

DIONNEY ANDRADE DE SOUSA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES  
DE CITRUS FRENTE ÀS LARVAS DE *Aedes aegypti*

São Luís, MA

2019

DIONNEY ANDRADE DE SOUSA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES  
DE CITRUS FRENTE ÀS LARVAS DE *Aedes aegypti*

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós- Graduação em Saúde  
e Ambiente da Universidade Federal do  
Maranhão para a obtenção do título de  
Mestre em Saúde e Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho.

Área de concentração: Saúde das Populações.

São Luís, MA

2019

DIONNEY ANDRADE DE SOUSA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES  
DE CITRUS FRENTE ÀS LARVAS DE *Aedes aegypti*

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Saúde e  
Ambiente da Universidade Federal do  
Maranhão para obtenção do título de  
Mestre em Saúde e Ambiente.

Aprovado em: 23/ 07 / 2019

Banca examinadora

---

Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho (Orientador)  
Doutor em Química Analítica  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adenilde Nascimento Mouchrek (Examinadora)  
Doutora em Ciências dos Alimentos  
Universidade Federal Do Maranhão

---

Prof. Dr. Nestor Everton Mendes Filho (Externo)  
Doutor em Química  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Josilene Lima Serra (Externo)  
Doutora em Biotecnologia  
Instituto Federal do Maranhão

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe Maria Vitoria e meus irmãos, Diogo e Dallyerd, que sempre estão ao meu lado, lutando, compartilhando momentos bons e difíceis.

Todos os meus familiares que me apoiam e incentivam nessa jornada.

À Mylena gabryely que está em minha vida há pouco tempo, mas já é de muita importância, sempre me apoia e incentiva nas minhas decisões.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho, orientador que sempre me acompanhou e apoiou na minha vida acadêmica desde o início em todos os conhecimentos e apoio fornecido.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento Mouchrek e ao Prof Dr. João Mouchrek pela amizade, incentivo e pela disposição a sempre ajudar.

Aos Prof. Dr. Nestor Everton Filho, por sempre estar presente com aconselhamentos enriquecedores para vida em todos os aspectos.

Aos meus amigos Rayone, Helene, Paulo, Tereza e Jacenilde, que desenvolvemos uma amizade maravilhosa dentro e fora da universidade.

A turma 14, do mestrado em Saúde e ambiente pelo companheirismo.

Muito obrigado!

## RESUMO

Considerando a importância da descoberta de novas substâncias que apresentem potencial larvicida, esta pesquisa tem por objetivo caracterizar quimicamente o óleo essencial de diferentes espécies de limão (Limão Comum (*Citrus x limon* (L.) Osbeck.), Limão Tanja (*Citrus x sp*) e Limão Galego (*Citrus x aurantifolia* (Christm.) Swingle) e testar a atividade larvicida frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti*, assim, controlar arboviroses como Dengue, Zika, Chikungunya e Febre amarela. O óleo essencial foi extraído pela técnica de arrastamento a vapor em aparelho Clevenger. A caracterização química do óleo essencial foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa (CG-MS), realizando bioensaio de toxicidade frente *Artemia salina* e sua atividade larvicida foi realizada contra as larvas de *Aedes aegypti* através de técnicas preconizadas pelo Ministério da Saúde, baseada na porcentagem de mortalidade larval, avaliada após 24 horas de exposição aos tratamentos. Os resultados para o rendimento de limão comum (2,45%), tanja (2,54%), galego (2,29%) e os valores das propriedades físico-químicas dos óleos estudados comparando com a literatura, pode-se observar que há similaridade entre eles, no que se diz respeito aos parâmetros analisados. As análises cromatográficas mostram que os óleos essenciais apresentam o Limoneno como constituinte majoritário. No bioensaio de toxicidade frente *Artemia salina*, os óleos de limão comum, limão tanja e limão galego apresentaram CL<sub>50</sub> de 1032, 503,5 e 1843 µg.mL<sup>-1</sup> respectivamente, com índice de confiança 95% (p<0,05), o que segundo a literatura, indica que o extrato é “não tóxico”. O óleo essencial de limão Tanja (*Citrus x sp*) apresentou a maior atividade larvicida, com CL<sub>50</sub> de 20,26 µg.mL<sup>-1</sup> e CL<sub>90</sub> de 28,5 µg.mL<sup>-1</sup>, seguido de limão comum (*Citrus x limon*) com CL<sub>50</sub> 40,22 µg.mL<sup>-1</sup> e CL<sub>90</sub> de 68,88 µg.mL<sup>-1</sup>. Por outro lado, o óleo essencial de limão Galego (*Citrus x aurantifolia*) apresentou a menor atividade com CL<sub>50</sub> de 69,71 µg.mL<sup>-1</sup> e CL<sub>90</sub> de 115,3 µg.mL<sup>-1</sup> índice de confiança 95% (p<0,05). Os resultados indicam que os óleos essenciais testados, apresentaram propriedades larvicidas para as larvas de *Aedes aegypti*.

Palavras-chave: Óleos voláteis. *Citrus*. *Aedes aegypti*. Dengue.

## ABSTRACT

Considering the importance of the discovery of new substances that present larvicidal potential, this research aims to characterize chemically the essential oil of different lemon species (Common Lemon (*Citrus x limon* (L.) Osbeck), Limão Tanja (*Citrus x sp*) and Lemon Galego (*Citrus x aurantifolia* (Christm.) Swingle) and test the larvicidal activity against the larvae of the *Aedes aegypti* mosquito, thus controlling arboviruses such as Dengue, Zika, Chikungunya and Yellow Fever. The essential oil was extracted by steam entrainment technique in Clevenger apparatus. The chemical characterization of the essential oil was performed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometer (GC-MS) and its larvicidal activity was performed against *Aedes aegypti* through techniques recommended by the World Health Organization (WHO). The larvicidal activity, based on the percentage of larval mortality, was evaluated after 24 hours of exposure to the treatments. The results for the yield of common lemon (2.45%), tanja (2.54%), Galician (2.29%) and the values of the physicochemical properties of the oils studied compared to the literature, can be observed that there is similarity between them, with respect to the analyzed parameters. Chromatographic analyzes show that essential oils present Limonene as the major constituent. In the bioassay of toxicity to *Artemia salina*, common lemon, tan and lime oils presented LC<sub>50</sub> of 1032, 503.5 and 1843 µg.mL<sup>-1</sup>, respectively, with 95% confidence interval (p <0.05). literature indicates that the extract is "non-toxic". Lemon essential oil Tanja (*Citrus x sp*) showed the highest larvicidal activity, with LC<sub>50</sub> of 20.26 µg.mL<sup>-1</sup> and CL<sub>90</sub> of 28.5 µg.mL<sup>-1</sup> followed by Common Lemon (*Citrus x limon*) with LC<sub>50</sub> 40.22 µg.mL<sup>-1</sup> and CL<sub>90</sub> of 68.88 µg.mL<sup>-1</sup>. On the other hand, the essential oil of Lemon Galego (*Citrus x aurantifolia*) presented the lowest activity with LC<sub>50</sub> of 69.71 µg.mL<sup>-1</sup> and CL<sub>90</sub> of 115.3 µg.mL<sup>-1</sup> with 95% confidence interval (p <0.05). The results indicate that the oils are tested as well as larvicidal properties for *Aedes aegypti* larvae.

Key words: volatile oils. *Citrus Aedes aegypti*. Dengue

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Criadouro natural com larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	15
Figura 2 - Ciclo de desenvolvimento do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	17
Figura 3 - Levantamento Rápido de Índices para o <i>Aedes aegypti</i> (LIRAA).....	18
Figura 4 - Localização da área de coleta das espécies de limão .....	30
Figura 5 - Exsiccatas das espécies de limão .....	31
Figura 6 - Extrator de Clevenger acoplado a balão de fundo redondo .....	32
Figura 7 - Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas .....	34
Figura 8 - Sistema para cultura de <i>Artemia salina</i> Leach.....	35
Figura 9 - Armadilha utilizada para a coleta dos ovos do <i>Aedes aegypti</i> .....	36
Figura 10 - Localização da área de coleta das larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	37
Figura 11 - Rendimentos dos óleos essenciais extraídos das cascas de limão comum, limão tanja e limão galego. ....	40
Figura 12 - Cromatograma do óleo essencial de Limão comum .....	41
Figura 13 - Cromatograma do óleo essencial de Limão tanja .....	43
Figura 14 - Cromatograma do óleo essencial de Limão galego .....	44
Figura 15 - Mortalidade de <i>Artemias salinas</i> com o aumento da concentração dos óleos essenciais. ....	46
Figura 16 - Mortalidade de larvas frente as concentrações de óleo das espécies de limão.....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nomes comuns, científicos e números de depósito das espécies de limão em estudo.....	39
Tabela 2 - Resultados das análises físico-químicas dos óleos .....	40
Tabela 3 - Constituintes identificados no óleo essencial de limão comum .....	42
Tabela 4 - Constituintes identificados no óleo essencial de limão tanja .....	43
Tabela 5 - Constituintes identificados no óleo essencial de limão galego .....	44
Tabela 7 - Resultado da CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> para cada espécie de limão .....	49
Tabela 8 - Percentuais dos compostos em comum entre as espécies e suas respectivas CL <sub>50</sub> .....	50



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B.L.U - Base Livre de Umidade

