enantiômeros (Figura 3) e na forma racêmica, ou seja, é opticamente ativo, extraído na forma de óleo da casca de frutas cítricas como a laranja e o limão. O (*R*)-(+)-limoneno é denominado d-Limoneno, o (*S*)-(-) é chamado de l-Limoneno e o (±)-limoneno é conhecido como diterpeno. Curiosamente, os enantiômeros podem ser facilmente diferenciados através do odor, o d-Limoneno possui odor de laranja e o l-Limoneno de limão (SCHLISCHTING, 2008).

O OECSLO (laranja doce) é rico em d-Limoneno, biodegradável, atóxico, o qual foi encontrado como sendo constituinte majoritário do mesmo extraído, da casca dos seus respectivos frutos, conforme (CRAVEIRO et al., 1981), podendo apresentar em sua composição em torno de 90% (OTHA; HIROSE, 1966; CLAUDIO JUNIOR, 2009; MÜLLER, 2011), ou em 95% (SCHLISCHTING, 2008). Derivados do óleo possuem várias aplicações, principalmente no uso de perfumes (FAID et al., 1995, BUTTNER et al., 1996), higiene, bebidas, produtos de limpeza (BIZZO et al., 2009), alimentos (MÜLLER, 2011) e cosméticos (NUNES, 2011), em solventes de resinas borrachas, pigmentos, tintas, fabricação de adesivos, substituído por solventes clorados, limpadores de mãos, desengordurantes, tratamento de esgotos.

Figura 3: Estruturas enantioméricas do Limoneno

Fonte: Autor (2013)

Na Figura 4, são apresentadas algumas estruturas químicas identificadas no óleo essencial das cascas de *Citrus sinensis* L.Osbeck estudadas.

Figura 4: Estruturas químicas dos constituintes identificados no óleo essencial das cascas de *Citrus sinensis* L.Osbeck estudado.

Fonte: Autor (2013)

2.4 Aspectos gerais sobre o *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

O *Aedes aegypti* (Figura 5) é um mosquito doméstico e antropofílico, com atividade hematofágica diurna e utiliza-se preferencialmente de depósitos artificiais de água limpa para colocar seus ovos (CDC, 2011), oriundo do continente africano (CHIARAVALLLOTI-NETO, 1997), trazido juntamente com os escravos (CHIEFFI,

1985). Foi erradicado do Brasil pela primeira vez em 1958, porém, 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 frequência dos meios de transporte, os quais favorecem também a disseminação dos vetores da doença (TAUIL, 2001).

Figura 5: Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)



Fonte: Arbovirus (2012)

Quanto ao aspecto antropofílico do *Aedes*, encontra-se na literatura estudos que mostram o comportamento peculiar deste mosquito. Segundo Harrington

et al. (2001), o *Aedes aegypti* acumula maior reserva energética quando ingere sangue com baixa concentração de isoleucina (sangue humano).

A transmissão ocorre devido à necessidade da fêmea de obter sangue durante a fase de acasalamento, o repasto sanguíneo das fêmeas fornece proteínas para o desenvolvimento dos ovos e ocorre nas primeiras horas do dia e ao anoitecer (o macho alimenta-se de carboidratos extraídos dos vegetais).

A fêmea faz uma postura (geralmente no fim da tarde) após cada repasto sanguíneo e o intervalo entre a alimentação e a postura é de três dias. Uma vez que a fêmea pica a pessoa infectada, ela mantém o vírus na saliva e o retransmite, ou seja, ocorre pelo ciclo homem-*Aedes aegypti*-homem.

Após a ingestão de sangue infectado pelo inseto fêmea, torna-se apto a transmitir o vírus e assim permanece durante toda a vida. Não há transmissão pelo contato de um doente ou suas secreções com uma pessoa sadia, nem fontes de água ou alimento (SILVA, 2006; MOSQUITO DENGUE, 2011).

O Ministério da Saúde através do LIRAa (2013) mostra que, em janeiro deste ano, 267 municípios brasileiros estavam em situação de risco para dengue; 487 em situação de alerta e 238 em situação satisfatória. A pesquisa, que serve para identificar onde estão concentrados os focos de reprodução do mosquito transmissor da dengue, foi realizada em 983 municípios. No mesmo período do ano passado, 765 cidades fizeram o levantamento, sendo que 146 foram consideradas em risco; 384 em alerta e 235 em situação satisfatória. Por região, a maior concentração das larvas do mosquito em reservatórios de água ocorreu no nordeste (76,2%), na região sudeste onde se concentraram os maiores focos em depósitos domiciliares (63,6%) e nas regiões norte, centro-oeste e sul, apresentaram incidência de focos nos lixos com 46,1%, 43,4% e 44%, respectivamente (PORTAL DA SAÚDE, 2013).

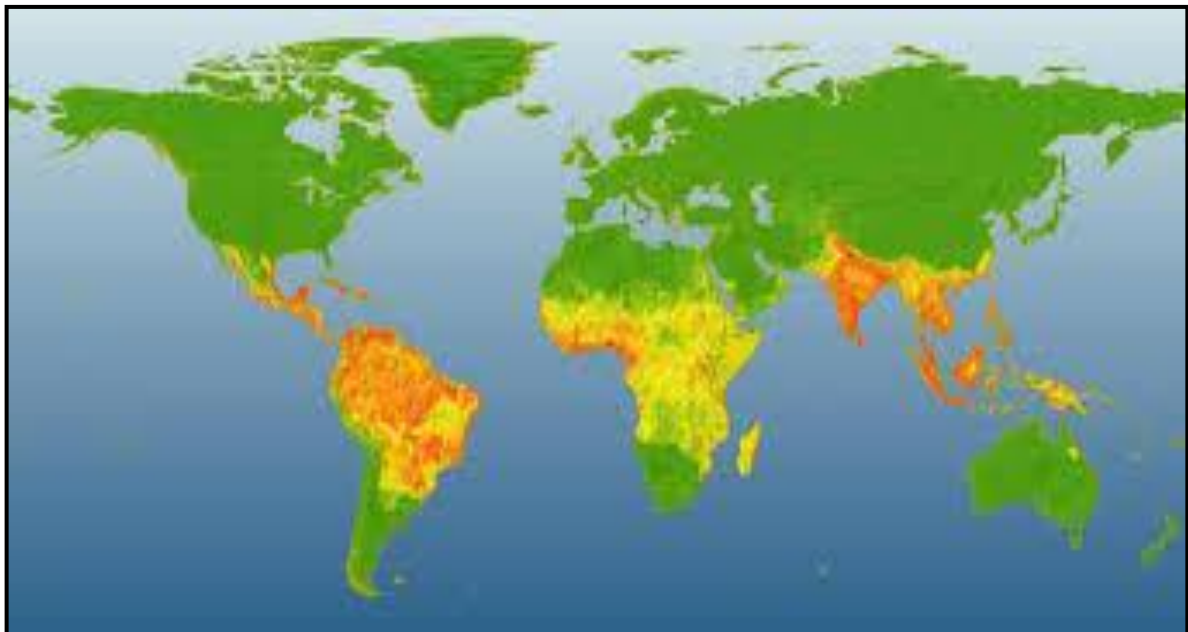
Quanto às capitais, o LIRAa deste ano, evidenciou situação de risco em Palmas (TO) e Porto Velho (RO); de alerta em Belém (PA); Manaus (AM); Rio Branco (AC); Aracaju (SE); Fortaleza (CE); Maceió (AL); Recife (PE); Salvador (BA); São Luís (MA); Belo Horizonte (MG); Rio de Janeiro (RJ); Brasília (DF); Campo Grande (MS) e Goiânia (GO). Já Boa Vista (RR); João Pessoa (JP) e Teresina (PI) apresentaram índice satisfatório. Em relação aos dados referente a casos graves e óbitos, a Organização Panamericana de Saúde e Organização mundial de Saúde (OPAS/OMS, 2013), no Brasil compilaram dados quanto a primeira à sétima semana

epidemiológica referente ao mesmo período (2010,2011,2012 e 2013), aos quais foram registrados com casos graves entre os anos 2010 (3.576), 2011 (2.360), 2012 (577) e 2013 (324), com reduções de 44% (2013/2012) e 91% (2013/2010). Quanto aos óbitos registrados entre os anos 2010 (146), 2011(109), 2012 (41) e 2013(33), com reduções de 20% (2013/2012) e 77% (2013/2010).

Neste ano, os casos graves de dengue no Maranhão (2013/2012), caíram em 92% em relação à primeira a sétima semana epidemiológica e 88% (2013/2010).Foram registrados no mesmo período quanto aos óbitos (2010, 2011,2012 e 2013), 19, 22, 5 e 1 respectivamente, com uma redução (2013/2012) em 67% e em relação ao período (2013/2010), não foi registrado nenhum óbito. O estado do Maranhão foi o único estado do nordeste a alcançar índice positivo quanto ao isolamento viral. Na capital, São Luís, em relação ao mesmo período houve uma queda de 92% no número de casos graves de dengue, no ano passado foram registrados 12 casos e neste ano, o número reduziu para apenas um caso. O número de óbitos neste período por causa da doença, não foi evidenciado.

A ocorrência do *Aedes aegypti* se dá principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Na Figura 6, as áreas em vermelho indicam a incidência de maior risco no respectivo mapa, equivalente ao primeiro semestre de 2013.

Figura 6: Ocorrência e distribuição do *Aedes aegypti* no mundo

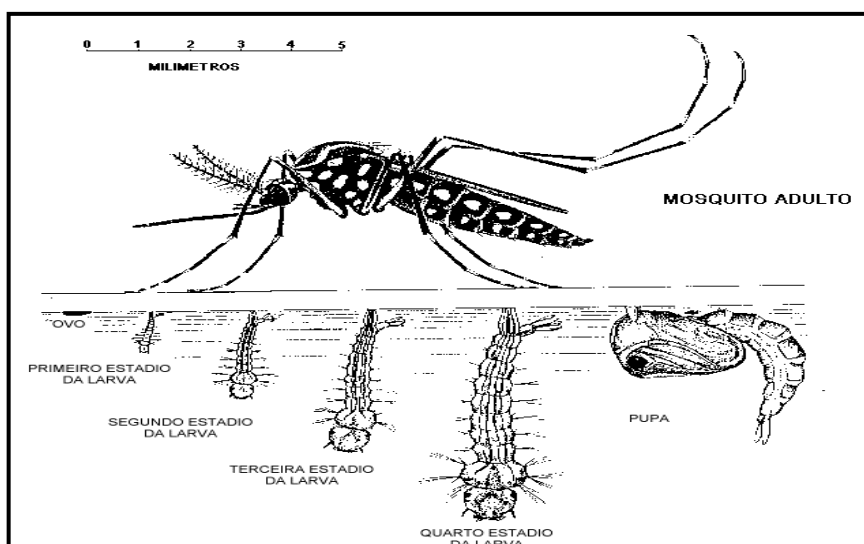


Fonte: Healthmap (2013)

2.4.1 Ciclo de vida do *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* é uma espécie doméstica, que se reproduz, preferencialmente, em água parada e limpa, acumulada em recipientes fabricados pelo homem, como latas, pneus e vasos; dentro ou perto das habitações. Seu ciclo de vida compreende quatro estágios: OVO – LARVA – PUPA – ADULTO (SILVA, 2006). Para que se possa combater o mosquito *Aedes aegypti* é necessário que entenda seu ciclo de vida (Figura 7), em que os três primeiros estágios são aquáticos (MARINHO, 2010).

Figura 7: Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*



Fonte: UNICAMP (2012)

2.4.1.1 O ovo

Os ovos do *Aedes aegypti* (Figura 8), medem aproximadamente um milímetro de comprimento, com contorno alongado e fusiforme sendo depositado individualmente, nas paredes dos depósitos que servem como criadouros, próximos à lâmina da água; no momento da postura os ovos são brancos, mas nas primeiras vinte quatro horas adquirem a cor negra; a formação do embrião se completa em 48 horas; são capazes de resistir a longos períodos de dessecação.

Figura 8: Ovos *Aedes aegypti*



Fonte: FIOCRUZ (2012)

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

2.4.1.2 A larva

Nesta fase (Figura 9), o *Aedes aegypti*, se alimentam de substâncias orgânicas, bactérias, fungos e protozoários existentes na água. A duração da fase larval, em condições favoráveis de temperatura (25 a 29 °C) e boa alimentação, podem chegar a 10 dias, podendo se prolongar por algumas semanas. Movimenta-se em forma de serpente, como um “S”, sendo sensível a movimentos bruscos e rápidos na água, onde se refugia no fundo do recipiente.

Figura 9: Larvas do mosquito *Aedes aegypti*



Fonte: FIOCRUZ (2012)

2.4.1.3 A Pupa

As pupas (Figura 10), possuem a forma de uma vírgula, sendo portanto, o último estágio da fase aquática, não se alimenta, apenas respira, sendo bastante móvel quando perturbada; seu corpo escurece à medida que se aproxima o momento da mudança da fase larval para o adulto, em condições favoráveis de temperatura entre dois a três dias.

Figura 10: *Aedes aegypti* em fase de pupa



Fonte: FIOCRUZ (2012)

2.4.1.4 O adulto

Na fase adulta (Figura 11), o mosquito macho-fêmea já formados, alimentam-se de néctar e sucos vegetais até a fase de acasalamento (uma única inseminação é suficiente para fecundar todos os ovos que a fêmea venha a produzir durante sua vida).

Figura 11: *Aedes aegypti* adulto



Fonte: FIOCRUZ (2012)

A partir daí, a fêmea necessita de sangue para a maturação dos ovos. A busca por esse alimento ocorre, geralmente, durante o dia, nas primeiras horas da manhã e ao anoitecer. Em regiões tropicais, como o Brasil, o fato de ocorrerem chuvas constantes aumenta significativamente o número de mosquitos.

2.5 Técnicas Analíticas

As técnicas analíticas permitem a avaliação das qualidades do óleo essencial, de forma a garantir a sua identificação, constância de seus constituintes químicos e a segurança de sua utilização (MARINHO, 2010).

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. A seguir são apresentadas as técnicas utilizadas neste trabalho.