CG-EM - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

CL- Concentração letal

CuSO<sub>4</sub> - Sulfato de cobre

DMSO - Dimetilsulfóxido

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Agropecuária

ISO -International Standard Organization

IOC - Instituto Oswaldo Cruz

LIRAA - Levantamento Rápido de Índices de Infestação pelo *Aedes aegypti*

MS – Ministério da Saúde

OMS - Organização Mundial de Saúde

SGB - Síndrome de Guillain-Barré

UFMA - Universidade Federal do Maranhão

USP - Universidade de São Paulo

WHO - World Health Organization

WHOPES - World Health Organization Pesticed Evaluation Scheme

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. OBJETO .....	14
2.1. Objetivo Geral.....	14
2.2. Objetivos Específicos .....	14
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
3.1. Mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	15
3.2. Arboviroses.....	18
3.2.1. Dengue.....	19
3.2.2. Zika Vírus .....	20
3.2.3. Febre Chikungunya .....	21
3.2.4. Febre amarela.....	22
3.3. Plantas .....	23
3.3.1. Plantas cítricas .....	24
3.3.1.1. Limão comum ( <i>Citrus × limon</i> (L.) Osbeck.).....	24
3.3.1.2. Limão tanja/Limão Cravo ( <i>Citrus x limonia</i> Osbeck). .....	25
3.3.1.3. Limão galego ( <i>Citrus x aurantifolia</i> (Christm.) Swingle) .....	26
3.4. Óleos essenciais .....	26
3.5. Larvicidas .....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1. Coleta e amostragem .....	30
4.2. Identificação botânica.....	31
4.3. Extração dos óleos essenciais das espécies vegetais .....	32
4.4. Caracterização dos óleos essenciais .....	33
4.4.1. Análise Química por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	33
4.4.2. Análises físico-químicas dos óleos essenciais das espécies de limão .....	34

4.5. Teste de toxicidade à <i>Artemia salina</i> Leach .....	34
4.6. Atividade larvicida dos óleos essenciais frente às larvas de <i>Aedes aegypti</i> ....	36
4.6.1. Obtenção e cultivo das larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	36
4.6.2. Teste larvicida dos óleos essenciais frente às larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	37
4.6.2.1. Teste piloto para atividade larvicida .....	37
4.6.2.2. Teste larvicida frente às larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	38
4.7. Análise estatística dos dados .....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
5.1. Identificação botânica das espécies .....	39
5.2. Rendimento dos óleos voláteis das espécies vegetais.....	39
5.3. Análises físico-químicas dos óleos essenciais .....	40
5.4. Caracterização química dos óleos essenciais obtidas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas (CG-EM). .....	41
5.5. Teste de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> Leach.....	46
5.6. Atividade larvicida dos óleos essenciais frente às larvas de <i>Aedes aegypti</i> ....	47
5.6.1. Teste piloto.....	47
5.6.2. Teste do potencial larvicida frente às larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	48
6. CONCLUSÃO .....	52
REFERÊNCIAS.....	53

## 1. INTRODUÇÃO

Métodos eficazes na prevenção de picada do mosquito *Aedes aegypti* precisam ser encontrados, uma vez que estes são potenciais agentes causadores de doenças tropicais, como a febre amarela, dengue, Chikungunya e Zika vírus e afetam milhões de pessoas no mundo inteiro (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; CARDOSO et al., 2015). Tem-se observado um grande número de notificações de casos de infecção por essas arboviroses, representando um grande desafio para a saúde pública, uma vez que ainda não existem antivirais específicos e nenhum tipo de imunização preventiva (LIMA-CAMARA, 2016).

No Brasil, para o primeiro mês do ano de 2019, foram registrados 59.557 casos prováveis de Dengue, Chikungunya e Zika, sendo que para o mesmo período em 2018, foram registrados 31.471 casos prováveis. Havendo um aumento de quase o dobro de casos de um ano para o outro (BRASIL, 2019).

Assume-se hoje que a maior parte dos produtos farmacêuticos foi desenvolvida a partir dos produtos naturais. Os produtos à base de plantas, além de terem efeito inseticida comprovado, apresentam uma diversidade de compostos ativos, os quais agem sinergicamente, apresentando características atraentes, desalojantes ou repelentes, entre outras que podem ser empregados em sistemas de manejo integrado de pragas, como alternativas dirigidas para controle e monitoramento das populações de insetos (NAVARRO-SILVA; MARQUES; DUQUE, 2009).

Para contornar este problema, é necessário identificar novas alternativas de controle com diferentes modos de ação a fim de aumentar as opções disponíveis de inseticidas de uso na saúde pública. O inseticida ideal deve ser eficaz, ecologicamente correto, sustentável e rentável e apresentar baixa toxicidade aos mamíferos. Além disso, não deverão alterar significativamente as características da água (DIAS; MORAES, 2014).

Na procura por larvicidas alternativos, os óleos essenciais extraídos de plantas medicinais têm demonstrado alta eficiência, comprovada em diferentes estudos, pois seus constituintes atuam como toxinas, impedimentos de alimentação e oviposição para uma ampla variedade de insetos pragas, interferindo no crescimento e reprodução da praga em diferentes fases do seu crescimento.

Neste sentido este trabalho se propõe a caracterizar quimicamente os óleos essenciais de diferentes espécies de limão (de Limão Comum (*Citrus x limon* (L.) Osbeck.), Limão Tanja (*Citrus x sp*) e Limão Galego (*Citrus x aurantifolia* (Christm.) Swingle) e testar a atividade larvicida frente às larvas de *Aedes Aegypt*, conhecido popularmente por mosquito da Dengue.

## 2. OBJETIVO

### 2.1. Objetivo Geral

Verificar a atividade larvicida de óleos essenciais extraídos de diferentes espécies de limão frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

### 2.2. Objetivos Específicos

- ◆ Fazer a caracterização botânica das plantas;
- ◆ Extrair os óleos essenciais das cascas das espécies de Limão Comum (*Citrus x limon* (L.) Osbeck.), Limão Tanja (*Citrus* x sp) e Limão Galego (*Citrus x aurantifolia* (Christm.) Swingle) por Hidrodestilação;
- ◆ Identificar os componentes majoritários dos óleos essenciais por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM);
- ◆ Verificar a toxicidade dos óleos essenciais, frente à *Artemia salina*, visando à segurança na utilização desses óleos;
- ◆ Determinar as concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) dos óleos essenciais frente às larvas de *Aedes aegypti*.

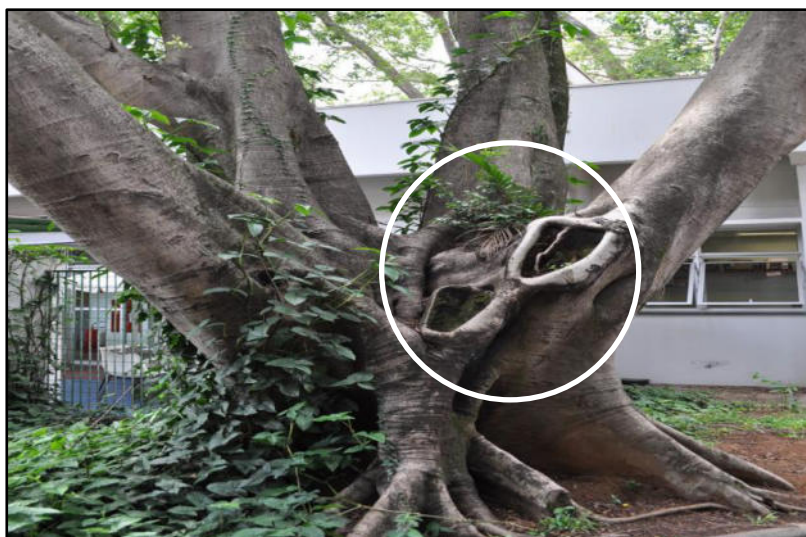
### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1. Mosquito *Aedes aegypti*

*Aedes aegypti* é um díptero da família *Culicidae*, tendo sido descrito inicialmente no Egito. Encontra-se distribuído em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do globo e acredita-se que este mosquito tenha vindo para as Américas em navios de escravos durante o Período Colonial, caracterizado pela expansão do comércio. Com a destruição dos *habitat* naturais, devido às ações antrópicas, uma parte da população silvestre desse mosquito sofreu um processo seletivo que ajudou na disseminação para os centros urbanizados (POWELL; TABACHNICK, 2013; PLESS et al., 2017).

O processo de dispersão do mosquito é diretamente ligado à ação do homem. Rejeitos domésticos e outros materiais descartados em lugares inadequados, crescimento urbano, clima e outros fatores propiciam a oviposição e desenvolvimento do vetor e, com isso, aumento da transmissão de doenças (RIBEIRO, 2013; COSTA et al., 2018). Lima-camara 2016, durante busca por criadouros potenciais relatou a existência de larvas de *Aedes aegypti* em oco de árvore em peridomicílio (Figura 1), mesmo sendo um comportamento pouco frequente para a espécie.

**Figura 1** - Criadouro natural com larvas de *Aedes aegypti*.



Fonte: LIMA-CAMARA(2016).

A transmissão das doenças ocorre exclusivamente pelo mosquito fêmea, devido à sua necessidade de obter sangue durante a sua fase de acasalamento, uma vez que a fêmea pica a pessoa infectada, ela mantém o vírus na saliva e o

retransmite no seu próximo repasto. A fêmea também transmite o vírus para seus descendentes por transmissão ovariana, aumentando a densidade de vetores e conseqüentemente, aumento da difusão das arboviroses (MERÊNCIO; TASCA; VIEIRA, 2018).