2.5.1 Cromatografia Gasosa (CG)

Devido aos óleos essenciais apresentarem misturas complexas de vários constituintes, a análise de misturas requer a aplicação de métodos analíticos modernos e instrumentação adequada. Diferentes técnicas cromatográficas são predominantes na análise de voláteis; em particular, métodos de cromatografia gasosa que resultam na separação da mistura em componentes individuais (BRAITHWAITE; SMITH, 1996; SCHREIER, 1984). Desta maneira, a cromatografia permite determinar, qualitativamente e quantitativamente, as frações individuais obtidas nos cromatogramas.

2.5.2 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV)

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.

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

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

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

Na técnica de impacto de elétrons (IE), mais comumente usada em espectrometria de massas, um espectrômetro de massas bombardeia moléculas na fase vapor com um feixe de elétrons de alta energia e registra o resultado do impacto dos elétrons como um espectro de íons separados na base da razão massa/carga (m/z). A maior parte dos íons formados tem carga unitária. Os espectros de massas são obtidos rotineiramente com o uso de um feixe eletrônico de energia de 70 eV. O evento mais simples que pode ocorrer em fase gasosa é a

remoção de um único elétron pelo feixe, com formação do íon molecular, um cátion-radical (M^+). O ponto simples representa o elétron desemparelhado. A maior parte dos íons desintegra-se em 10^{-10} - 10^{-3} s, apresentando, no caso mais simples, um fragmento.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Extrair, caracterizar e avaliar a atividade larvicida do óleo essencial *Citrus sinensis* L.Osbeck (laranja doce), frente ao mosquito *Aedes aegypti*.

3.2 Específicos

- ✓ Coletar, preparar a exsicata e identificar botanicamente a espécie *Citrus sinensis* L.Osbeck;
- ✓ Extrair quantitativamente o óleo essencial do pericarpo de *Citrus sinensis* L.Osbeck pelo método de hidrodestilação;
- ✓ Determinar as propriedades físico-químicas do óleo essencial, quanto a sua densidade, índice de refração, solubilidade em etanol a 90%, cor e aparência;
- ✓ Obter e cultivar as larvas do mosquito *Aedes aegypti*;
- ✓ Caracterizar analiticamente e quantificar os componentes majoritários da mistura dos óleos essenciais por CG-EM e Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho (IV);
- ✓ Avaliar a atividade larvicida do óleo essencial do pericarpo do *Citrus sinensis* L.Osbeck (laranja doce) frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti* e calcular a concentração letal a 50% (CL₅₀) do óleo a partir do teste de toxicidade;
- ✓ Correlacionar a atividade larvicida entre o óleo essencial de *Citrus sinensis* L.Osbeck e do Padrão d-Limoneno frente ao *Aedes aegypti*.

CAPÍTULO 4

ETAPA EXPERIMENTAL

4 PARTE EXPERIMENTAL

O presente trabalho foi desenvolvido em parceria com o Laboratório de Físico-Química de Alimentos do Pavilhão Tecnológico (PCQA), Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA), Herbário Ático Seabra, Núcleo de Combustível Catálise e Ambiental (NCCA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e Central Analítica da USP.

4.1 Equipamentos analíticos e acessórios

A metodologia adotada envolveu atividades usuais em um tratamento analítico de plantas aromáticas, bem como testes larvicidas usando óleos essenciais.

- **Liquidificador Industrial**
Utilizou-se um liquidificador industrial METVISA, modelo LAR.4 para a trituração da amostra.
- **Analizador de Umidade por Infravermelho**
Utilizou-se um analisador de umidade por infra-vermelho GEHAKA, modelo IV2500 para determinação da umidade da espécie vegetal, para calcular o seu rendimento.
- **Refratômetro**
Utilizou-se um refratômetro marca ABBE, modelo 2 WAJ, para a medida de índice de refração.
- **Extrator de Clevenger**
Utilizou-se extrator de Clevenger modificado de vidro, acoplado a um balão de fundo redondo de 6000 mL, para extração do óleo essencial, acoplado a uma manta, usada como fonte de calor.

- **Centrífuga**

Foi utilizada uma centrífuga FANEM, modelo 206, para separação do hidrolato contido no óleo essencial.

- **Picnômetro**

Utilizou-se um picnômetro de 1 mL para a determinação da densidade do óleo essencial.

- **Balança Analítica**

Utilizou-se uma balança analítica da METTLER, modelo AE - 240, com precisão de 10^{-4} unidades.

- **Cromatógrafo à Gás acoplado a Espectrômetro de Massas (CG-EM)**

Utilizou-se aparelho Cromatógrafo em fase gasosa marca SHIMADZU, modelo QP5050A, acoplado a um espectrômetro de massas HP5972, para análises do óleo essencial.

- **Espectrometro por Infravermelho**

Utilizou-se aparelho Infravermelho marca SHIMADZU, modelo PRESTIGE-21, para fins de análises do óleo essencial por comparação ao seu padrão d-Limoneno.

4.2 Materiais e Reagentes

- Sulfato de sódio anidro P. A, Na_2SO_4 , 99% de pureza; MERCK.
- Etanol, 99% de pureza; MERCK.
- Tween 80, MERCK.
- Padrão d-Limoneno 98% de pureza; SIGMA ALDRICH.
- Pipetadores automáticos DIGIPET e EPPENDORF (2-10 μL , 10-100 μL).
- Tubos de ensaio (10x100 mm).
- Ampolas de vidro âmbar.

- Pipetas de Pasteur.
- Placas de Petri.
- Água Mineral

4.3 Metodologia Experimental

4.3.1 Método de obtenção do óleo essencial dos pericarpos de *Citrus sinensis* L.Osbeck (laranja doce)

4.3.1.1 Origem, coleta e identificação do material vegetal

As amostras (folhas, galhos e frutos) da espécie vegetal *Citrus sinensis* L.Osbeck, foram coletadas no Campus do IFMA-Maracanã ($2^{\circ}36'32.81''\text{S}$; $44^{\circ}16'3.25''\text{W}$), situado em São Luís do Maranhão (Figura 12), cujas mudas foram concedidas em 06 de junho de 2007 e certificadas pelo Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (CNPMPF) da Empresa Brasileira de Agropecuária (EMBRAPA), localizado em Cruz das Almas no estado da Bahia e registrada pelo setor de fruticultura do IFMA, como D-25 (laranja doce, variedade: pêra). As coletas foram realizadas entre março e junho de 2012 de uma mesma árvore com o objetivo de obter-se uma amostra representativa homogênea, as quais foram encaminhadas ao Laboratório de Físico-Química e Microbiologia do Pavilhão Tecnológico da UFMA, onde os frutos foram separados e acondicionados em sacos de polietileno para posterior processamento (trituração, extração e análises) e a outra parte, folhas e galhos para o preparado de suas exsiccatas.

Figura 12: Localização da área de coleta de *Citrus sinensis* L.Osbeck



Fonte: Google Maps (2013)

4.3.1.2 Preparo das Exsicatas

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 em estufa 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 e número de depósito.

4.3.1.3 Extração do óleo essencial

O óleo essencial da espécie *Citrus sinensis* L.Osbeck (laranja doce) foi extraído por hidrodestilação em um sistema extrator de Clevenger de vidro (Figura 13), acoplado a um balão de fundo redondo de 6000 mL, com uma manta elétrica aquecedora mantendo-se a temperatura em 100°C (FARMACOPÉIA, 2010). Para cada rotina de extração foram utilizadas 300 gramas das cascas frescas do fruto, com 3000 mL de água destilada na proporção de (1:10), em um balão de fundo redondo acoplado ao sistema Clevenger, as quais foram realizadas em triplicatas. Após 5 horas, encerrava-se a destilação recolhendo-se o óleo essencial, onde o mesmo foi seco por meio de percolação em Na₂SO₄ anidro e levado à centrífuga para completa secagem.

Figura 13: Extrator de Clevenger



Fonte: Autor (2012)

Após os procedimentos realizados anteriormente, as amostras foram armazenadas e identificadas em frascos e em ampolas de vidro âmbar sob refrigeração (Figura 14), para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis.

Figura 14: Óleo essencial extraído cascas da laranja doce



Fonte: Autor (2012)

4.3.1.4 Rendimento da extração do óleo essencial de *Citrus sinensis* L.Osbeck

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 quatro 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 extração do óleo essencial. A outra forma, expressa em percentagem, na relação massa/massa pela medida da densidade, observando o volume máximo obtido de óleo por massa(g) do vegetal em estudo, conforme fórmula abaixo (FARMACOPÉIA, 2010; FABROWSKI, 2002). O rendimento do óleo foi calculado através da relação do volume de óleo obtido, com a massa do material vegetal utilizado na hidrodestilação com a base do material livre de umidade (b.l.u.) subtraindo-se da massa de amostra a quantidade de água.

$$\% R = (V.d/m) \times 100$$

Onde:

V= volume total de óleo extraído (mL)

d= densidade do óleo (g/mL)

m= massa da espécie vegetal seca(g), após determinação com base do material livre de umidade de (b.l.u).

4.4 Caracterização Físico-química do óleo essencial

Para caracterização das propriedades físicas do óleo essencial foram determinadas a umidade, a densidade, o índice de refração, a solubilidade em etanol a 90%(v/v), cor e aparência, como consta a seguir:

4.4.1 Umidade (%)

Foi pesado 2,0 g da planta fresca (cascas) e colocado no analisador de umidade por infravermelho a uma temperatura de análise de 115°C por 30 minutos com taxa de secagem de 0,01%/min.

4.4.2 Densidade

Para o cálculo da densidade, foi utilizado um picnômetro de 1,0 mL, previamente seco, tarado e aferido, onde foram adicionadas e pesadas as amostras do óleo essencial (25°C), (IAL, 2008).

4.4.3 Solubilidade em etanol (90%)

Na determinação da solubilidade, foi preparada uma solução de etanol/água a 90% (v/v), mantendo-se constante o volume do óleo em 25 microlitos em um tubo de ensaio, ao qual adicionou-se proporcionalmente o mesmo volume da solução alcoólica, até atingir a completa solubilização (FARMACOPÉIA, 2010).

4.4.4 Índice de Refração

Para a determinação do índice de refração, foram usadas pipetas de Pasteur em vidro para adicionar as amostras do óleo diretamente sobre o prisma de Flint do refratômetro, à temperatura de 25°C; fazendo-se então as leituras (FARMACOPÉIA, 2010).

4.4.5 Cor e Aparência

A técnica proposta é a visual, sob um fundo branco, onde foi comparado com a cor do óleo essencial, com as já conhecidas e para a aparência se fez uma inspeção do óleo no que diz respeito a sua transparência ou limpidez (IAL, 2008).

4.5 Análises Químicas

Foram utilizadas as técnicas de Cromatografia a Gás hifenada a Espectrometria de Massas (CG-EM) e Análise Espectrométrica Vibracional na Região do Infravermelho (IV).

4.5.1 Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à espectrometria de Massas (CG-EM).

A análise dos constituintes voláteis foi realizada em cromatógrafo à gás da marca SHIMADZU, acoplado a um espectrômetro de massa CG/EM QP5050A (Figura 15) equipado com coluna capilar fenilpolisifenileno-siloxano de BPX 5%, (30 m comprimento x 0,25 mm de espessura e 0,25 μm de espessura do filme), utilizando o hélio de alta pureza como gás de arraste. A temperatura do injetor e interface do CG com detector seletivo foi mantida em 280 °C com fluxo na coluna de 2,7 mL/min, programada para operar em 50 °C. Para as análises, foram injetadas alíquotas com volume de 1 μL em acetato de etila, fixando-se as seguintes condições: modo de divisão com pressão da coluna de 150 kPa, velocidade linear 59,1, com fluxo total de arraste 30 mL/min, modo de varredura 0,5 em segundos.

Figura 15: Aparelho Cromatógrafo à gás acoplado a Espectrômetro de massas



Fonte: Central Analítica USP (2013)

4.5.2 Análise Espectrométrica Vibracional na Região do Infravermelho

Analisou-se o óleo essencial por Infravermelho no Espectrômetro IR PRESTIGE-21(Figura16) Fourier transform infrared spectrophotometer SHIMADZU. As amostras foram analisadas diretamente em janelas de brometo de potássio (KBr), usado como agente dispersante. A caracterização na região do infravermelho foi obtida na região entre 4000 a 500 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

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 16: Espectrofotômetro com Transformada de Fourier



Fonte: Autor (2012)

4.6 Teste de Toxicidade

4.6.1 Obtenção e cultivo das larvas do *Aedes aegypti*

Os ovos do *Aedes aegypti* foram coletados na Universidade Federal do Maranhão, Campus do Bacanga em São Luís Maranhão, através de armadilhas denominadas ovitrampas. Estas consistem de baldes 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 17).

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



Depósito de 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. Em uma segunda etapa, devido à escassez do período chuvoso, parte das larvas foram coletadas por técnicos especialistas da Secretaria de Vigilância Sanitária e Epidemiológica da Prefeitura Municipal de São Luís, em locais que foram encontrados alguns focos de larvas, as quais foram encaminhadas para ao Laboratório da UFMA, para posterior seleção.

4.6.2 Teste Larvicida

A partir da metodologia adotada por SILVA (2006), os testes foram seguidos das seguintes procedimentos. Inicialmente, foi preparada uma solução-mãe de $1.000 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ 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 seis soluções nas concentrações 70, 90, 100, 120, 130 e 150 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ para óleo e da mesma forma foi realizado para o padrão d-Limoneno, em sete concentrações 70, 90, 100, 120, 130, 150 e 160 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. 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 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, equivalente a concentração utilizada pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) para o controle larvicida do vetor, além do Novaluron(1-[3-cloro-4-(1-1-3-trifluoro-2-trifluoromethoxyethoxy)phenyl-3-2,6difluorobenzoyl) uréa a 0,02 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, dose adotada pelo Ministério da Saúde, indicada pela OMS no ano de 2011, no intervalo de 0,01 a 0,05 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Na Figura 18, são apresentados os larvicidas comerciais usados no presente trabalho.