O ciclo de vida do *Aedes* compreende duas fases ecológicas dependentes uma da outra: a fase aquática com três etapas de desenvolvimento (o ovo, a larva e a pupa) e a fase terrestre que corresponde ao mosquito adulto (Figura 2). Os ovos são pequenos, de formato oblongo, cor clara no momento da oviposição e total escurecimento com o tempo, seu desenvolvimento embrionário leva de dois a três dias. Quando entram em contato com a água podem eclodir em minutos, mas possui resistência na ausência de água tendo capacidade de se desenvolver após meses (FARNESI et al., 2009; FAULL; WILLIAMS, 2015).

Com a eclosão dos ovos de *Aedes Aegypti* origina-se as larvas, único etapa de crescimento no ciclo de vida do vetor, dividido em quatro estágios. As larvas de *Aedes aegypti* são aquáticas e se alimentam de matérias orgânicas que estão em suspensão ou sedimentos acumulados nas paredes e no fundo dos reservatórios. Os hábitos alimentares larval são não seletivos, assim, além das partículas de alimentos, as larvas podem facilmente ingerir inseticidas químicos ou biológicos (IOC, 2016).

O tempo de desenvolvimento das larvas do mosquito *Aedes aegypti* é influenciado principalmente pela temperatura, disponibilidade de alimentos e densidade larval no local de reprodução. Sob condições ótimas, larvas podem completar todos os quatro estágios e entrar no estágio de pupa em quatro dias; no entanto, pode ser consideravelmente prolongada sob condições não favoráveis. (OLIVEIRA, 2015).

A etapa de pupa não é uma etapa de alimentação e é o período onde acontece varias transformações internas do *Aedes*, resultando na formação total do mosquito. As pupas permanecem na superfície da água para assim respirar, mergulhando para o fundo do reservatório somente quando se sente ameaçada. A fase de pupa tem em média dois dias sob condições propícias de temperatura (OLIVEIRA, 2015).

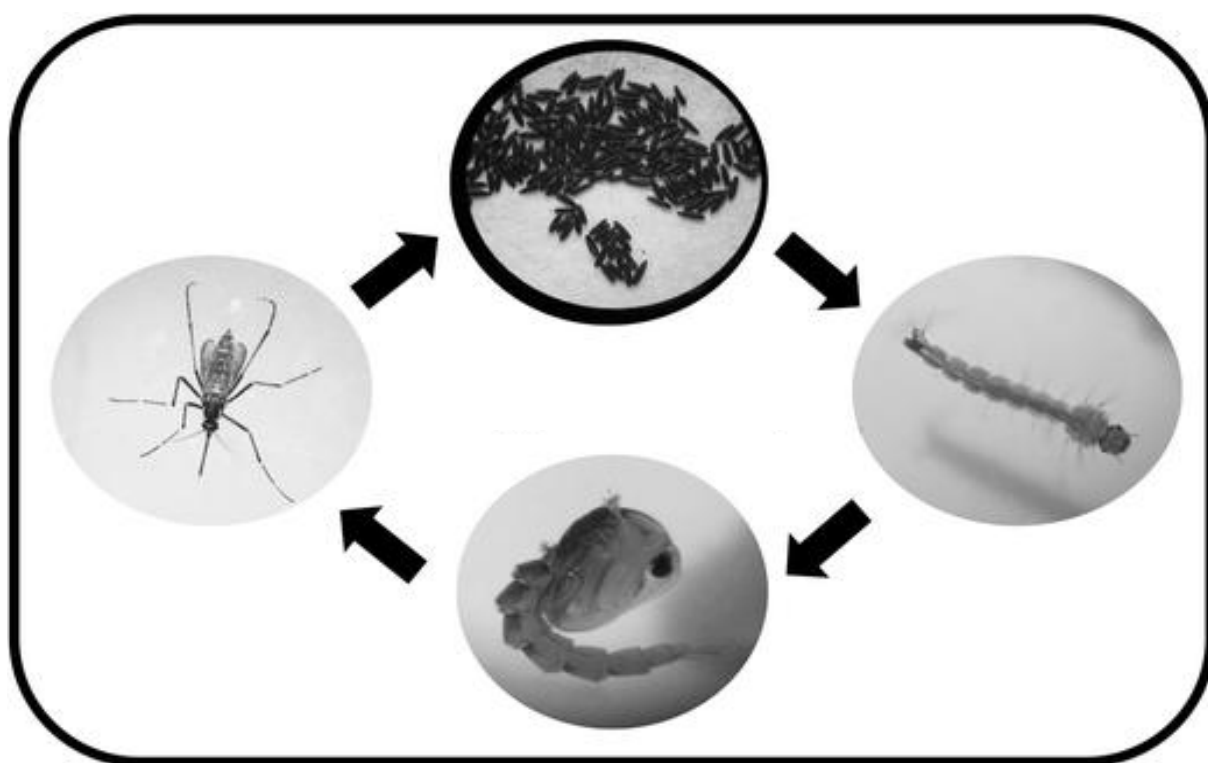
Na forma de mosquito, machos e fêmeas, ambos se alimentam de carboidratos que é essencial ao seu metabolismo básico. Apresenta coloração enegrecida, com faixas branco-prateadas no tórax, formando um padrão de linhas



característico da espécie que se assemelha a uma “lira”. Aproximadamente 24h depois da passagem para a fase adulta à fêmea estará disponível para o acasalamento. As Fêmeas, uma vez inseminadas, podem produzir uma quantidade abundante de ovos férteis, desde que alimentadas com sangue (CAMPOS, 2015).

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor de doenças com grande número de notificações no mundo inteiro (Dengue, Zika vírus, Febre chikungunya e Febre amarela urbana). Tendo em vista o crescimento dessas arboviroses e os prejuízos causados por elas no país, torna-se de suma importância a descoberta de novos materiais e desenvolvimento de métodos de combate ao seu vetor (CAMPOS, 2015; CARDOSO, 2015; KOTSAKIOZI et al., 2018).

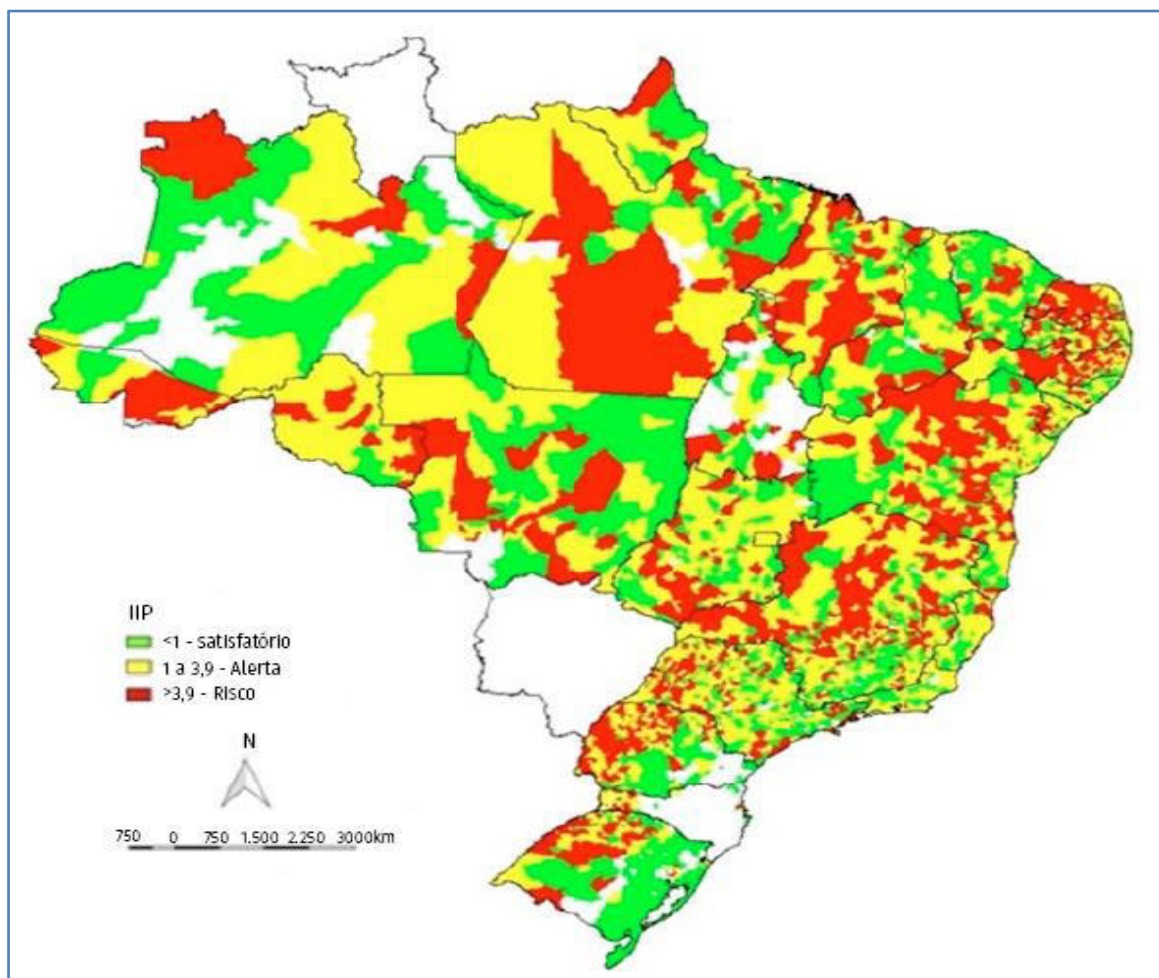
**Figura 2** - Ciclo de desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti*



Fonte: CARVALHO e MOREIRA, 2017.

O primeiro Levantamento Rápido de Índices de Infestação pelo *Aedes aegypti* (LIRAA) de 2019 indica que 994 municípios (20% do total realizado) apresentaram alto índice de infestação, com risco de surto para as doenças dengue, zika e chikungunya (Figura 3). Ao todo, 5.214 municípios realizaram algum tipo de monitoramento do mosquito transmissor dessas doenças, sendo 4.958 (95,1%) por levantamento de infestação (LIRAA/LIA) e 256 por armadilha. A metodologia da armadilha é utilizada quando a infestação do mosquito é muito baixa ou inexistente no local.

**Figura 3** - Levantamento Rápido de Índices para o *Aedes aegypti* (LIRAA)



Fonte: BRASIL (2019).

### 3.2. Arboviroses

Arboviroses é um grupo composto por diferentes infecções transmitidas por artrópodes (mosquitos, aranhas, carrapatos, etc.) que necessitam de sangue. A gravidade dessas infecções varia de acordo com os vírus e indivíduos, mas muitas arboviroses podem ser clinicamente graves e possivelmente levar a um prognóstico vital. Alguns arbovírus dão origem a epidemias em larga escala e, portanto, representam problemas reais para saúde pública (SEGONDY, 2016).

Tem-se observado um grande número de notificações de casos de infecção por essas doenças, com destaque para a Febre de Chikungunya e Vírus Zika em vários países das Américas. A entrada desses vírus no Brasil, já endêmico para a Dengue e com a reemergência da Febre amarela, representa um grande desafio para a saúde pública, uma vez que ainda não existem antivirais específicos e nenhum tipo de imunização preventiva (LIMA-CAMARA, 2016).

No Brasil, para o primeiro mês do ano de 2019, foram registrados 59.557 casos prováveis de Dengue, Chikungunya e Zika, sendo que para o mesmo período em 2018, foram registrados 31.471 casos prováveis. Havendo um aumento de quase o dobro de casos de um ano para o outro (BRASIL, 2019).

### **3.2.1. Dengue**

Dengue é uma doença aguda, infecciosa, não contagiosa, sistêmica e de etiologia viral pertencente ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*. Existem quatro sorotipos que diferenciam entre si: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. Todos os sorotipos podem causar tanto a forma clássica da doença, quanto formas mais graves. Cada vez que uma pessoa é infectada por um tipo, fica permanentemente protegido contra novas infecções por esse mesmo sorotipo, com isso, o indivíduo pode vir a ter quatro episódios de dengue durante sua vida (WHO, 2009; BRASIL, 2016).

A infecção pelo vírus da dengue no ser humano pode se manifestar de várias formas com diferentes níveis de gravidade de acordo com o risco e manejo. Estes níveis de gravidade são distintos e são classificados com: Dengue inaparente, Dengue autogerida, Dengue não grave, Dengue grave, Dengue fatal (WHO, 2018).

O Vírus da dengue ocorre principalmente nos trópicos e subtropicais durante ou após períodos de chuvas, deixando mais de 3 bilhões de pessoas suscetíveis que vivem em áreas infestadas pelo *Aedes aegypti*. Estima-se em torno de 400 milhões de casos notificados por ano (GOUVÊA, 2017).

A primeira epidemia de dengue no Brasil se deu no início dos anos 80, causada pelos sorotipos DEN-1 e DEN-4 nos Estados de Roraima. Posteriormente ocorreram epidemias em cidades do nordeste e no Rio de Janeiro, desde então, os casos de Dengue ocorrem em todo o Brasil em um ritmo contínuo de endemias causadas pela introdução de um sorotipo ou pelo revesamento em uma região anteriormente endêmica (BRASIL, 2019).

A infecção pelo vírus dengue pode ser assintomática ou sintomática. Quando sintomática, causa uma doença sistêmica e dinâmica de amplo espectro clínico, variando desde formas oligossintomáticas até quadros graves, podendo evoluir para o óbito. Três fases clínicas podem ocorrer: febril, crítica e de recuperação (BRASIL, 2016).

Com o monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 12 de 2019 (30/12/2018 a 23/03/2019), registrou 273.193 casos prováveis de dengue no país, com uma incidência de 131,0 casos/100 mil habitantes. No mesmo período de 2018, foram registrados 71.525 casos prováveis. a região Sudeste apresentou o maior número de casos prováveis de dengue (179.714 casos; 65,7%) em relação ao total do país, seguida das regiões Centro-Oeste (48.048 casos; 17,6%), Nordeste (20.543 casos; 7,5%) Norte (16.630 casos, 6,1%) e Sul (8.258 casos; 3,0%)(BRASIL, 2019).

Para o Maranhão, até o dia 23 de março de 2019, a Secretaria de Vigilância em Saúde registrou 901 casos prováveis de Dengue como uma incidência de 12,8 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2019).

### **3.2.2. Zika Vírus**

O Zika vírus é um arbovírus do gênero flavivírus e tem como principal vetor o *Aedes aegypti*, foi identificado a partir de primatas nativos da Floresta Zika localizada no Uganda em 1947. Surtos da doença foram notificados, primeiramente na região do Pacífico nos anos de 2007 e 2013, e em 2015, nas Américas (Brasil e Colômbia) e na África (SALAZAR et al., 2016).

No primeiro trimestre de 2015, foram confirmados os primeiros casos de Zika vírus no Brasil. Inicialmente nos estados da Bahia, Rio Grande do Norte e depois se estendendo para São Paulo, Alagoas, Maranhão, Pará e Rio de Janeiro sinalizando para uma das maiores emergência de saúde pública brasileira (FREITAS et al., 2016).

Zika vírus é transmitido principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti*, porem há relatos de transmissão sexual, perinatal, pós-transfusional e exposição ocupacional (GREGORY et al., 2017). A transmissão sexual tornou-se preocupante para a saúde pública por conta da transmissão do vírus em regiõesdesfavoráveis ao mosquito e por possibilitar a transmissão em longo prazo, já que o vírus persiste no sêmen em até dois meses após o início dos sintomas (MANSUUY et al., 2016; SPENCER et al., 2017).

A sintomatologia ocasionada pela infecção do Zika vírus ocorre em cerca de 20% dos casos e apresenta-se de forma inespecífica devido à similaridade com os sintomas de Febre Chikungunya e Dengue. Comumente ocasiona sintomas

como: exantema cutânea, febre baixa, hiperemia conjuntival sem prurido, artralgia, mialgia, fadiga e cefaleia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; JAVED et al., 2017).

O vírus Zika provocou um grande impacto na saúde pública devido à sua associação com a Síndrome de Guillain-Barré (SGB), a encefalites fatais em adultos, a óbitos fetais, microcefalia e outras malformações fetais (síndrome do Zika congênito). (WHITE et al., 2017). A SGB é uma síndrome neurológica, de origem autoimune, caracterizada por uma polirradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória aguda e ascendente, causando déficit no desenvolvimento sensório-motor inferior bilateral e simétrico (PAHO WHO, 2016).

As microcefalias congênitas são descritas como anomalias neurológicas, nas condições em que o encéfalo não se desenvolve adequadamente e o perímetro cefálico do recém-nascido são inferiores ao esperado para a idade gestacional e o sexo correspondente. Para os casos de microcefalia secundária à infecção congênita, são descritos sinais neurológicos como calcificação cerebral, atrofia cerebral, digenesia do corpo caloso, ventriculomegalia e lisencefalia (BRASIL, 2018)

Em 2019, até a Semana Epidemiológica 9 (30/12/2018 a 16/03/2019), foram registrados 2.344 casos prováveis de Zika no país, com incidência de 0,3 caso/100 mil habitantes. A região Norte apresentou o maior número de casos a (919 casos; 39,2%) em relação ao total do país. Em seguida, aparecem as regiões Sudeste (793 casos; 33,8%), Nordeste (316 casos; 13,5%), Centro-Oeste (255 casos; 10,9%) e Sul (61 casos, 2,6%). Para o Maranhão, até o dia 2 de março de 2019, a Secretaria de Vigilância em Saúde registrou 33 casos prováveis de Zika vírus como uma incidência de 0,4 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2019).

### **3.2.3. Febre Chikungunya**

O vírus Chikungunya é um alphavirus (família Togaviridae) que é transmitido aos humanos pelo mosquito *Aedes aegypti*. Causa uma doença febril aguda com poliartalgia, que é frequentemente grave e incapacitante. Foi descoberto na Tanzânia em 1952 e inicialmente produziu epidemias esporádicas na África e na Ásia, mas em 2005, o vírus tornou-se capaz de mutação, o que também permitiu que ele fosse transmitido através do *Aedes albopictus*, um mosquito distribuído em todo o mundo. Desde então, tem havido uma série de epidemias na África, no sudeste da Ásia e nas ilhas do Oceano Índico e da Europa (HALSTEAD, 2015).

A primeira transmissão étnica na América tropical foi identificada no final de 2013. Logo depois, houve um surto severo na maioria das ilhas do Caribe, que agora atingiu o norte da América do Sul e dos Estados Unidos. Atualmente, a doença produzida por este arbovírus cria um sério problema de saúde pública em uma grande área da América e Europa (HALSTEAD, 2015; CASSADOU et al., 2015; KUNO;ENNIFER, 2015).

Em 2019, até a SE 12 (30/12/2018 a 23/03/2019), foram registrados 15.352 casos prováveis de chikungunya no país, com uma incidência de 7,4 casos/100 mil hab. No Maranhão, foram 164 notificados.

#### **3.2.4. Febre amarela**

A febre amarela é uma doença infecciosa aguda de curta duração (no máximo de 12 dias) e de gravidade variável. É produzida por um arbovírus do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*. A doença se mantém endêmica em diversas regiões tropicais das Américas e da África, e é responsável por surtos periódicos, de magnitude variável. A forma grave caracteriza-se clinicamente por manifestações de insuficiência hepática e renal, que podem levar à morte. A vacinação é a medida mais importante para prevenir a doença (JOHANSSON; VASCONCELOS; STAPLES, 2014).