Figura 18: Larvicidas comerciais usados: Temefós e Novaluron

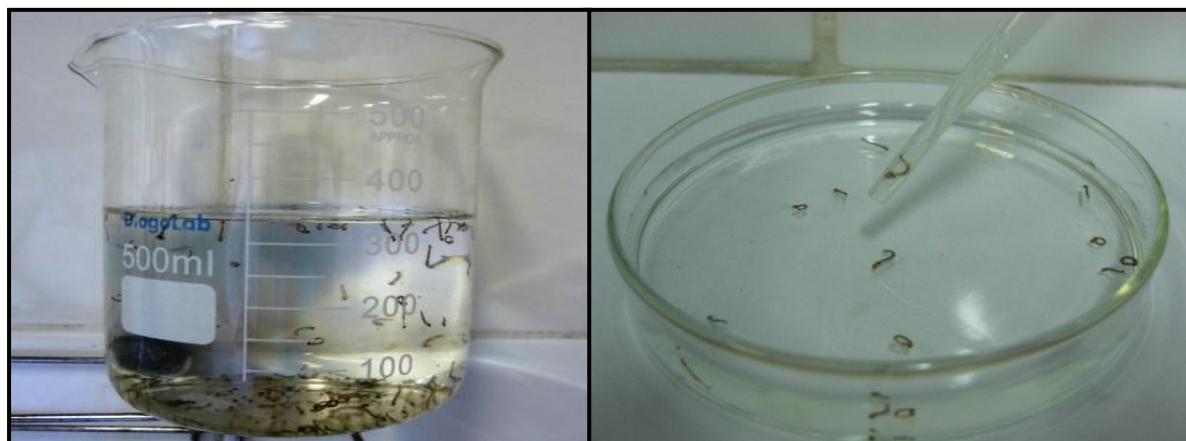


Fonte: Autor (2012)

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 19), por técnicos do Laboratório do Núcleo de Patologia Tropical e Medicina Social do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão.

Figura 19 : Larvas do *Aedes aegypti* em terceiro estágio.



Fonte: Autor (2012)

4.6.3 Análise Estatística

Após os testes, montou-se uma tabela com os valores das seis concentrações do óleo essencial e em sete concentrações para o padrão d-Limoneno, logaritmo das mesmas o número de larvas mortas após 24 horas (média dos três pontos), número de larvas vivas após 24 horas (média dos três pontos), o acumulado de mortos (soma das células de mortos abaixo) e o acumulado de vivos (soma das células de vivos acima).

A análise estatística dos dados foi realizada de acordo com o método de Reed-Muench (1938), o qual parte do princípio de que um animal que sobreviva a certa dose, também irá sobreviver em qualquer outra dose menor que aquela, consequentemente, o animal que morrer com certa dose, também irá morrer em doses maiores que aquela. A partir de uma tabela contendo os dados de mortalidade para cada concentração testada, 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} .

CAPÍTULO 5

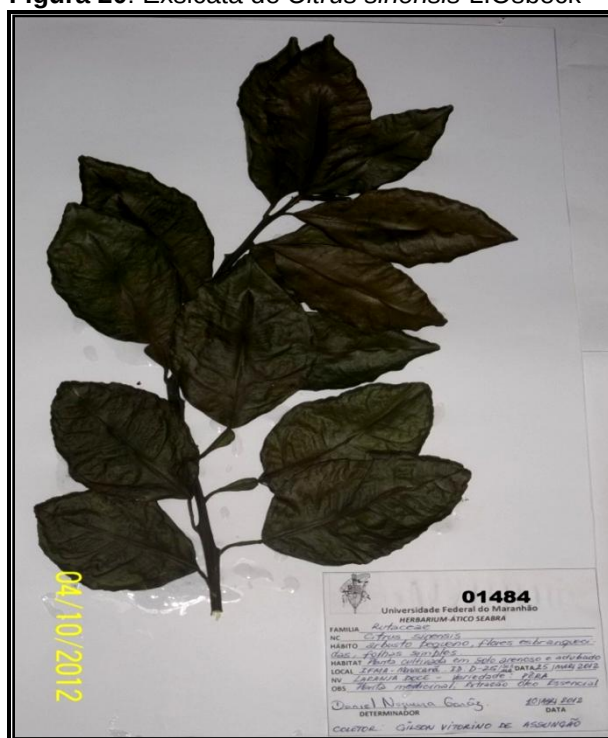
RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação botânica de *Citrus sinensis* L.Osbeck (laranja doce) pela sua exsicata

De acordo com procedimentos adotados anteriormente, foi possível preparar a exsicata da espécie vegetal *Citrus sinensis* L.Osbeck (laranja doce var: pêra), obter-se sua identificação botânica depositada no Herbário Ático Seabra, da Universidade Federal do Maranhão sob número 01484 (Figura 20).

Figura 20: Exsicata de *Citrus sinensis* L.Osbeck



Fonte: Autor (2012)

5.2 Avaliação cinética de extração do óleo essencial *Citrus sinensis* L.Osbeck

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

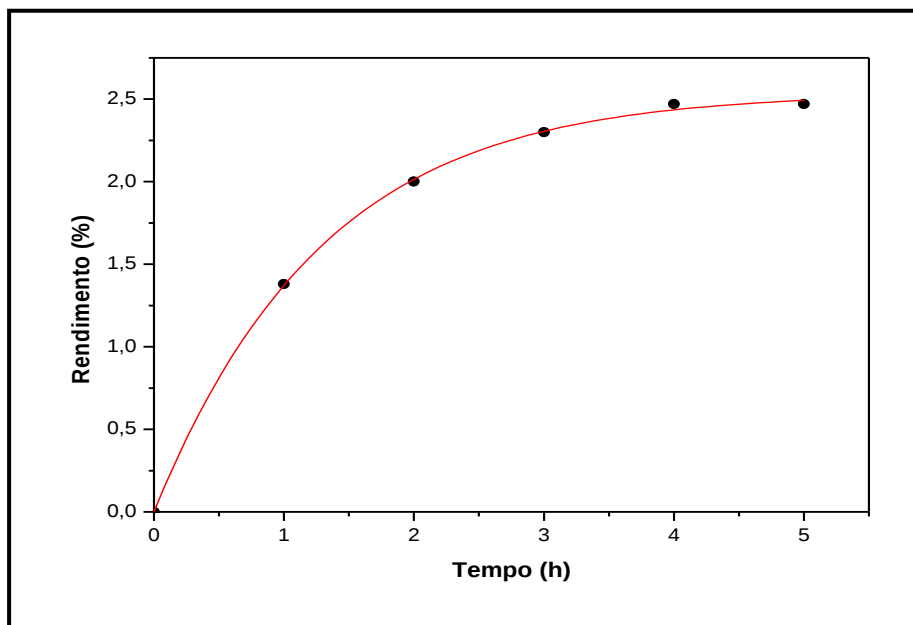
Segundo Mouchrek Filho (2000), a cinética de extração do óleo essencial é um dos principais parâmetros físico-químicos da indústria de essências, além de estarem diretamente relacionada com a qualidade do óleo essencial, se reflete no

tempo de extração e na natureza econômica do processo, além de ser peculiar a cada tipo de essências a ser extraída.

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 pode elevar a quantidade de compostos de aroma menos estimados (CHAAR, 2000).

No gráfico da Figura 21, observa-se que o rendimento máximo do óleo extraído nas condições normais de extração por hidrodestilação, foi obtido quando o tempo de extração em torno de 3,5 horas, obtendo-se um volume de óleo essencial igual a 3,20 mL, atribuindo-se a este valor o teor de máximo de óleo extraído. Para tempos maiores, verificou-se uma constância no volume, provavelmente devido à diminuição extraído do óleo essencial no extrator, em decorrência da destilação.

Figura 21: Curva cinética referente ao rendimento de extração do óleo em função do tempo, com massa de 300g e temperatura de 100°C.



Alguns trabalhos sobre a cinética de extração de óleos essenciais com a espécie de *Aniba duckei* Kostermans, Teles (2009), *Pimenta dioica* Lindl, Marinho (2010), com os óleos das espécies, mostram um rendimento máximo na extração atingido para o tempo de 4 horas. Ainda Fernandes (2010), estudando a cinética de extração das espécies *zingiber officinale* Roscoe e *Citrus limon* Linneo apresenta um rendimento máximo com 3 horas de extração.

Na Figura 22, pode-se observar o óleo essencial extraído de *Citrus sinensis* L.Osbeck.

Figura 22: Cascas da laranja doce, padrão d-Limoneno e óleo essencial extraído



Fonte: Autor (2012)

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

5.3 Avaliação das características físico-químicas do óleo essencial de *Citrus sinensis* L.Osbeck

Os parâmetros físico-químicos dos óleos essenciais são importantes não apenas para determinação da qualidade, como também para o controle da sua pureza. Os resultados das características físico-químicas do óleo essencial extraído das cascas da laranja doce, são apresentados na a seguir (Tabela 1).

Segundo Bizzo 2009, o Brasil destaca-se na produção mundial de óleo essencial, mas sofre por problemas crônicos como falta de manutenção do padrão de qualidade dos mesmos, representatividade nacional e baixos investimentos governamentais no setor, que levam ao quadro estacionário observado. Desta forma é importante ressaltar, que no presente estudo, adotou-se como referência as Normas da Farmacopéia Européia e ISO sob número 3140/2011(Revista de Fitoterapia, 2011), devido à falta quanto aos dados reportados na literatura para fins de comparação e o único recurso encontrado foi as respectivas normas em questão.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas obtidos do óleo essencial das cascas da laranja doce

Parâmetros Físico-químicos	OECS-Estudado	Farmacopéia Européia/ISO- OECS*
Densidade (g/mL)	0,850	0,842-0,850
Solubilidade em etanol a (90%)	1:5	-
Índice de refração (N_D 25°)	1,476	1,470-1,476
Cor	Incolor	-
Aparência	Límpido	-
Odor	Característico	-
Rendimento (% m/m)	2,47	-

Fonte: Revista de Fitoterapia* (2011)

O óleo essencial de *Citrus sinensis* L. Osbeck, apresentou valor de densidade de 0,850g/mL, estando dentro do limite aceitável que recomenda as normas de qualidade para óleos essenciais adotados pela Farmacopéia Européia e ISO (Revista de Fitoterapia, 2011) estabelece intervalo de (0,842-0,850), enquanto que o índice de refração (N_D 25°) apresentou valor de 1,467, exatamente no limite máximo que recomendada (1,470-1,476), no entanto, o valor encontra-se dentro da faixa do índice de refração para o padrão d-Limoneno, que é de 1,473 (ALDRICH, 2006), justificando o valor encontrado.

O índice de refração é muito importante para definir as características analíticas dos óleos essenciais e também no reconhecimento de falsificações (MOUCHREK FILHO, 2000).

Quanto à solubilidade, o óleo mostrou-se solúvel em uma solução de etanol a 90%, na proporção de 1 parte de óleo para 5 de solução alcoólica. O óleo apresentou-se transparente logo após ser extraído, sua aparência mostrou-se límpida, sendo observada nenhuma presença de impureza ou particulado. O seu odor foi característico da laranja, bem similar ao da casca do fruto quando espremidos e semelhante ao do padrão d-Limoneno.

Quanto ao rendimento do óleo, o qual foi calculado a partir da base livre de umidade (b.l.u), o mesmo apresentou um rendimento considerado muito bom de 2,47% (m/m), considerando a densidade do óleo igual a 0,850 g/mL comparado com extrações de outras espécies vegetais.

De uma forma geral, comparando os valores para o óleo essencial estudado com as normas da Farmacopéia Européia /ISO, observa-se que houve uma similaridade entre eles, no que diz respeito aos parâmetros analisados. As pequenas diferenças nos valores encontrados podem ser atribuídas a fatores tais como época de coleta, diferentes tipos de solo, condições climáticas e tempo de armazenamento.

Há múltiplos fatores que podem ser responsáveis pela variabilidade química, como os ambientais que são extrínsecos à biologia vegetal, e outros dependentes da fisiologia das plantas ou do seu genoma, como são a ontogenia, o tipo de órgão e os quimiotipos.

Segundo Simões *et al.* (2007), a composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo, geralmente, específica para um determinado órgão e característica para o seu desenvolvimento, mas as condições ambientais são capazes de causar variações significativas (SILVESTRI *et al.*, 2010).

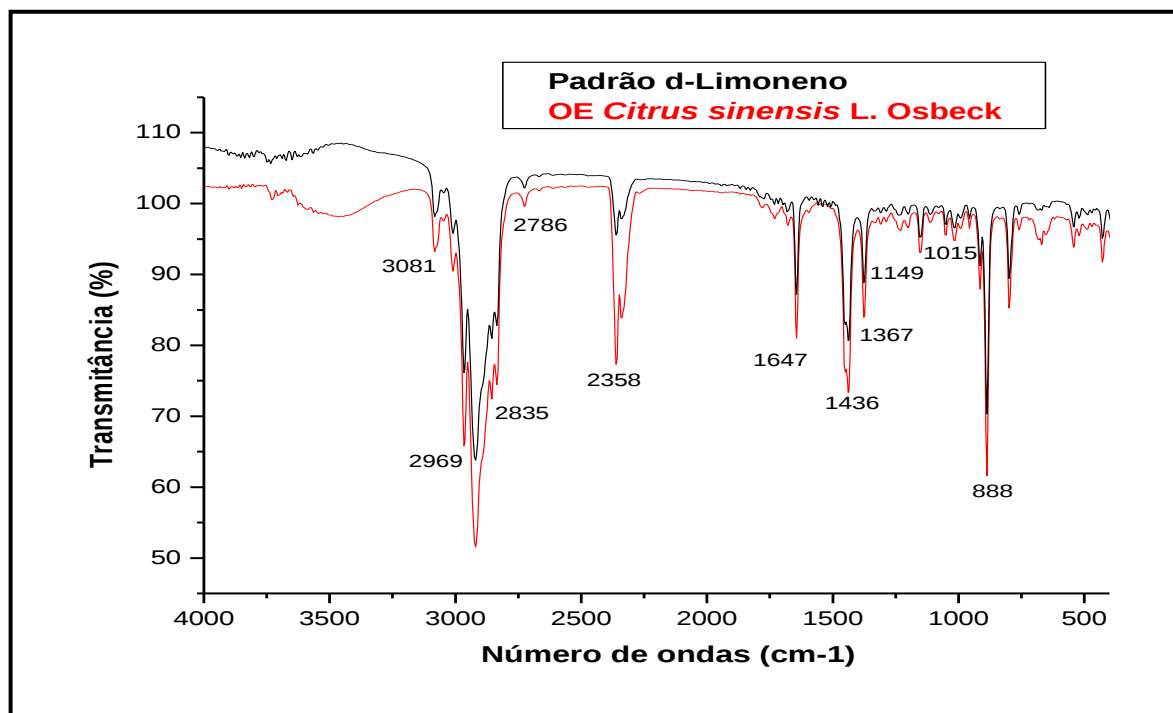
5.4 Análise Espectroscópica Vibracional na Região do Infravermelho

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 das cascas de *Citrus sinensis* L. Osbeck e do seu padrão d-Limoneno podem ser observados na (Figura 23) onde as bandas de absorção possuem as mesmas frequências conforme (Tabela 2) a qual apresenta as principais bandas de absorção e modos vibracionais do padrão d-Limoneno e do óleo essencial extraído da casca do *Citrus sinensis* L.Osbeck na região do infravermelho. As bandas de absorção compreendida nas regiões de 2786 a 3081 cm^{-1} são atribuídas a estiramentos C—H fracas resultantes de vibrações de alquenos e as vibrações de deformação axial da

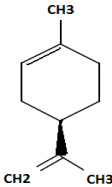
ligação C=C acopla-se com a vibração de deformação axial das ligações C—C adjacentes, nas regiões 888 a 1647 cm^{-1} (Silverstein *et al.*, 2007).