A febre amarela já foi um dos principais problemas de saúde pública do Brasil, mas foi controlada com a eliminação da transmissão urbana em 1942. A febre amarela silvestre é uma zoonose de animais silvestres ainda de difícil erradicação no Brasil devido a ampla dispersão de *Aedes aegypti* nas cidades brasileiras, tornando-se uma ameaça constante (COSTA et al., 2011).

O aumento do número de casos de febre amarela silvestre, a alta densidade de infestação pelo *Aedes aegypti* e a baixa cobertura vacinal são fatores que favorecem o risco da reurbanização da febre amarela no Brasil. Por sua vez, a manutenção de baixa densidade de infestação pelo *Aedes aegypti*, e de altas coberturas vacinais em áreas endêmicas, aliadas ao curto período de transmissibilidade do vírus em relação ao da dengue, são fatores que dificultam a reintrodução da transmissão urbana da febre amarela no país (CAVALCANTE; TAUIL, 2017).

### 3.3. Plantas

Também chamado de Reino Vegetal, o Reino Plantae nada mais é do que a classificação a que pertencem às plantas. Os seres do Reino Plantae são considerados, na teoria evolutiva, os primeiros colonizadores de nosso planeta. Os vegetais que fazem parte do Reino Plantae são organismos eucariontes, multicelulares, autotróficos e fotossintetizantes. Isso quer dizer que eles apresentam mudanças no ciclo de vida conforme passam as gerações e que têm autossuficiência alimentar (CELI, 2019).

A nossa história está intrinsecamente ligada ao ambiente natural, especialmente as plantas, utilizadas para alimentação, confecção de moradia e utensílios, vestuários, estética e remédios. Os registros de utilização de plantas como remédio datam da era paleolítica, pela identificação de pólen de plantas medicinais em sítios arqueológicos. Relatos escritos mais sistematizados foram encontrados na Índia, na China e no Egito e datam de milhares de anos antes da civilização cristã (SAAD et al., 2009).

O Brasil apresenta uma diversidade de solos e climas que favorecem a abundância e diversidade de tipos de vegetação distribuída nos diversos ecossistemas. A biodiversidade da flora brasileira representa uma grande riqueza natural que pode ser utilizado no desenvolvimento de diversos tipos de produtos. Isso se deve a grande diversidade de matéria-prima, já que o país possui uma das maiores reservas de recursos naturais, diversos biomas e a mais rica biodiversidade tropical do mundo. Estima-se que o Brasil concentre boa parte do total mundial de espécies inventariadas, sendo que as plantas e os microrganismos existentes no território brasileiro, em especial na região Amazônica, se destacam dentre toda essa biodiversidade (PIRES; GRISOTTO; GRISOTTO, 2017).

No Brasil, a medicina popular é fruto da mistura de saberes de diversos grupos indígenas, juntamente com os europeus e africanos vindos para o Brasil. Esses povos, quando vieram, trouxeram consigo uma grande quantidade de plantas. Então, podemos dizer que a maioria das formas de uso das plantas medicinais, hoje, é o resultado da interação de pessoas de diferentes culturas (SILVA et al., 2013).

Além do uso medicinal, as plantas e seus derivados vêm sendo utilizados de forma cada vez mais comum como inseticida. Embora não seja algo recente, pois esta prática vem sendo adotada pelo homem desde a idade antiga. No início da

primeira metade do século XX, essas substâncias eram muito utilizadas no controle de insetos, principalmente nos países tropicais. Desta forma, é evidente que os produtos de origem vegetal ressurgem como alternativa promissora para o controle de insetos (KRINSKI; MASSAROLI; MACHADO, 2014).

### 3.3.1. Plantas cítricas

De origem asiática, as plantas cítricas foram introduzidas no Brasil pelas primeiras expedições colonizadoras, provavelmente na Bahia. Entretanto aqui, com melhores condições para cultivo e produção do que nas próprias regiões de origem, as citrinas se expandiram para todo o país. Os citros compreendem um grande grupo de plantas do gênero *Citrus* e outros gêneros afins (*Fortunella* e *Poncirus*) ou híbridos da família *Rutaceae*, representado, na maioria, por laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas (*Citrus reticulata*), limões (*Citrus limon*), limas ácidas como o Tahiti (*Citrus latifolia*) e o Galego (*Citrus aurantiifolia*), e doces como a lima da Pérsia (*Citrus limettioides*), pomelo (*Citrus paradisi*), cidra (*Citrus medica*), laranja-azeda (*Citrus aurantium*) e toranjas (*Citrus grandis*) (LOPES, 2011).

A citricultura brasileira, que detém a liderança mundial, têm se destacado pela promoção do crescimento sócio-econômico, contribuindo com a balança comercial nacional e principalmente, como geradora direta e indireta de empregos na área rural. As laranjas, as tangerinas e os limões são os principais tipos de *citrus* cultivados no Brasil. Algumas espécies são utilizadas na produção de ácido cítrico e também na produção de matéria-prima para a indústria farmacêutica (LOPES, 2011).

#### 3.3.1.1. Limão comum (*Citrus × limon* (L.) Osbeck.)

Também chamado de limão comum, limão verdadeiro ou limão siciliano (*C. x limon*) acredita-se que é possivelmente um híbrido entre cidra (*C. medica* - parental materno) e laranja azeda (*C. aurantium* - parental paterno) (CURK et al., 2016). Entretanto, Garcia-Ior et al. (2013), confirmaram que *Citrus x limon* apresenta uma constituição genômica diversificada, com *C. medica* contribuindo com 50% de seu genoma, *C. reticulata* com 38,5% e *C. maxima* com 11,5%.

O limão é uma pequena árvore até 6 metros de altura, provida de raminhos com espinhos robustos. A sua casca é verde, lisa e grossa. A copa é aberta e pouco densa, com ramos espinhosos, solitárias na axila das folhas. As



folhas são alternas, oblongas e serrilhadas, agudas, coriáceas, verde-escuras brilhantes, com a margem finamente dentada e com pecíolo estreitamente alado. As flores são solitárias, ou dispostas em pequenas cimeiras, na axila das folhas, com simetria radial, brancas, raiadas de púrpura, pequenas e muito aromáticas. O fruto (hesperídio) com 6,5 a 12,5 cm é amarelo quando maduro, oblongo ou ovoide, casca aromática e com polpa ácida. As sementes estão rodeadas por vesículas fusiformes (SERRALVES, 2015).

O limão da espécie *Citrus limon* é utilizado industrialmente como flavorizante em alimentos, devido ao óleo essencial presente em sua casca e sementes. (REDA et al., 2005).

O limoeiro tem imensas aplicações, e muitos são aqueles que o consideram um remédio universal para combater todo o tipo de doenças. O sumo do limão é rico em ácido cítrico e contém grande quantidade de vitaminas; é refrescante, diurético, facilita a digestão, sendo muitas vezes utilizado na dietética pelas suas vitaminas. Da casca do limão obtém-se uma essência, utilizada como aromatizante, na perfumaria, para fabricar colónias. A essência é antisséptica, e diurética, devido aos flavonóides, tendo ação a vitamínica P (protetora dos vasos sanguíneos). Para uso externo, é considerada antisséptica, cicatrizante, hidratante, também é utilizado como conservante, devido às suas propriedades antioxidantes. Contudo a principal importância económica se deve ao seu uso para fabrico de limonadas e bebidas refrescantes (SERRALVES, 2015).

#### 3.3.1.2. Limão tanja/Limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck).

Sendo muito parecido com uma laranja pequena, o limão cravo (*Citrus limonia* osbeck) é facilmente identificado pela sua cor. Conhecido também como limão rosa ou caipira, essa espécie é a mais suculenta e de sabor mais marcante, algumas pessoas podem se incomodar com a acidez excessiva. Na realidade, essa espécie é uma mistura de limão e tangerina. Devido ao seu aroma bem característico, o limão cravo é uma ótima opção para o preparo de limonadas, marinar carnes e temperar outros alimentos (CAETANO, 2017).

O limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck) é um possível híbrido natural entre limoeiro verdadeiro [*Citrus limon* (L.) Burm. f.] e tangerineira (*Citrus reticulata sensu Swingle*) é uma fruta cítrica oriunda da Índia que se adaptou muito bem nas distintas condições edafoclimáticas brasileiras. As frutas cítricas estão entre as principais

fontes de compostos polifenólicos, e esses, por sua vez, constituem uma das principais classes de metabólitos secundários de plantas e possuem grande variedade de estruturas. Os extratos de frutas cítricas, como o limão, são importantes fontes de ácidos fenólicos, sendo que esses compostos podem agir como: redutores, interruptores de radicais livres, inibidores ou supressores de oxigênio singlete, e como inativadores de metais pró-oxidantes (MIGLIORINI et al., 2016).

#### 3.3.1.3. Limão galego (*Citrus x aurantifolia* (Christm.) Swingle)

A *Citrus x aurantifolia* é nativa das regiões tropicais e subtropicais da Ásia e Sudeste da Ásia, incluindo a Índia, China, e foi introduzida no Norte da África, Europa e no restante do mundo. É uma árvore perene que pode crescer até uma altura de 3 a 5 m. O Caule é irregularmente delgado, ramificado e possui espinhos duros que pode chegar até 1 cm. As Folhas são alternadas, elípticas ou ovais, de 4,5 a 6,5 cm de comprimento e 2,5 a 4,5 cm de largura com pequenos dentes arredondados ao redor da borda. Os Frutos são verdes ou amarelados, redondos, de 3 a 5 cm de diâmetro. Todos os frutos apresentam as mesmas estruturas anatômicas. (NARANG; JIRAUNGKOORSKUL, 2016).