Figura 23: Espectros na região do infravermelho do padrão d-Limoneno e óleo essencial *Citrus sinensis* L.Osbeck



Fonte: Autor (2012)

Tabela 2: Principais bandas de absorção e modos vibracionais do padrão d-Limoneno e do óleo essencial da casca do *Citrus sinensis* L.Osbeck na região do infravermelho.

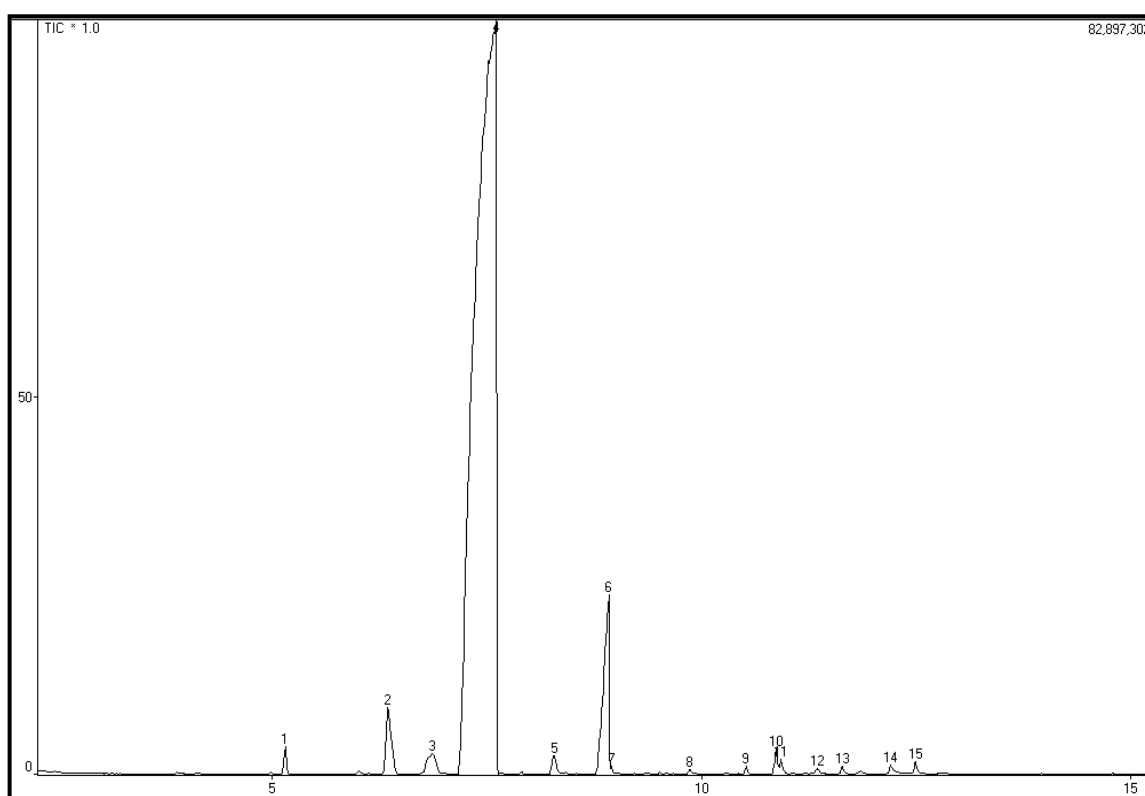
Composto d-Limoneno	Tipo de Deformação	Grupo Funcional	Tipo de ligação	Absorção (cm^{-1})	
				d-Limoneno	OECS
	Axial	Alqueno	C — H	3081	3081
	Axial	Metila	C — H	2969	2962
	Axial	Alifático	C = C	1647	1641

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 sinensis* L.Osbeck obtidos mostram os componentes majoritários e alguns minoritários.

Os espectros obtidos por CG-EM, a comparação com os dados da biblioteca do instrumento e a dedução dos fragmentos dos compostos voláteis no óleo essencial extraído das cascas de *Citrus sinensis* L.Osbeck pode ser observados na Figura 24.

Figura 24: Cromatograma da amostra do óleo do pericarpo do *Citrus sinensis* L.Osbeck, apresentando os picos selecionados e identificados através da comparação dos respectivos espectros de massas com a espectroteca



Na Tabela 3, observar-se os constituintes identificados no óleo essencial de *Citrus sinensis* L. Osbeck, por ordem do tempo de retenção.

Tabela 3: Compostos identificados na amostra do óleo essencial extraídos das cascas de *Citrus sinensis* L.Osbeck

Pico ¹	IR ² (min.)	Constituintes	%A ⁴
1	5,155	α -Pineno	0,33
2	6,350	β -Mirceno	1,90
3	6,861	Octanal	0,93
4	7,610	d-Limoneno	89,55
5	8,287	1,Octanol	0,46
6	8,919	Linalol	5,36
7	8,959	Nonanal	0,08
8	9,866	Citronelal	0,06
9	10,523	Terpineol	0,12
10	10,873	α -Terpineol	0,39
11	10,926	Decanal	0,25
12	11,352	β -Citronelol	0,08
13	11,643	Neral	0,13
14	12,210	Citral	0,17
15	12,496	1,Ciclohexeno	0,20

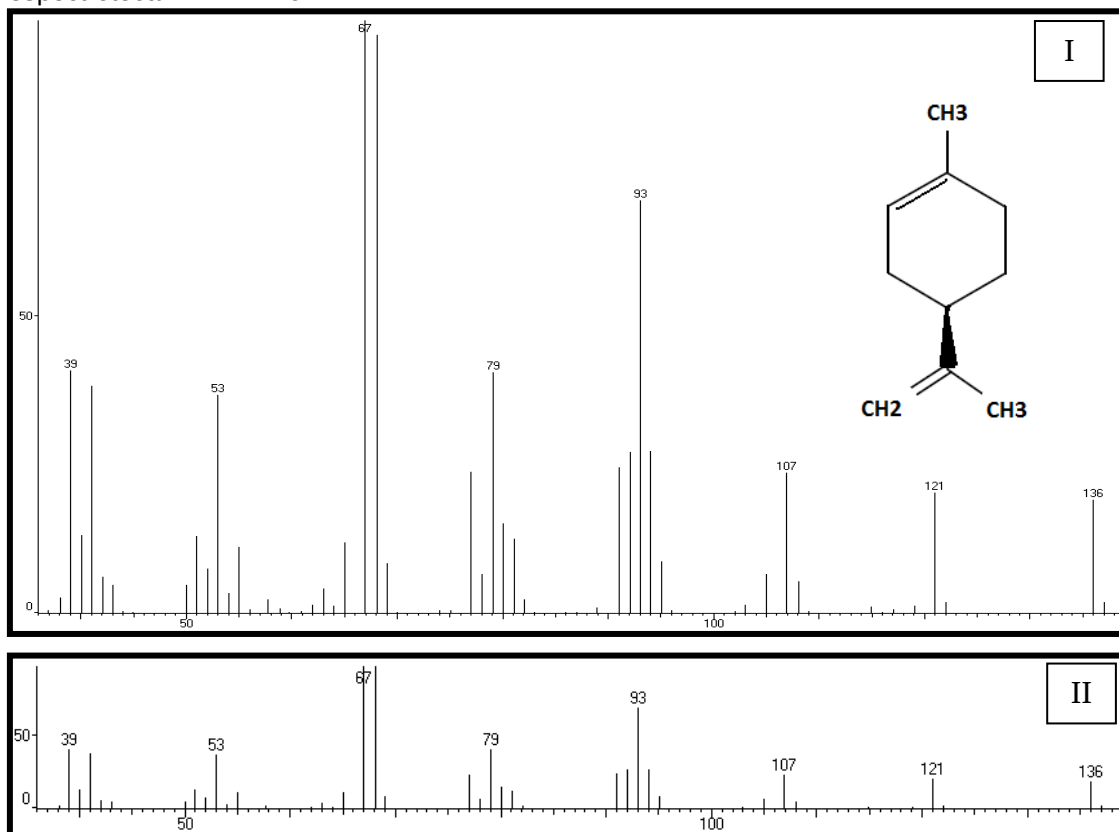
Nota: ¹Número do pico pela ordem de eluição da coluna; ²IR: Índice de retenção dos compostos na coluna em minutos; %A⁴: Porcentagem da área normalizada a qual indica a distribuição relativa dos componentes na amostra.

Foram identificados no total, 15 diferentes constituintes com concentrações de 0,06 a 89,55%, correspondendo a 100% da composição do óleo. Os principais constituintes presentes no óleo essencial das cascas de *Citrus sinensis* L.Osbeck, foram o monoterpeno: d-Limoneno (89,55%) como constituinte majoritário, seguido do monoterpeno oxigenado com Linalol (3,85%) e monoterpeno: β -Mirceno (1,90%), os quais correspondem a 96,81% do mesmo, seguido do Octanal (0,93%); 1,Octanol (0,46%); α -Terpineol (0,39%); do monoterpeno, α -Pineno (0,33%); Decanal (0,25%); 1, Ciclohexano (0,20%); Citral (0,17%); Neral (0,13%); Terpineol (0,12%); Citronelol (0,08%); Nonanal (0,08%) e Citronelal (0,06%).

Nas Figuras 25, 27 e 28 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 4 da Figura 24, corresponde ao d-Limoneno, $C_{10}H_{16}$, evidenciado pela presença do íon molecular $m/z=136$ observado no espectro de massas da Figura 25.

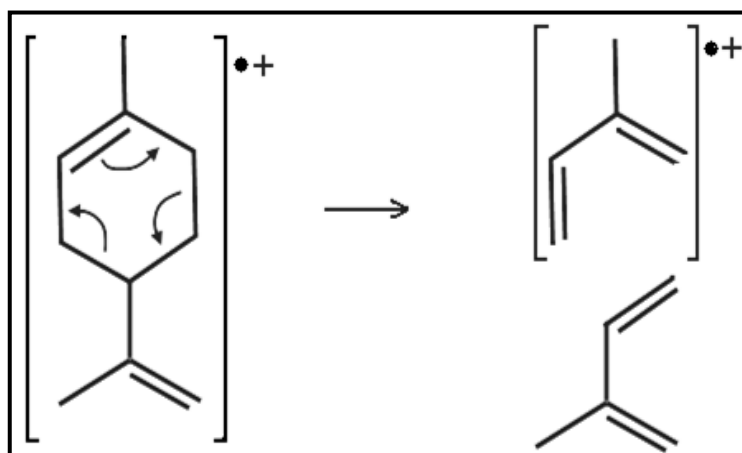
Figura 25: (I) Espectro de massa do d-Limoneno (pico 4). (II) Espectro de massa da espectroteca WILEY 229.



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 das subseqüentes perda do grupo metileno.

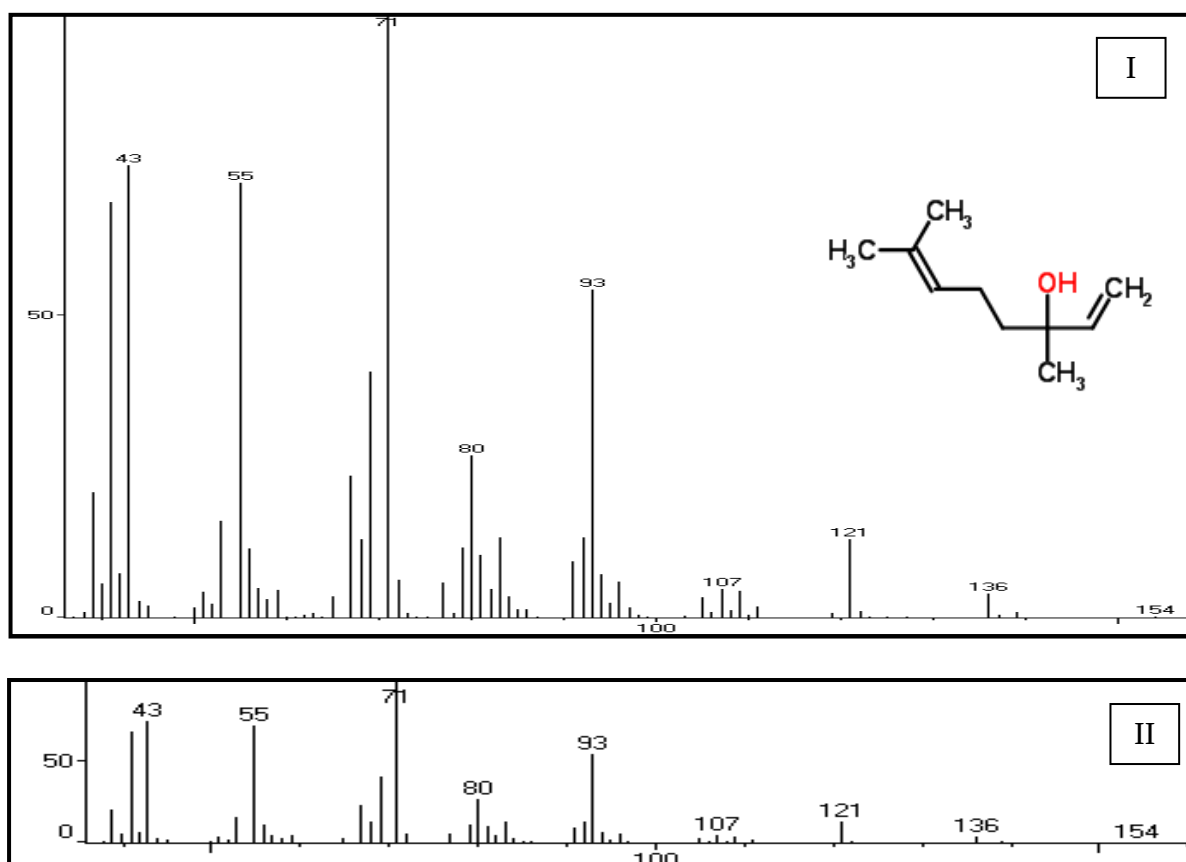
O aparecimento do pico com $m/z = 67$ $C_5H_7^{++}$, pode ser decorrente da quebra das ligações carbono-carbono semelhantemente à reação retro-Diels-Alder (Figura 26), o qual é bastante comum em alquenos cíclicos, resultando ainda em uma molécula neutra, conforme demonstrado na Figura 26 (SILVERSTEIN *et al.* 2007).

Figura 26: Ocorrência da reação de retro-Diels-Alder na fragmentação do limoneno.



Na figura 27, o espectro de massas corresponde ao constituinte identificado como Linalol e os seus respectivos fragmentos.

Figura 27: (I) Espectro de massa do Linalol (pico 6). (II) Espectro de massa da espectroteca WILEY229

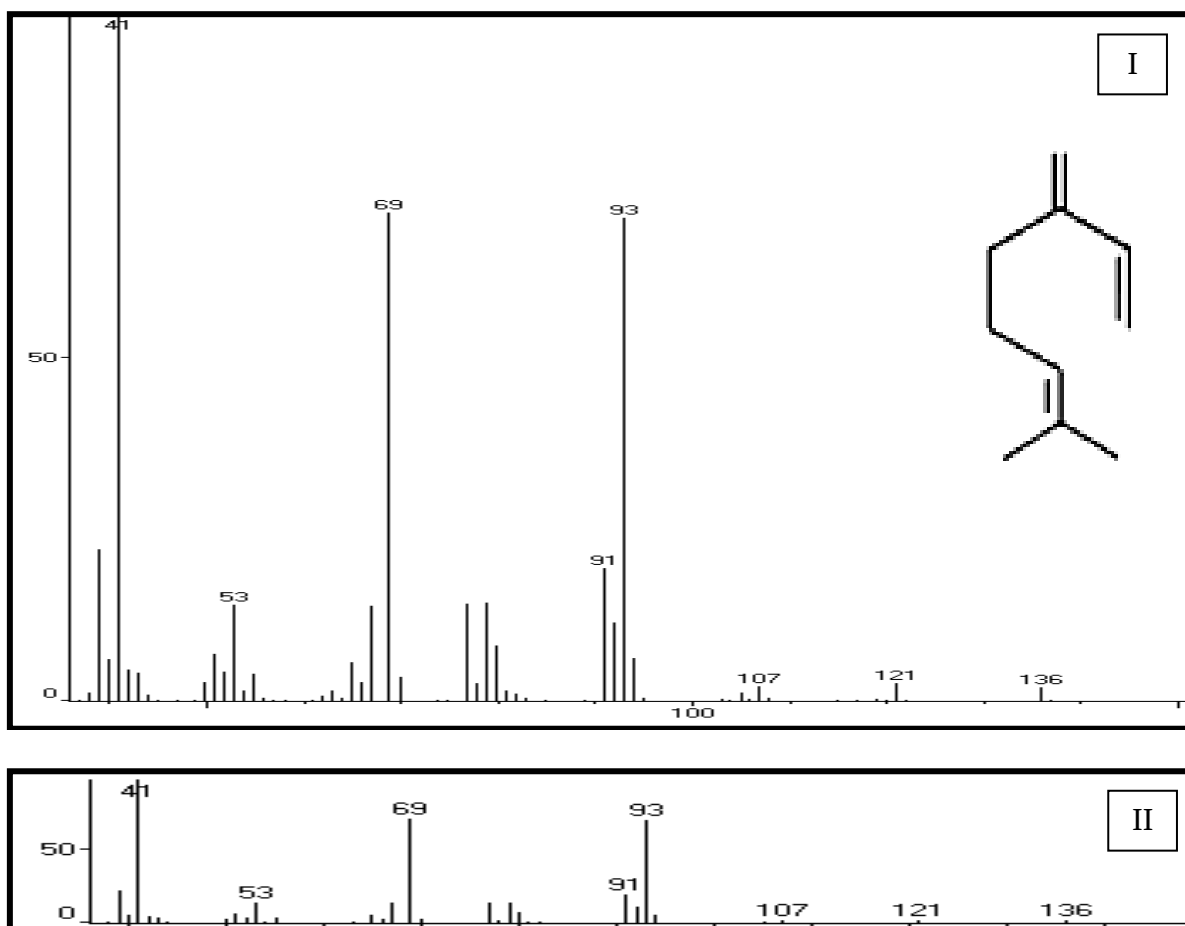


Os espectros de massas referentes à Figura 27, indicam de acordo com banco de dados da espectroteca WILEY 229 e de padrões constantes na literatura (ADAMS, 2007) a presença no óleo essencial do composto Linalol (pico 6) da Figura 24, com pico do íon molecular $m/z=154$ é de difícil visualização característico de alcoóis terciários, confirmado como $C_{10}H_{18}O$ a sua fórmula molecular, de baixa intensidade. Os picos $m/z=136$ [M-18] e $m/z=121$ [M-18-15] são característicos da perda de água e do grupo metila, respectivamente.

Para alcoóis terciários, ocorre frequentemente a quebra de ligação C-C vizinha do átomo de oxigênio, com eliminação do maior grupo, o que fica evidenciado no pico de $m/z=71$ ($H_2C=CHCOH^+-CH_3$) e pelo pico de $m/z=83$. O pico com $m/z=93$ é devido à eliminação de água [M-18] e do grupo $C_3H_8^+$ [M-44] (SILVERSTEIN, 2007).

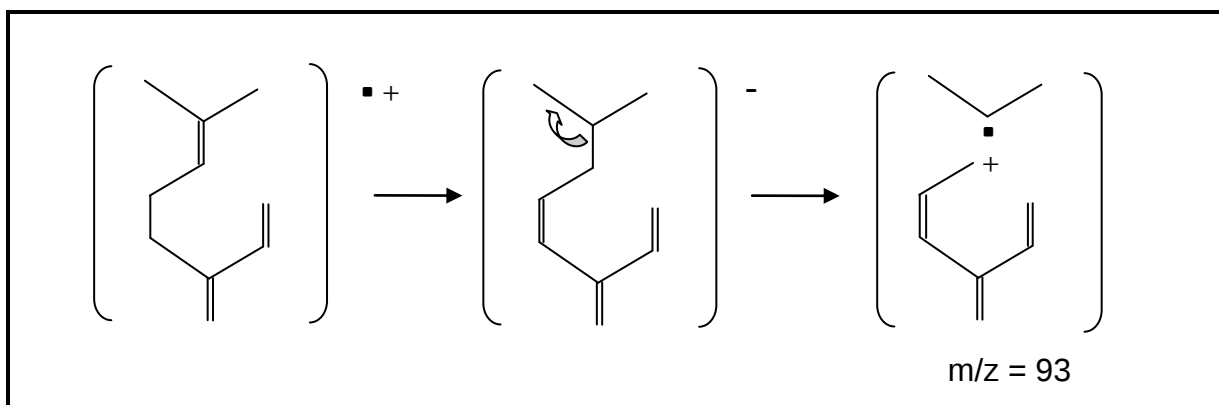
A seguir na Figura 28, refere-se ao pico 2 (Figura24), foi identificado segundo a espectroteca WILEY 229 e a literatura (ADAMS, 2007), como sendo o β -mirceno.

Figura 28: (I) Espectro de massa do β -Mirceno (pico 2). (II) Espectro de massa da espectroteca WILEY229.



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 (Figura 29). Os picos correspondentes a $m/z = 41$, $m/z = 69$, são respectivamente pertencentes fórmulas $C_3H_5^+$ e $C_5H_9^+$ deve envolver rearranjos, (SILVERSTEIN *et al*, 2007).

Figura 29: Clivagem alílica



Fonte: Silverstein *et al*, (2007)

Partindo do princípio, quanto às análises do óleo essencial de *Citrus sinensis* L.Osbeck, obtido por CG-EM (Tabela 3), o constituinte majoritário foi identificado como sendo o d-Limoneno. Na Tabela 4, é mostrado alguns dados reportados na literatura para este constituinte em coletas realizadas em várias partes do mundo, especificamente para a referida espécie estudada.

Tabela 4: Constituintes químicos majoritários reportados na literatura, para óleos essenciais extraídos das cascas da laranja doce coletas em várias partes do mundo.

Composto Majoritário	OECSLO (laranja doce:var: pêra)	Referência	Local/Coleta
d-Limoneno (%)	91,80	Song <i>et al.</i> , 2006	Coréia
	95,60	Dharmawan <i>et al</i> ,2007	Indonésia
	84,20	Sharma <i>et al.</i> , 2008	Índia
	94,70	Minh Tu <i>et al.</i> ,2002	Vietnã
	68,51	Cheng e Chou, 1984	Taiwan
	76,2 - 86,10	Claúdio Júnior, 2009	Brasil
	89,55	Autor, 2013	Brasil (SLZ-MA)

Fonte: Autor (2012)

Na presente pesquisa o OECSLO apresentou 89,55% (Tabela 4). Para fins de comparações foi adotado como critérios a Farmacopéia Européia/ISO (Revista de Fitoterapia, 2011), as quais estabelecem valores para o d-Limoneno (92 a 97%) e (93 a 96%), respectivamente. Em seu trabalho Cláudio Júnior (2009), os valores encontrados variaram entre 76,20 a 86,10%. Mediante aos resultados apresentados, mostra que o perfil químico do OECSLO estudado, encontra-se abaixo dos valores estabelecidos pela Farmacopéia Européia/ISO, no entanto, apresenta-se um pouco acima do intervalo citado pelo autor.

Amostras coletadas para a mesma espécie em diferentes partes do mundo para o OECS (Tabela 4), tais como: Taiwan o óleo apresentou 68,51% (CHENG e CHOU, 1984), Vietnã 94,70% (MINH TU *et al.*, 2002), Coréia 91,80% (SONG *et al.*, 2006), Indonésia 95,60% (DHARMAWAN *et al.*, 2007) e na Índia 84,20% (SHARMA *et al.*, 2008), observa-se que há uma variação quantos aos valores. Em contrapartida, em uma amostra coletada no Quênia (NJORGE *et al.*, 2005), o composto majoritário para a mesma espécie do óleo das cascas da laranja doce foram o α -pineno, α -terpineno e β -pineno e sabineno. Numa outra coleta realizada no Vietnã, o sabineno, foi constituído como composto majoritário (MINH TU *et al.*, 2002).

Observa-se, que há uma discrepância quanto aos valores encontrados na literatura, que em muitas das vezes os presentes compostos apresentam-se em forma de traços. Dessa forma, fatores que afetam a extração (item 2.1.3), a produção natural dos óleos voláteis e a sua composição nas plantas a composição química do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo, geralmente, específica para um determinado órgão e característica para o seu desenvolvimento (SIMÕES *et al.*, 2007), contudo, as condições ambientais são capazes de causar variações significativas (SILVESTRI *et al.*, 2010).

Para o linalol, que no presente estudo foi constituído como o segundo composto em termos de percentagem (3,85%). Segundo a Farmacopeia Europeia o percentual do referido constituinte varia entre (0,02 a 0,7%), para a norma ISO varia entre (0,15 a 0,70), em estudo realizado por Cláudio Júnior (2009), obteve-se 2,4%. Numa amostra realizada nos EUA do respectivo óleo, apresentou 12,8% (GAFFNEY *et al.*, 1996), valor este considerado bem expressivo para o óleo estudado. No presente estudo, o β -Mirceno apresentou (1,90%), apresentado como o terceiro constituinte em porcentagem. Pela Farmacopéia Européia o percentual do

constituente varia entre (1,7 a 2,5%), para a norma ISO varia entre (1,5 a 3,5%), e por Cláudio Júnior (2009), obteve-se 5,7%.

De acordo com os dados da composição química para o óleo essencial extraído das cascas da laranja doce reportados na literatura, o d-limoneno foi evidenciado como composto majoritário, especificamente em amostras coletadas no Brasil. Por outro lado, para outras partes da planta revelaram que os componentes majoritários variaram de acordo com a região de coleta, sendo que o d-Limoneno está presente em maior proporção nas cascas (CLÁUDIO JÚNIOR, 2009).

5.6 Atividade Larvicida

A atividade larvicida do óleo essencial extraído das cascas da espécie *Citrus sinensis* L. Osbeck, foi testada em seis concentrações diferentes: 70, 90, 100, 120, 130, e 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo n é o número de larvas do mosquito *Aedes aegypti* utilizadas no ensaio larvicida para cada concentração (totalizando 10 larvas por teste). 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 seis concentrações testadas.

Tabela 5: Mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição em várias concentrações do óleo essencial extraído da casca da laranja doce var: pêra.