A *Citrus aurantifolia* foi usada tradicionalmente como laxante, aperitivo, estomacal, digestivo, anti-helmíntico, indigestão, flatulência. Também foi usado para febres, dores de garganta, sinusite e bronquite, além de ajudar na asma. Seu óleo é usado como antidepressivo. Pode ser útil para a artrite reumática, obesidade e tem uma ação como adstringente e tonificante para limpar a pele oleosa e a acne, no tratamento de herpes, cortes e picadas de insetos (AL-SNAFI, 2016).

### 3.4. Óleos essenciais

A International Organization for Standardization - ISO, define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (Rutaceae). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, sendo formados principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides. Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Tais denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas, como,

por exemplo, a de possuírem aparência oleosa e aroma agradável, serem líquidos voláteis e solúveis em solventes apolares (PEREIRA et al., 2014).

Estes óleos vêm despertando amplo interesse de vários grupos de pesquisa devido à diversidade de atividades biológicas relacionadas a eles, como: antibacteriana, antifúngica, larvicida, ovicida, inseticida, antioxidante, dentre outras.

Os óleos essenciais possuem composição química complexa e garantem aos vegetais vantagens adaptativas no meio em que estão inseridos. Eles são usados pelas plantas da mesma forma que são pelos seres humanos - combatem a infecção, contêm compostos semelhantes a hormônios, iniciam a regeneração celular e funcionam como defesas contra inimigos fúngicos, virais e animais. A composição química dos óleos voláteis varia entre as espécies e partes de um mesmo vegetal. Uma mesma espécie botânica pode ser afetada pelo local de cultivo, condições de coleta, estabilização e estocagem, além dos fatores edafoclimáticos (MIRANDA et al., 2016)

Estes podem ser aplicados em vários segmentos, como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e contra o ataque de herbívoros, bem como nos setores de higiene pessoal, perfumaria, cosmética, aromaterapia, incenso, medicina, limpeza doméstica, aromatizantes, alimentos e bebidas. Vários países produzem diferentes tipos de óleos essenciais. A Índia ocupa o segundo lugar no comércio mundial de óleos essenciais. O Brasil ainda tem pouca participação, corresponde a apenas 0,1% deste comércio mundial, deste valor, 80% refere-se ao comércio de óleo de laranja (MILLEZI et al., 2014).

Em geral, os constituintes em óleos essenciais são terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos), compostos aromáticos (aldeído, álcool, fenol, metoxis) (MOHAMED; EL-EMARY; ALI, 2010). Os monoterpenos que representam aproximadamente 90% dos óleos essenciais se dividem em três subgrupos: monocíclicos, bicíclicos e acíclicos. E são de grande valor no mercado internacional devido seu uso como fixador em perfumes como, por exemplo, o famoso Chanel número 5 (PEREIRA et al., 2014).

Os óleos essenciais são uma mistura complexa de dezenas de compostos com diferentes comportamentos, grupos funcionais e polaridade. Devido a essa complexidade estrutural, Wang et al. (2008) afirmam que os efeitos de um óleo essencial não pode ser atribuído a um ou alguns de seus constituintes, visto

que além dos compostos principais, os constituintes encontrados em concentrações menores podem contribuir de forma significativa para a atividade do óleo.

Para entender melhor a relação entre o óleo essencial e a sua atividade larvicida, alguns autores testaram isoladamente os principais componentes dos óleos essenciais. Na maior parte dos estudos, observou-se que todo o óleo essencial foi mais ativo do que os seus compostos isolados. Isto pode ser explicado pelas interações entre os constituintes presentes nos óleos. Em alguns casos, a bioatividade da mistura é mais elevada do que os dos compostos purificados (ROSA et al., 2016).

### 3.5. Larvicidas

Larvicidas são compostos com ação larvicida utilizados no combate e controle as formas imaturas dos insetos e são classificados em três grupos: químicos (organofosforados e piretróides), biorreguladores (análogos sintéticos de hormônios de insetos) ou biológicos (bactérias entomopatogênicas). Esses produtos devem ser recomendados pela OMS e passar por uma rigorosa avaliação da World Health Organization Pesticed Evaluation Scheme (WHOPES). O principal larvicida utilizado no Brasil até 2012 era o temefós, agente químico organofosforado. Porém, seu uso contínuo provocou resistência seletiva à população de mosquitos *A. Aegypti*, o que levou o Ministério da Saúde a buscar alternativas incluindo o Diflubenzuron, Novaluron (agentes químicos), Pyriprozyfen (biorregulador) e produtos à base de *Bacillus thuringiensis israelenses* (agente biológico) (HARTMANN et al., 2018).

Larvicida e pupicídio são agentes comuns para reduzir a população de mosquitos e prevenir arboviroses. Em particular, o controle de larvas geralmente depende da aplicação prolongada de organofosforados ou outros reguladores de crescimento, como diflubenzuron e methoprene (CONTI et al., 2014).

A escolha do larvicida a ser utilizado em cada região ocorre a partir de testes de susceptibilidade e efetividade desses. Entretanto, a despeito da possibilidade de desenvolvimento de resistência decorrente da utilização prolongada do mesmo larvicida, deve-se realizar avaliações periódicas de sua eficácia (HARTMANN et al., 2018).

Hoje, os inseticidas químicos sintéticos usados para controlar vetores de mosquitos estão sendo seriamente questionados por causa dos danos irreversíveis

que causam ao ecossistema e aos vários padrões de resistência a mosquitos. O uso de inseticidas tem sido associado com efeitos adversos e sensíveis em organismos não alvos, em outros ambientes. Quando os inseticidas alcançam um corpo de água, há violação da biota pelo dano progressivo a organismos em cada nível trófico através de um processo de biomagnificação (ABE et al., 2014).

Neste cenário, ferramentas mais recentes e ecológicas foram implementadas recentemente para melhorar o controle de mosquitos. Nos últimos anos, tem sido sugerido que os óleos essenciais das plantas e seus constituintes podem ser bons agentes larvicidas e pupicidas para o controle do mosquito, principalmente porque seus produtos químicos bioativos geralmente causam apenas efeitos colaterais inconseqüentes em outros organismos e no ambiente agrícola (CHANTAWEE; SOONWERA, 2018).

A utilização de larvicidas oriundos de produtos naturais, substâncias isoladas de plantas, são alternativas cada vez mais comuns e seguras para o controle populacional dos insetos, em comparação aos inseticidas sintéticos.

Extratos vegetais ou fitoquímicos são as fontes potenciais de composto mosquitocidas que podem agir de forma independente ou em combinação como substância tóxica em geral contra o adulto e larvicida. Portanto, estudos de compostos à base de plantas devem ser realizados de modo a fornecer larvicidas novos, seguros e eficazes.

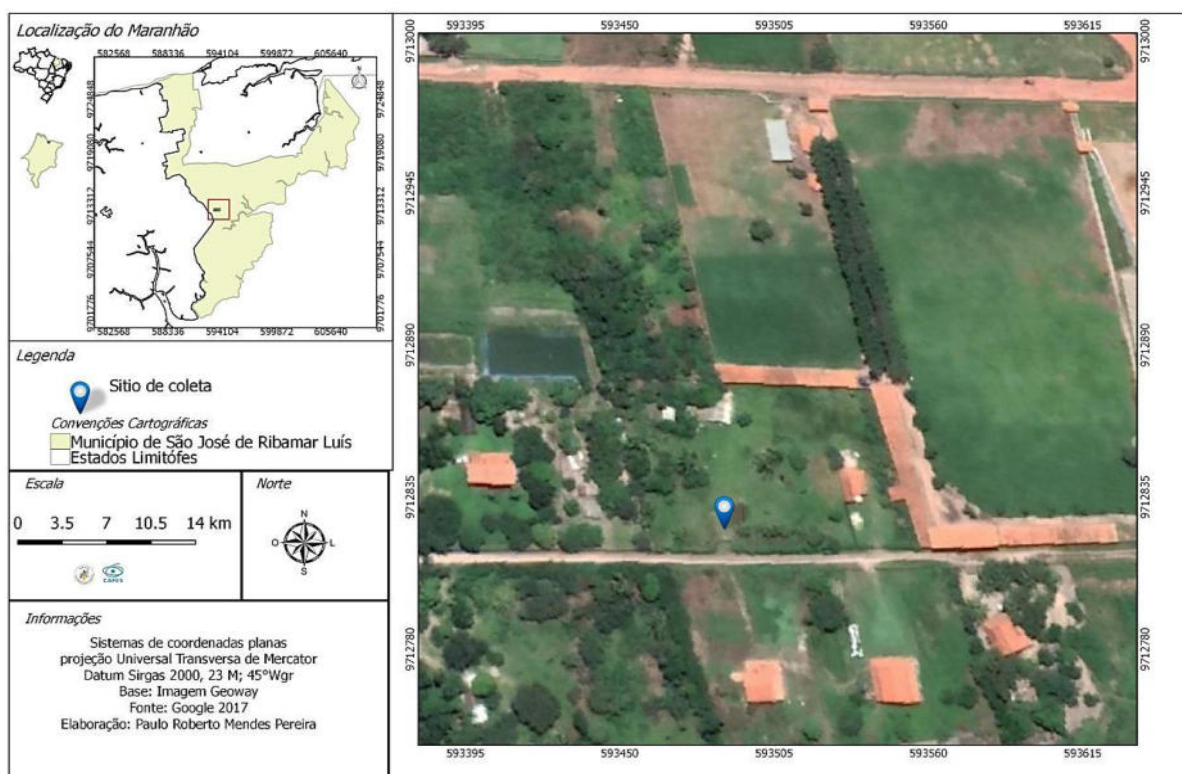
## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O tipo de pesquisa abordado neste trabalho foi do tipo experimental. Foi realizada também uma revisão na literatura e em bases de dados eletrônicas (Web Science, Science Direct, Scielo, Lilacs e PubMed), livros, dissertações, periódicos e revistas disponíveis em busca de textos e artigos que tratassem do tema.