Dose ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Log Dose	Mortos	Vivos	Acumulados Mortos	Acumulados Vivos	Mortalidade (%)
150	2,1760	10	00	36	00	100
130	2,1139	08	02	26	02	80
120	2,0791	07	03	18	05	70
100	2,0000	05	05	11	10	50
90	1,9542	04	06	06	16	40
70	1,8450	02	08	02	24	20

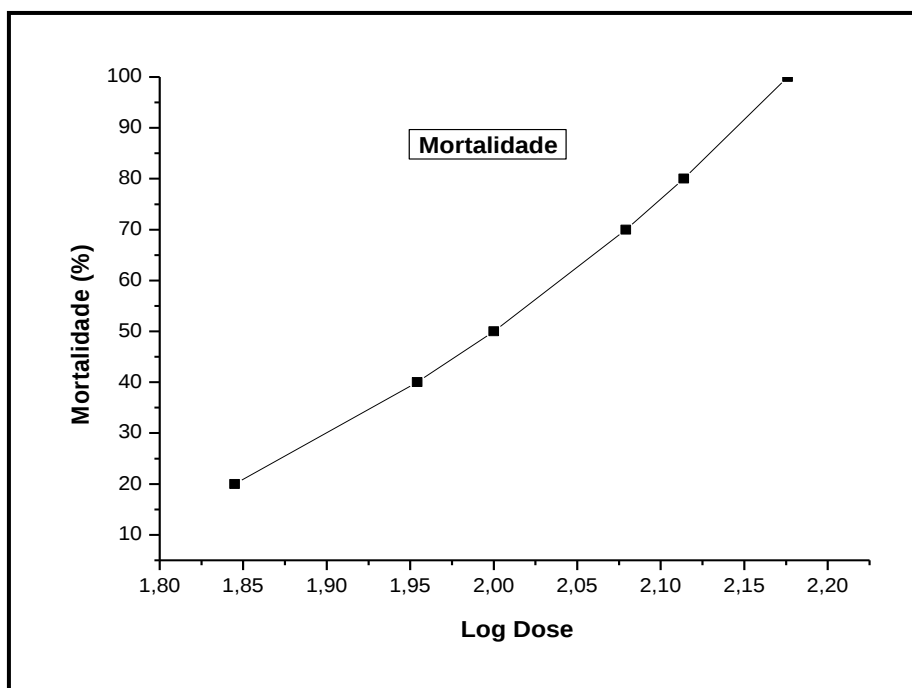
Número de larvas ($n = 10$).

De acordo com a tabela a partir da concentração $70 \mu\text{g.mL}^{-1}$ o óleo passa a provocar a morte das larvas apresentando a morte de apenas 20% das larvas, ou seja, matando em média duas larvas.

Na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ o óleo apresentou uma mortalidade de 50% (concentração em que se encontra a CL_{50}), enquanto que na concentração de $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ o mesmo mostrou-se totalmente letal às larvas, onde há mortalidade de 100% indivíduos testados, ou seja, dez larvas.

A taxa de percentagem da mortalidade das larvas frente o óleo é mostrada na Figura 30, em que o óleo apresenta crescimento exponencial significativo Log dose 2,0791.

Figura 30: Taxa de Mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* expostas a seis concentrações diferentes do óleo essencial de *Citrus sinensis* L. Osbeck, após 24 horas versus o logaritmo de cada dose aplicada.



Os resultados apresentados a seguir, representam as curvas de Indivíduos Acumulados mortos (Figura 31) e Acumulados vivos (Figura 32), para o OECSLO.

Figura 31: Acumulados mortos óleo essencial *Citrus sinensis* L. Osbeck pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas em função do logaritmo decimal da dose aplicada.

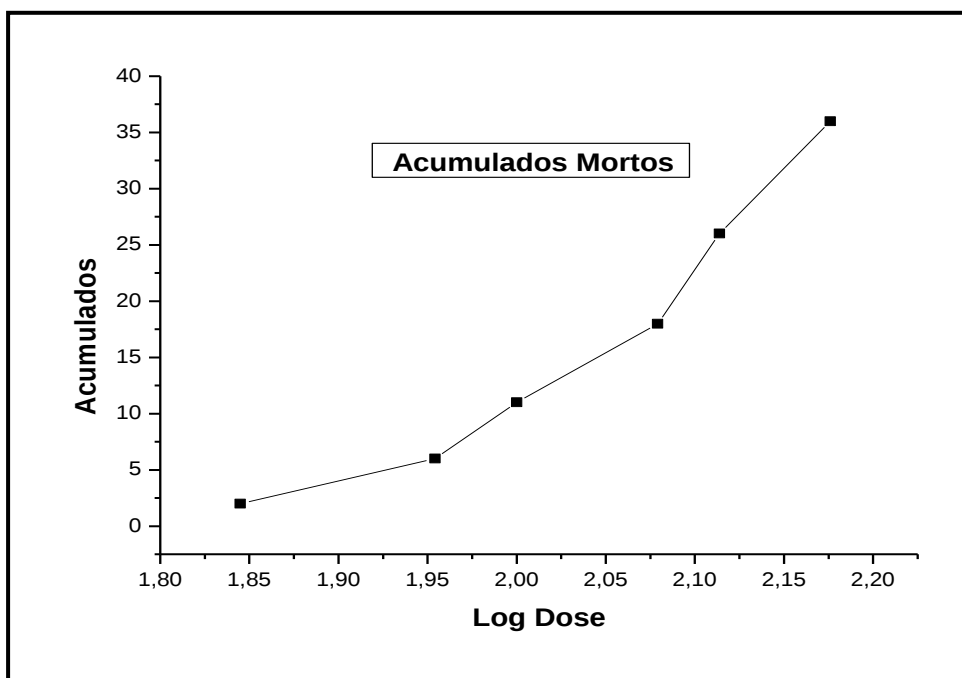
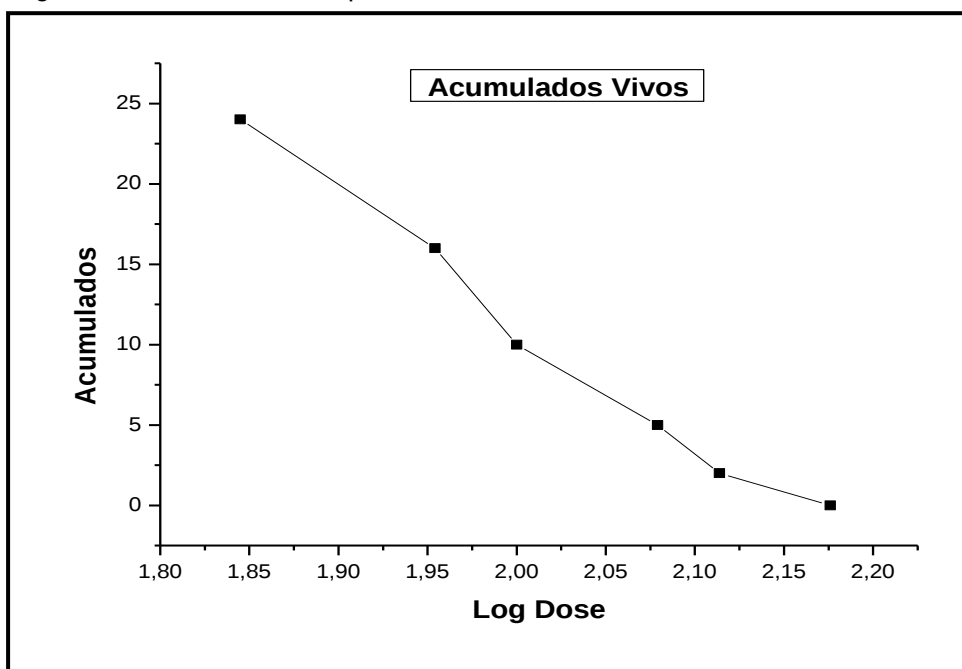
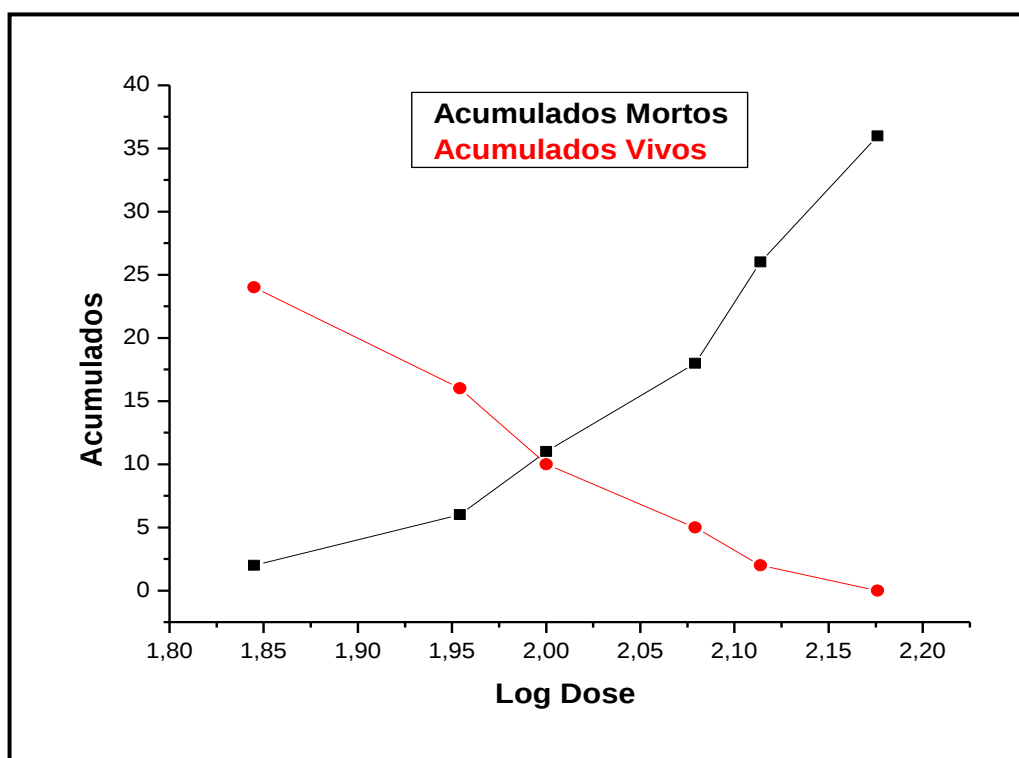


Figura 32: Acumulados vivos do óleo essencial *Citrus sinensis* L. Osbeck pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada.



Na Figura 33, é apresentada a Concentração Letal 50%(CL₅₀) para o óleo essencial de *Citrus sinensis* L. Osbeck.

Figura 33: Estimativa da CL₅₀ do óleo essencial de *Citrus sinensis* L.Osbeck, 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.



Adotando-se os mesmos procedimentos realizados para o óleo essencial de *Citrus sinensis* L. Osbeck, foi realizado para o d-Limoneno, em sete concentrações: 70, 90, 100, 120, 130, 150 e 160 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ (Tabela 6).

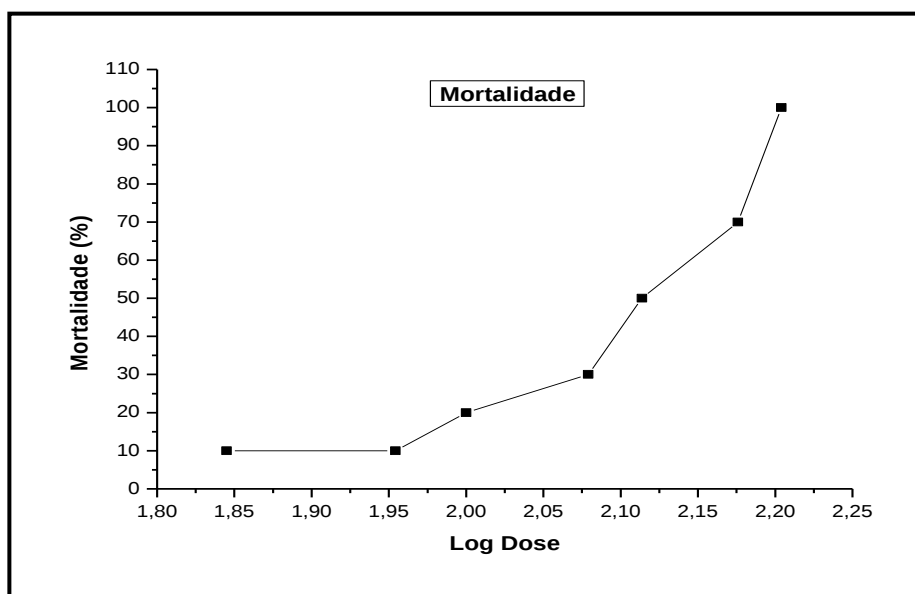
Tabela 6: Mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição em várias concentrações do Padrão d-Limoneno.

Dose ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Log Dose	Mortos	Vivos	Acumulados Mortos	Acumulados Vivos	Mortalidade (%)
160	2,2040	10	00	29	00	100
150	2,1760	07	03	19	03	70
130	2,1139	05	05	12	08	50
120	2,0791	03	07	07	15	30
100	2,0000	02	08	04	23	20
90	1,9542	01	09	02	32	10
70	1,8450	01	09	01	41	10

Número de larvas ($n = 10$)

A taxa de percentagem da mortalidade das larvas frente o padrão de d-Limoneno é mostrada na Figura 34, observa-se o crescimento exponencial a partir do Log dose 2,1139.

Figura 34: Taxa de Mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* expostas a sete concentrações diferentes do padrão d-Limoneno, após 24 horas versus o logaritmo de cada dose aplicada.



Nas Figuras 35 e 36, são apresentados os Acumulados mortos e Acumulados vivos, respectivamente para o padrão d-Limoneno.

Figura 35: Acumulados mortos para o padrão d-Limoneno pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas em função do logaritmo decimal da dose aplicada.

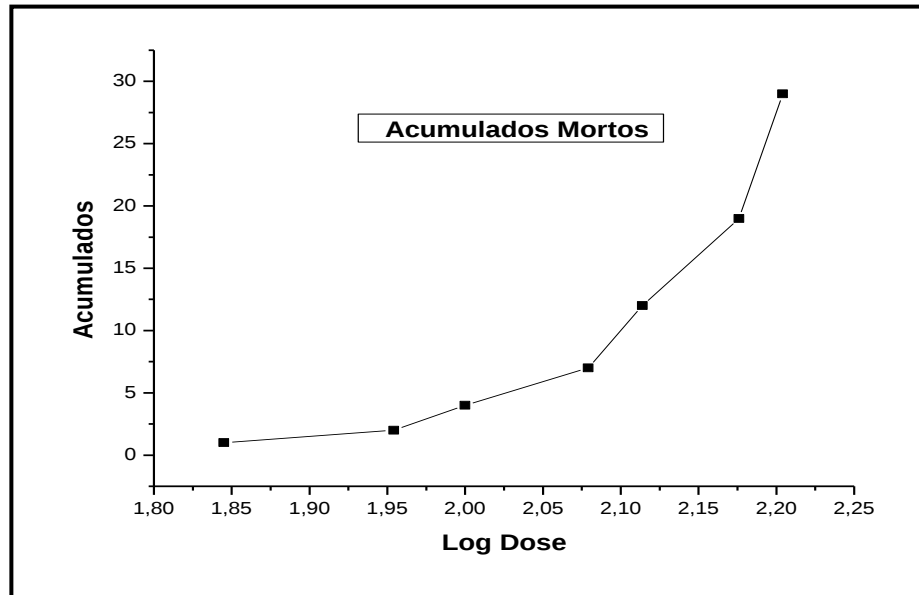
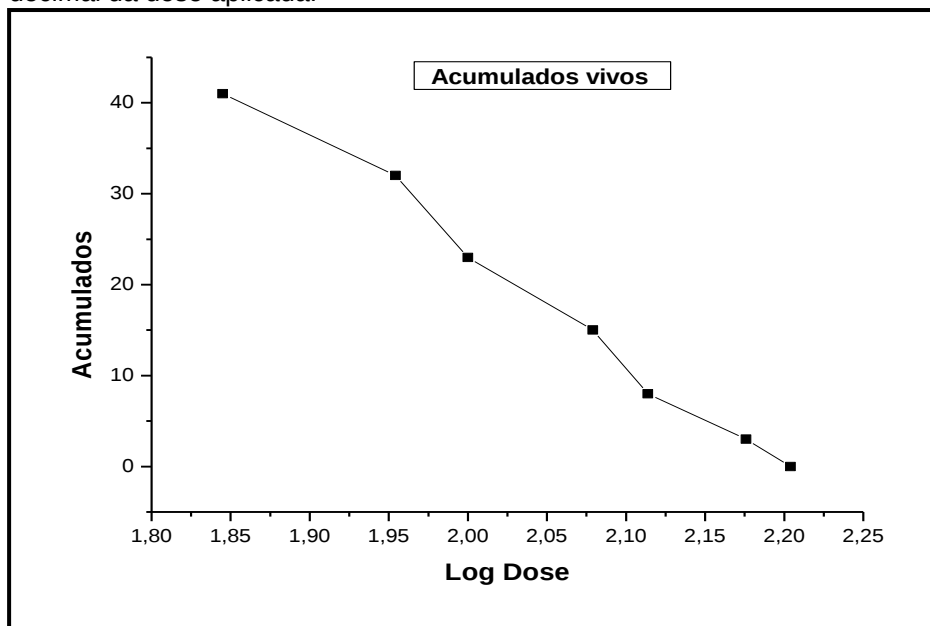
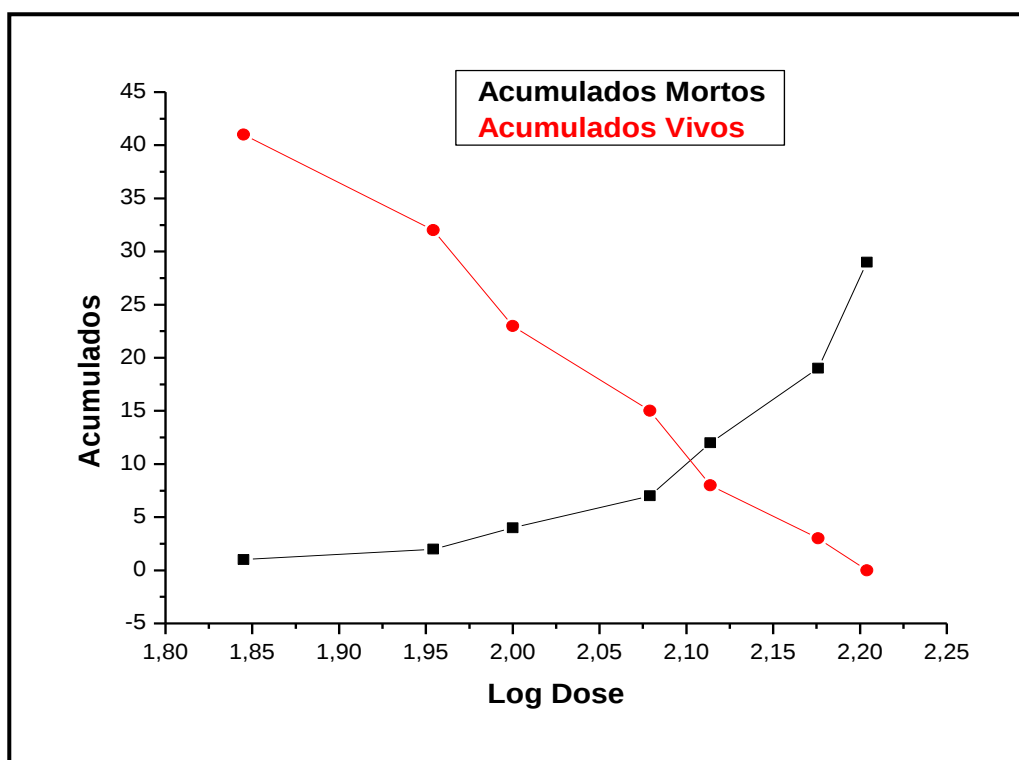


Figura 36: Acumulados vivos do padrão d-Limoneno pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada.



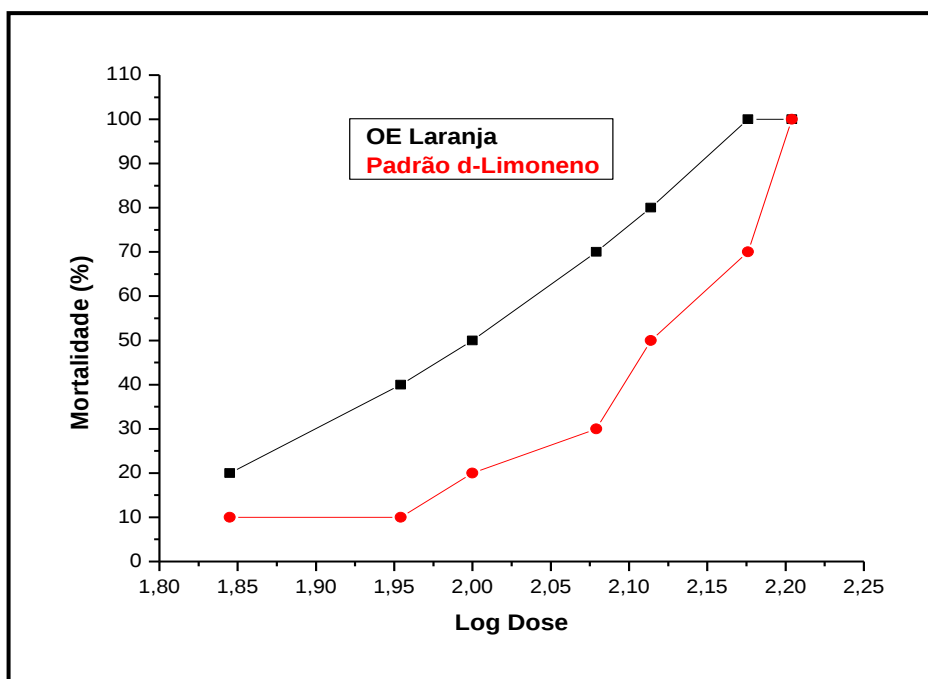
Na Figura 37, é apresentada a Concentração Letal 50%(CL₅₀) para o padrão d-limoneno, a concentração na qual cinquenta por cento das larvas testadas morrem, a qual foi encontrada bem próxima a Log dose 2,1023(próximo da concentração de 130 µg.mL⁻¹).

Figura 37: Estimativa da CL₅₀ do Padrão d-Limoneno, pelo método Reed-Muench a partir doacumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL₅₀ é o ponto de intersecção das duas curvas.



Fazendo-se uma comparação entre as mortalidades das larvas em função dos logaritmos das doses do óleo essencial de *Citrus sinensis* L.Osbeck e do padrão de d-Limoneno (Figura 38), o OECSLO foi testado em seis concentrações, apresentando maior eficácia larvídica na concentração de 150 µg.mL⁻¹ (100% de larvas mortas), enquanto em que seu padrão testado, foi superior em uma concentração em relação a do óleo, ou seja em sete concentrações, apresentou 100% de mortalidade das larvas a uma concentração de 160 µg.mL.⁻¹

Figura 38: Comparação entre as Taxas de Mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* proporcionadas pelo óleo essencial de *Citrus sinensis* L. Osbeck versus padrão d-Limoneno.



A CL 50% para o óleo essencial das cascas de *Citrus sinensis* L. Osbeck foi calculada através da intersecção das curvas de indivíduos acumulados mortos e indivíduos acumulados vivos (Figura 33), obtendo resultado a concentração de $99,014 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com um intervalo de confiança de $2,098 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ou seja, $\text{CL}_{50} = 99,014 (\pm 2,098) \mu\text{g.mL}^{-1}$. Da mesma forma como foi realizado para o óleo, foi calculado através da intersecção das curvas de indivíduos acumulados mortos e indivíduos acumulados vivos para o padrão d-Limoneno (Figura 37), obteve-se CL_{50} de 126,037 com intervalo de confiança $2,092 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ou seja, $\text{CL}_{50} = 126,037 (\pm 2,092)$.

Desta forma a CL_{50} obtida, qualifica o óleo essencial como um agente larvicida moderado (CHENG, *et. al.*, 2003), enquanto que o seu padrão d-Limoneno exibiu eficácia larvicida bem acima dos valores recomendados, estando fora das especificações, pois segundo o autor é considerado bons agentes larvicidas as substâncias com valor de CL_{50} inferior a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Segundo Lahlou (2004), a atividade biológica de óleos essenciais está diretamente relacionada com sua composição química. Essa relação de composição e atividade, muitas vezes sugere que a atividade biológica de um óleo pode ser atribuída tanto a seus componentes majoritários, quanto a componentes presentes

em menor concentração. É possível que eles ajam em conjunto sinergicamente, contribuindo para toxicidade total do óleo testado.

Em um estudo da ação larvicida de óleos contendo limoneno, linalol e eugenol frente ao mosquito *Aedes aegypti*, Furtado et al. (2005), confirmaram atividade larvicida para esses compostos e segundo os autores os óleos apresentaram melhores atividades que os padrões testados isoladamente, como ocorreu nesta pesquisa. Estudos contra o *Aedes aegypti* evidenciam 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; KARR e COTAS, 1998, LIMA, 2009, LEITE, 2009).

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

Como já relatado neste estudo, a melhor forma de combater a doença é erradicar o mosquito através do uso de larvicidas em seus locais de reprodução, por exemplo, o temefós que vem sendo utilizado pelos órgãos competentes. Entretanto, os mosquitos já estão adquirindo resistências aos inseticidas sintéticos, considerando que os óleos essenciais de muitas plantas são por natureza tóxicas para os mosquitos, e menos agressores ao meio ambiente.

De acordo com Rattan (2010), os óleos essenciais e seus constituintes afetam os processos bioquímicos, que especificamente perturbam o equilíbrio endócrino dos insetos. Eles podem ser neurotóxicos ou podem atuar como reguladores de crescimento de inseto, interrompendo o processo normal de morfogênese. Esse modo de ação neurotóxica possui os seguintes sintomas em artrópodes: hiperatividade seguido por hiperexcitação levando rapidamente à queda e imobilização.

Diante dos resultados alcançados e da necessidade cada vez maior de novas substâncias capazes de combater o desenvolvimento de mosquitos causadores de doenças, e que ao mesmo tempo ofereçam maior segurança para os seres humanos e ao ambiente, seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica e baixo impacto ambiental, o óleo essencial de *Citrus sinensis* L.Osbeck, apresenta-se como um promissor agente larvicida natural em locais de crescimento de larvas do *Aedes aegypti*.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os resultados nos levaram a concluir, que foi possível caracterizar analiticamente o óleo essencial do *Citrus sinensis* L.Osbeck (laranja doce) e ainda:

- ✓ O presente estudo demonstrou que a espécie *Citrus sinensis* L. Osbeck, forneceu um óleo essencial cujo rendimento foi de 2,47% (m/m), o qual foi considerado de bom valor em relação à extração por hidrodestilação de outros óleos de plantas aromáticas;
- ✓ Quanto à qualidade, os parâmetros físico-químicos avaliados apresentaram resultados satisfatórios;
- ✓ A caracterização por CG-EM permitiu a identificação de quinze constituintes presentes no óleo essencial, o qual mostrou-se eficaz quanto a metodologia adotada, além de identificar o d-Limoneno, como componente majoritário, justificando-se com os dados reportados na literatura;
- ✓ A espectroscopia na região do infravermelho veio comprovar os resultados obtidos por CG-EM, mostrando o componente majoritário do óleo em estudo quando comparados ao seu respectivo padrão, no que diz respeito às suas absorbâncias e seus deslocamentos químicos;
- ✓ Os resultados apresentados sugerem que o óleo essencial de *Citrus sinensis* L.Osbeck, apresenta eficácia larvícida moderada, frente ao *Aedes aegypti*, com uma CL_{50} de 99,014 ($\pm 2,098$) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e padrão d-Limoneno CL_{50} de 126,037 ($\pm 2,092$);
- ✓ O óleo essencial das cascas da laranja doce, apresenta-se como uma alternativa natural no combate às larvas do *Aedes aegypti*.

REFERENCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4th ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007.

ALDRICH. **Handbook of fine chemicals and laboratory equipment**. Brasil. p.1475. 2006.

AMARO, A. A. **Citricultura Informações econômicas**, São Paulo, v.29, n.12, dez. 1999.

ANVISA (2007). **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 5**, de 15 de janeiro de 2007. Disponível em: <www.anvisa.gov.br,>. Acesso em 07 de jan. 2013.

ANWAR, NASEER R., Bhanger M I., Ashraf S., Naz T. F., Aladedunye F. **Physico-Chemical Characteristics of Citrus Seeds and Seed Oils from Pakistan**. *J Am Oil Chem So*, v. 85, p. 321–330, 2008.

BAKKALI, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. 2008 Biological effects of essential oils – **A review**. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 446–475, 2008.

BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**. Vitória: Edufes, 2008. 624p.

BARBOSA, L. N. ; Rall, V. L. M.; Fernandes, A. A. H.; Ushimaru, P. I.; Probst, S.; Fernandes Júnior, A. **Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat**. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 6, n. 6, p. 725-728, 2009.