### 4.1. Coleta e amostragem

Os materiais vegetais (galhos, folhas e frutos) foram coletados das espécies de limão comum, limão tanja e limão galego no mês de janeiro de 2018, no período da manhã, em uma área rural denominada São Brás dos Macacos, no município São José de Ribamar – MA, Brasil com coordenadas Latitude  $02^{\circ}35'51,8''S$  e Longitude  $44^{\circ}09'33,3''W$ . (Figura 4).

**Figura 4** - Localização da área de coleta das espécies de limão



Informações: Sistema de coordenadas planas, projeção Universal de Mercator Datum Sirgas 2000, 23 M; 45°Wgr. Base: Imagem Geoway. Fonte: Google 2017. Elaboração: Paulo Roberto Mendes Pereira.

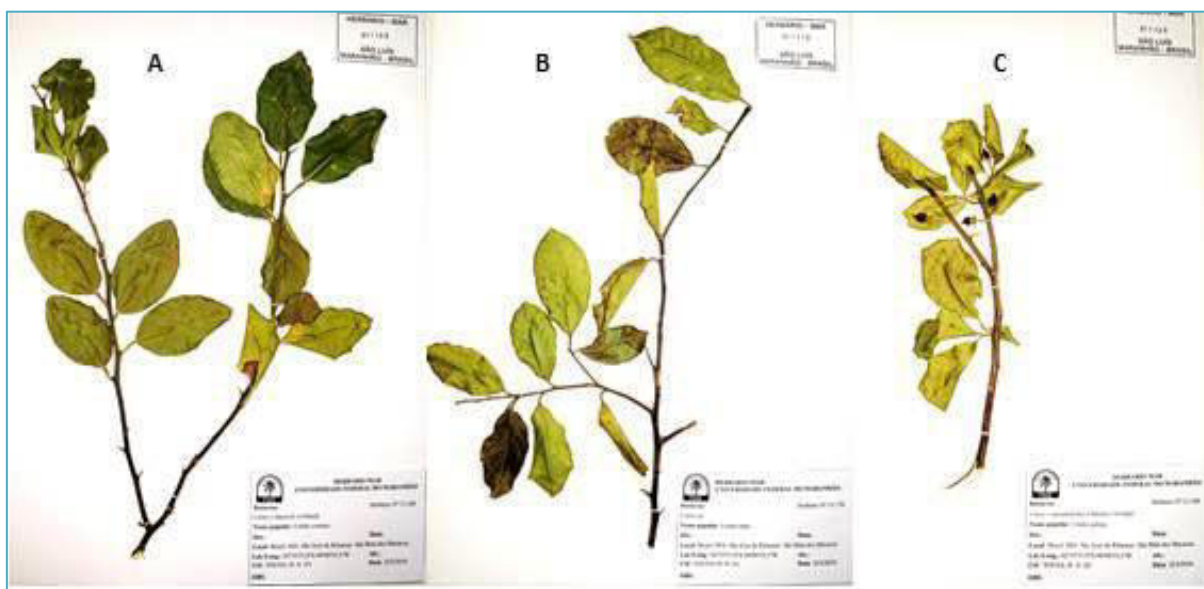
Os frutos das espécies foram levados ao Laboratório de Óleo Essenciais da Universidade Federal do Maranhão para retirada do mesocarpo (cascas) e extração dos óleos essenciais.

As partes estruturais das plantas coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Estudos Botânicos (LEB) da UFMA, as quais foram utilizadas para identificação por Botânicos, através de análise morfológica e comparação em bancos de dados.

#### 4.2. Identificação botânica

Para identificação das plantas foram seguidas orientações técnicas para coleta como retirar partes estruturais representativas e reprodutivas (flores e frutos) dos vegetais, com tamanho entre aproximadamente 30 a 40 cm. Em seguida acondicionadas em papel de jornal e transportadas ao LEB da Universidade Federal do Maranhão coordenado pelo prof. Dr. Eduardo Bezerra de Almeida Jr, onde foram 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 da coleta, nome vulgar, determinador e número de depósito (figura 5A-C).

**Figura 5-** Exsicatas das espécies de limão



Nota: A – exsicata de Limão comum, B - exsicata de Limão tanja, C - exsicata de Limão galego.  
Fonte: Autor, 2019.

### 4.3. Extração dos óleos essenciais das espécies vegetais

O método utilizado para extrair os óleos essenciais das espécies de limão, foi a hidrodestilação (SERTOR, 2009; SILVA, 2011).

O sistema Foi montado, empregando-se o extrator de Clevenger de vidro, que foi acoplado a um balão de fundo redondo de 6000 mL, com uma manta elétrica aquecedora mantida a uma temperatura de 100°C (Fotografia 6B), (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

A extração foi realizada no mesmo dia da coleta utilizando 400 gramas das cascas frescas (figura 6A) dos frutos com 4000 mL de água destilada (proporção 1:10), em um balão redondo acoplado ao sistema Clevenger que fora montado (Fotografia 6B). Após 4 horas de destilação, recolheu-se os óleos essenciais, onde os mesmos foram “seco” com sulfato de sódio anidro e armazenado em coletor de vidro envolto em papel alumínio sob refrigeração.

**Figura 6** - Extrator de Clevenger acoplado a balão de fundo redondo



Fonte: AUTOR (2018).

O rendimento da extração do óleo foi avaliado através da relação massa/massa pela medida da densidade expressa em percentagem, observando o volume máximo obtido de óleo por massa (g) da espécie estudada (FABROWSKI, 2002; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Dessa forma, calculou-se o rendimento através da relação do volume, obtido com a massa do material da espécie vegetal utilizada na hidrodestilação, com a base do material livre de umidade (b.l.u.),



subtraindo-se da massa de amostra a quantidade de água, conforme equação 1 abaixo:

$$\text{Equação 1 - \% R} = (\mathbf{V.d/m}) \times 100$$

Onde:

**V** = volume total de óleo extraído (mL)

**d** = densidade do óleo (g/mL)

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

#### **4.4. Caracterização dos óleos essenciais**

##### **4.4.1. Análise Química por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**

Os constituintes do óleo essencial foram identificados na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), a análise dos constituintes voláteis foi realizada em cromatógrafo a gás da marca SHIMADZU, acoplado a um espectrômetro de massa CG/EM QP2020A (Figura 7) equipado com coluna capilar CarbolWAX e 5 %metil-fenil silicona, (30m comprimento x 0,25mm de espessura e 0,25µm de espessura do filme), utilizando-se o hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor e interface do CG com detector seletivo mantida em 280°C com fluxo na coluna de 2,5 mL/min, programada para operar em 50°C. Para as análises, foram injetadas alíquotas com volume de 1mL em acetato de etila.

Identificamos os componentes dos óleos a partir da comparação destes com os dados obtidos de substâncias autênticas existente em bibliotecas de espectro-padrão de compostos orgânicos, National Institute of Standards and Technology, NIST 14.

**Figura 7-** Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas



Fonte: CENTRAL ANALÍTICA - USP (2018).

#### **4.5. Análises físico-químicas dos óleos essenciais das espécies de limão**

As propriedades físico-químicas analisadas do óleo essencial foram: densidade, solubilidade em etanol a 90% e o índice de refração. Para a avaliação da densidade, segundo a norma NBR 5784 (ABNT, 1985a) foi utilizado um picnômetro de 1,0 mL, previamente seco, tarado e aferido, onde a amostra do óleo essencial foi adicionada e pesada.

Para a determinação da solubilidade em etanol a 90%, conforme norma NBR 5791 (ABNT, 1989), foi preparada uma solução de etanol/água a 90% (v/v), mantendo-se constante o volume do óleo de 25 microlitros em um tubo de ensaio, ao qual adicionou-se proporcionalmente o mesmo volume da solução alcoólica, até atingir a completa solubilização.

O índice de refração foi determinado com o auxílio do refratômetro de ABBÉ de bancada seguindo a norma NBR 5785 (ABNT, 1985b).