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.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. **Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas**. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

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.

BRAGA, I. A. *et al.*, **Aedes aegypti**, resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, p.199-203, 2004.

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

BRASIL. **Caderno Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.18, n. 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.

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

BRUNETON, J. **Pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales**. 2.ed. Paris: Lavoisier, 1993.

BUTTNER, M.; WILLEKE, K.; GRINSHUP, S Sampling and analysis of airbornemicroorganisms. In: Hurst C.J. *et al.* **Manual of Environmental Microbiology**. Washington: ASM Press, p. 629–640, 1996.

CARMO, E. S.; Lima, E.O.; Souza, E. L.**The potential of *origanum vulgare* L. (lamiaceae) essential oil in inhibitingthe growth of some foodrelatedaspergillus species**. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, 362-367, 2008.

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: nov. 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**, v. 89, p.99-102, 2003.

CHENG, Y.; CHOU, C. **Composition of peel essential oils from eight citrus species**. **Journal of the Chinese Chemical Society, Taiwan**, v. 31, n. 1, p. 93-6, 1984.

CHIARAVALLLOTI-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. **Algumas questões decorrentes da reintrodução do *Aedes aegypti* no Brasil**. **Cadernos de Saúde Pública**, v.1, p. 193-199, 1985.

CITRUS LIMONÓIDES, FLAVONOIDS, AND COUMARINS. **J. agric. chem**, v. 53: p. 2009-2014, 2005.

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

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

COSTA, J. G. M.; *et al.* **Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de Hyptis martiusii, Lippia sidoides e Syzigium aromaticum frente às larvas do Aedes aegypti**. Revista Brasileira de Farmacognosia/Brazilian Journal of Pharmacognosy, v.15, n.4, 304-309, 2005.

COWAN, M. M. **Plant Products as Antimicrobial Agents**. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n. 4, p. 564- 582, 1999.

CRAVEIRO, A. *et al.* **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza,1981.

CUNHA S. *et al.* **Cultivo dos Citros**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMF,1996. 43p.

DE ARAÚJO, E.; DE QUEIROZ, L.; MACHADO, M .**What is citrus taxonomic implications from a study of cp-dna evolution in the tribe citreae (rutaceae subfamily aurantioideae)**. *Organisms diversity and evolution*, v. 3, p. 55-62, 2003.

DHARMAWAN, J.; KASAPIS, S.; CURRAN, P. **Characterization of volatile compounds in selected citrus fruits from Asia - part II: peel oil**. **Journal of Essential Oil Research, Carol Stream**, v.20, n. 1, p.21-24, 2007.

DÍAZ, L.H.; JORGE, M.R. **Actividad antimicrobiana de plantas que crescem em Cuba**. *Rev. Cubana Plant Me.*, v.2, p.44-47, 2001.

DISTASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**, São Paulo: Editora da UNESP, 1996. 230p.

EDRIS, A. E. **Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review**. **Phytotherapy Research**, 2007.

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.

FAID, M, *et al.*, **Physicochemical and microbiological characterizations and preservation with ascorbic acid and cinnamon**. **journal of food products**, v. 58, p. 547-550, 1995.

FARMACOPEIA BRASILEIRA IV – PARTE 1. 5. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1.320p, 2010.

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, UFPB, Paraíba, 2011.

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

FRANZ, C. M. **Essential oil research: past, present and future.** *Flavour Fragrance Journal*, v. 25, p. 112-113, 2010.

FUNASA. **Direção do Centro Nacional de Epidemiologia. Plano de intensificação das ações de prevenção e controle da Febre Amarela.** Brasília, jul. 2002.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. IMAGENS FÊMEA DO *Aedes aegypti*. Disponível em: < <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/galeria/galeria.html> > Acesso em: 15 mar. 2012.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. IMAGENS LARVAS DO *Aedes aegypti*. Disponível em: < <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/oportunista.html> >. Acesso em: 15 mar. 2012.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. IMAGENS OVO DO *Aedes aegypti*. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/galeria/galeria.html>>. Acesso em: 15 mar. 2012.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. IMAGENS PUPA DO *Aedes aegypti*. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/rededengue/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=32&sid=12> >. Acesso em: 15 mar. 2012.

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

FURTADO, RF.; Lima, MG.; Andrade Neto, M.; Bezerra, JN.; Silva, M.G **Atividade Larvívica de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae).** *Neotropical Entomology*, v. 34, n. 5, p. 843-847, 2005.

GAFFNEY, B. *et al.* **Charm analysis of two *Citrus sinensis* peel oil volatiles.** *Perfumer and Flavorist*, Wheaton, v.21, n. 4, p. 1-2, 4-5, 1996.

GERSHENZON, J. & DUDAREVA, N. **The function of terpene natural products in the natural world.** *Nature chemical biology*, v.3, n.7, p.408-414, 2007.

GOUNARIS, Y. **Biotechnonology for the production of essential oil, flavous and volatile isolates**. A review. Flavor fragrance Journal. V.25. p.367-386, 2010.

HARTMANN, T. **From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism**. Phytochemistry, v.68, p.2831-2846, 2007.

HARRINGTON, L.C.; EDMAN, J. D.; SCOTT, T. W. Why Do **Female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Feed Preferentially and Frequently on Human Blood** *Entomological Society of America*, Vol. 28(3): 411-422, 2001.

HUSSAIN, A.I.; ANWAR, F.; SHERAZI, S.T.H. & PRZYBYLSKI, R. **Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations**. Food chemistry, v.108, p.986-995, 2008.

INOUE, Y.; SGIRAISHI, A.; HADA, T.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H. & SHIMADA, J. **The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action**. FEMS microbiology letters, v.237, p.325-331, 2004.

INSTITUTO ADOLF LUTZ, Capítulo XVI - Óleos e Gorduras, 629 p.2008. Disponível em:< www.lal.gov.sp.gov.br>. Acesso em Nov. 2011.

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

LAHLOU, M. **Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action**. Journal Flavour and fragrance, v.19, p.159-165, 2004.

LAGO J.H.G., FÁVERO O.A., ROMOFF P. **Microclimatic factors and phenology influences on the chemical compositions of the essential oils from *Pittosporum undulatum* Vent. leaves**. Journal of The Brazilian Chemical Society, v.17, p.1334-1338, 2006.

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.

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

LIMA, J.B. et al., **Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalites in states of Rio de Janeiro and Espirito Santo, Brazil**. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 68: 329-333, 2003.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C. **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.

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.

MARINHO, S. C.; **Estudo químico, avaliação eletroquímica e atividade larvicida do óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* Lindl frente ao *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).** Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2010. Tese de Doutorado, 123 p.

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.

MATOS JR, DIRCEU *et al*, **Citros: principais informações e recomendações de cultivo**, versão eletrônica do Boletim Técnico 200 (IAC), 2005.

MEDEIROS, I.A. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.4, p. 842-846, out./dez. 2009.

MINH TU, N. *et al*. **Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils.** Flavour and Fragrance Journal, v. 17, n. 3, p. 169-174, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue: Situação epidemiológica.** Disponível em: <[http:// portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/index.cfmportal. boletim](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://ambienteacreano.pot.com/2009/03/diferencas-entre-o-pernilongo-comum-e-o.html> Acesso em: abr. 2011.

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

MÜLLER, O. S, **Microencapsulação do óleo essencial de laranja**,Dissertação de Mestrado,Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.Universidade Federal do Paraná-UFPR,2011, 99p.

MURRELL, S.; WU, S. C.; BUTLER, M. **Review of dengue virus and the development of a vaccine**. Biotechnology Advances, v.29, p. 239-247, 2011.

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, v.98, p. 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. 1995.

NJOROGE, S. *et al.* **Essential oil constituents of three varieties of Kenyan sweet oranges (*Citrus sinensis*)**. Flavour and Fragrance Journal., Chischester, v. 20, n. 1, p. 80-85, 2005.

NUNES, PM , **Estudo fitoquímico e atividades biológicas do óleo da semente de *Citrus sinensis* L. Osbeck e sua aplicação na área cosmética** ,99p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.Universidade Federal do Paraná-UFPR,2011

OMS/OPAS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE/ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. Disponível em:<https://new.paho.org/bra/index.php?option=com_content&task=view&id=3168&Itemid=1>. Acesso em jul. 2013.

ORGANIZAÇÃO DE MUNDIAL DE SAÚDE/ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE/OMS/OPAS,2013.Disponível em:<https://new.paho.org/bra/index.php?option=com_content&task=view&id=3168&Itemid=1> Acesso em: fev.2012.

OTHA, Y.; HIROSE, Y, **Constituents of cold-pressed oil of *citrus natsudaidai* hayata**. agric. biol. chem., v. 30: p. 1196-1201, 1966.

OWEN, S.M. & PEÑUELAS, J. **Opportunistic emissions of volatile isoprenoids**. Trends in plant science, v.10, n.9, p.420-426, 2005.

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.

PELLATI, F.; BENVENUTI, S.; MELEGARI, M. **Enantioselective LC analysis of synephrine in natural products on a protein-based chiral stationary phase.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.37, p.839-849.2005.

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

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L.G. L.; SALGADO, A. P. S. P. **Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre crescimento de *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli*.** Ciênc. agrotec., Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, 2008.

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,
<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/9530/162/dengue:-liraa-indica-487-municipios-em-alerta.html>, acesso julho, 2013.

PREFEITURA UNICAMP. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Disponível em:<http://www.cecom.unicamp.br/dengue/index.php?option=com_content&view=article&id=47&Itemid=54>. Acesso em 15 mar. de 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.

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

RATTAN, R. S. **Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin.** Crop Protection, v. 29, p. 913-920, 2010.

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

REVISTA DE FITOTERAPIA, **Requisitos de Qualidade em Óleos Essenciais: A importância das monografias da Farmacopeia Europeia e das normas ISO**, p.42, 2011.

RFI (Request for information)-Português...dados estatísticos: site de notícias. Disponível em:< <http://www.portugues.rfi.fr/geral/20130410-casos-de-dengue-no-mundo-sao-o-triplo-do-estimado-pela-oms-diz-novo-estudo>(acesso:05/07/13)> Acesso em: 5 jul. 2013.

SÁ, C.G, **Extração e testes de atividades farmacológicas do óleo essencial de *Citrus sinensis* L. Osbeck direcionados para a doença de Alzheimer**, 83p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina 2011.

SALIBE A.P, **Fitotecnia artigo técnico sinopse de conhecimentos e pesquisas sobre a laranja 'pêra'**, Cordeirópolis, v.23, n.1, p.231-245, 2002.

SARKER S.D; LATIF, Z.; GRAY, A.I. **Natural Products isolations**. Second edition. Totowa , New Jersey, USA: Human Press. 515p. 2006.

SCHLISCHTING, R. **Polimerização do Estireno na Presença de d-Limoneno: Avaliação das Constantes da Taxa de Propagação e de Transferência de Cadeia**. 2008.75p Tese (Doutorado em Engenharia Química), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFSC, Florianópolis, 2008.

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

SCHMIDT E. **Production of Essential Oils**. In: Baser KHC, Buchbauer G (eds.). **Handbook of Essential Oils, Science, Technology and Applications**. CRC Press, 2010.

SCHWOB, I.; BESSIERE, J.-M.; MASOTTI, V. & VIANO, J. 2004. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. **Biochemical systematics and ecology**, v.32, p.735-745, 2004.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Microbiological Research**, v.163, p. 337-344, 2008.

SILVA, S. L.; Chaar, J. S.; Figueiredo, P. M. S.; Yano, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica**, v.38, n. 1, 107-112, 2008.

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

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER F. X.; KIEMLE D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SILVESTRI, J. D. F.; PAROUL, N.; CZYIEWSKI, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. **Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.)**. Revista Ceres, Viçosa, v. 57, n.5, p. 589-594, 2010.

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 larvícida 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.

SIMÕES, C.M. *et al.* **Farmacognósia: da Planta ao Medicamento**, sexta edição; Porto Alegre. Editora da UFRGS; Florianópolis da UFSC, 2007. 1104p

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. **Óleos essenciais**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. **Farmacognosia. Da planta ao medicamento**, p.387-415, 1999..

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. **Óleos Voláteis**. In: SIMÕES C. M. O *et al.* **Farmacognosiada planta ao medicamento**, 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora daUFRGS/Editora da UFSC, p.468-495, 2004.

SINGH, S; RAJAM, MV **Citrus biotechnology: achievements, limitations and future directions**. Physiol mol biol plants, v.15: p. 3-22, 2009.

SOARES, A. C. **Se bem não fizer, mal também não fará**. Revista Eletrônica de Ciências.n.12,out.2002.Disponívelem:<http://www.cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/art_12/medicamento.html> Acesso em: abr.2012.

SONG, H. *et al.* **Volatile profiles in cold-pressed peel oil from Korean and Japanese Shiranui (*Citrus unshiu* Marcov.) (*C. sinensis* Osbeck) (*C. reticulata* Blanco)**. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, v. 70, n. 3, p. 737-739, 2006.

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

TAUIL, P. L. **Urbanização e ecologia do dengue**. Caderno Saúde Pública, Rio de Janeiro, n. 17(Suplemento), p. 99-102, 2001.

TAYLOR, B. **Fruit and juice processing**. IN: ASHURST, fruites juices. P.R Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruits Juices.Hereford (UK): Blackwell Publishing Ltd, p.35-66, 2005.

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

TELES, R. M. **Estudo analítico do linalol contido no óleo essencial extraído de galhos da espécie *Aniba duckei* Kostermans e sua aplicação como agente**

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

TELLEZ, M.R.; CANEL, C.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O. **Differential accumulation of isoprenoids in glanded and glandless *Artemisia*.** annualPhytochemistry, v.52, p.1035-1040,1999.

WANNES, W. A *et al.* **Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle(*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower.** Food and Chemical Toxicology, v. 48, p. 1362-1370, 2010.

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.

WILLIAMS, D. G. **The chemistry of essencial oils.** England: Micelle Press. 334p., 1996.

YU, J.; WANG, L.; Wazem, RL. Miller, EG.; Pike, LM.; Patil, BS , **Antioxidant activity of *Citrus* limonóides, flavonoids, and coumarins.** j. agric. chem, v. 53: p.2009-2014,2005.