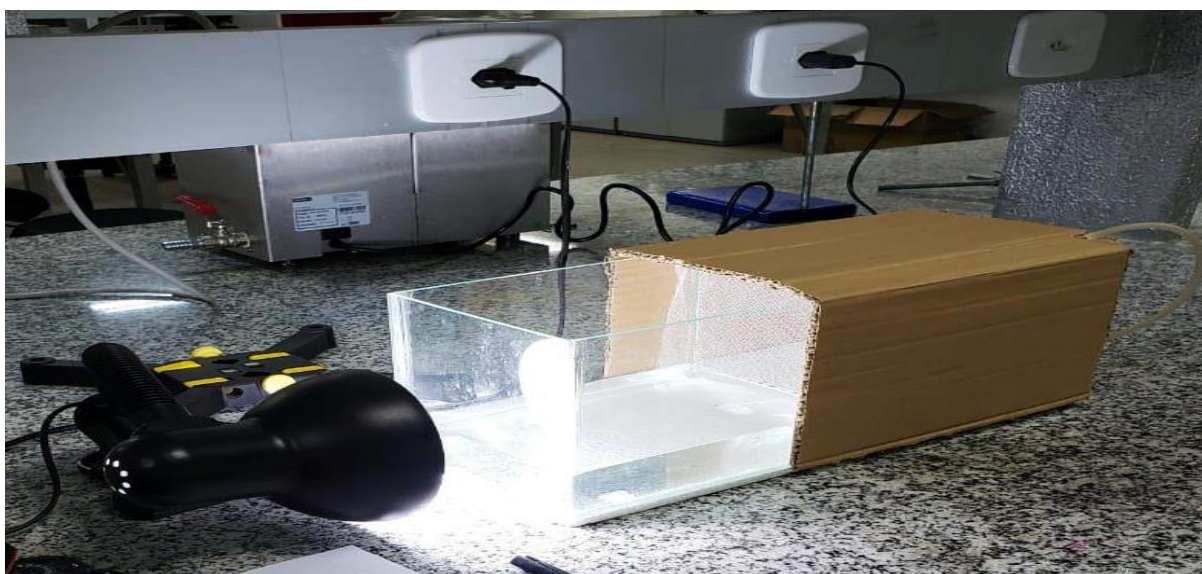
#### **4.6. Teste de toxicidade à *Artemia salina* Leach**

Para a cultura das *Artemias salina*, utilizou-se a metodologia recomendada por Meyer et al., (1982). Esta tem sido uma das metodologias mais citadas e utilizadas para adaptações em avaliação de extratos e frações de produtos

naturais. Os cistos de *Artemia salina* foram transferidos para um aquário contendo solução salina (60g de sal marinho/1000 mL de água destilada) e saturação de oxigênio, obtido com auxílio de bomba de ar. O aquário foi dividido em dois compartimentos interligados, os cistos ficaram em um dos compartimentos, deixando o segundo compartimento sob iluminação artificial de uma lâmpada de 100 W (Figura 8).

Após 24 h, verificou-se a eclosão dos cistos e a migração das larvas, por fototropismo positivo, para o compartimento com iluminação. As larvas foram transferidas para um aquário, contendo solução salina e ficando sob observação por mais 24 horas.

**Figura 8** - Sistema para cultura de *Artemia salina* Leach



Fonte: AUTOR (2018).

Para o teste de toxicidade propriamente dito foi preparada uma solução salina estoque de cada óleo essencial na concentração de  $10.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e DMSO a 2 %. A partir da solução estoque foi realizado diluições, obtendo-se no final concentrações de 10, 100, 250, 500 e  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, onde dez larvas na fase de náuplio foram transferidas para cada um dos recipientes e para o controle negativo foram utilizados 5 mL de uma solução de DMSO 2%.

Após 24h do experimento, a contagem do número de mortalidade por *Artemia salina* foi indicada por locomoção anormal, com

nenhum movimento visível (Gambardella et al. 2014). Após 24 horas as  $CL_{50}$  foram determinadas pelo GraphPad 6.0 Software.

#### 4.7. Atividade larvicida dos óleos essenciais frente às larvas de *Aedes aegypti*

##### 4.7.1. Obtenção e cultivo das larvas de *Aedes aegypti*

Ovos e larvas de *Aedes aegypti* foram coletados durante os meses de janeiro e fevereiro de 2019 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 oviposição do mosquito (Figura 9).

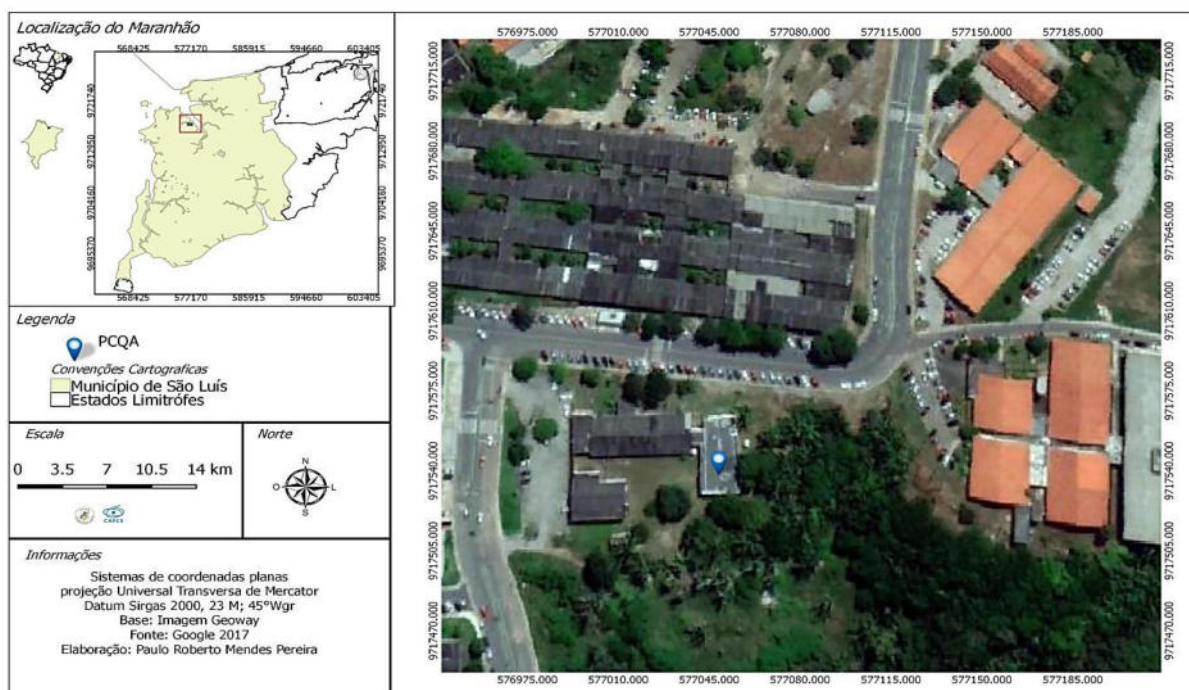
**Figura 9** - Armadilha utilizada para a coleta dos ovos do *Aedes aegypti*



Fonte: AUTOR (2019).

As armadilhas foram instaladas ao lado do Pavilhão tecnológico da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) ( $2^{\circ} 33' 35.1''S$ ;  $44^{\circ} 18' 05.3'' W$ ), Campus do Bacanga em São Luís Maranhão (Figura 9), inspecionadas semanalmente para a substituição das palhetas e recolhimento dos ovos e encaminhados para o laboratório de óleos essenciais do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão- UFMA. Onde as larvas foram cultivadas até o estágio 3 para aplicação do ensaio biológico.

**Figura 10** - Localização da área de coleta das larvas de *Aedes aegypti*



Informações: Sistema de coordenadas planas, projeção Universal de Mercator Datum Sirgas 2000, 23 M; 45°Wgr. Base: Imagem Geoway. Fonte: Google 2017. Elaboração: Paulo Roberto Mendes Pereira.

## 4.7.2. Teste larvicida dos óleos essencial frente às larvas de *Aedes aegypti*

### 4.7.2.1. Teste piloto para atividade larvicida

Neste estudo foi realizado teste biológicos para larvas segundo o protocolo padrão (WHO, 2005). Um teste piloto com os óleos essenciais com concentrações em intervalos mais amplos (10, 50 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) a fim de verificar a existência ou não da atividade larvicida.

Foi realizado um teste piloto para o óleo essencial de cada espécie de limão, onde foram colocados 10 larvas de *Aedes aegypti* no estagio 3 expostos em soluções dos óleos em diferentes concentrações (10, 50 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e Dimetilsulfóxido (DMSO) a 2% por 24 horas. Após o termino do experimento observou-se qual concentração se aproximava de 90 a 100% da mortalidade de larvas a fim de estabelecer um intervalo mais estreito entre as concentrações para aplicar no teste larvicida propriamente dito.

#### 4.7.2.2. Teste larvicida frente às larvas de *Aedes aegypti*

A partir da metodologia recomendada pela WHO (2005), os testes foram seguidos do seguinte procedimento. Inicialmente, foi preparada uma “solução-mãe” de  $1.000\mu\text{g.mL}^{-1}$  e DMSO 2% para o óleo de cada espécie de limão. Destas soluções, foram preparadas cinco diluições de acordo com faixa encontrada no teste piloto: limão comum 50, 60, 70, 80, 90  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; limão tanja 5, 20, 35, 50, 65  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; limão galego 50, 70, 90, 130  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Paralelamente foi realizado, para o padrão Limoneno, em cinco concentrações (10, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Todos os testes foram realizados em cinco replicatas e para cada réplica foram colocadas 10 larvas e 30 mL de cada solução nas respectivas. Como controle negativo foi utilizado uma solução de DMSO a 2%.

Após 24h de exposição das larvas aos tratamentos, o número de larvas mortas foi registrado, sendo consideradas mortas aquelas que não apresentavam movimento ou não respondiam aos estímulos com a pipeta Pasteur.

#### 4.8. Análise estatística dos dados

Os dados foram analisados com o pacote estatístico Past Statistics para Windows, versão 3.25, verificando os pressupostos de normalidade de Shapiro Wilk. Foi realizada a análise de variância (One way- ANOVA) para medidas repetidas. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas para um valor de  $p < 0,05$ .

As  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  para os tratamentos (concentrações) de toxicidade frente *Artemias salinas* e teste larvicida, foram calculadas pelo GraphPad 6.0 Software, pelo método de eficácia x dose-resposta, onde os valores das concentrações foram transformados previamente para seu valor logarítmico e posteriormente feita a projeção da curva dose-resposta frente os resultados do bioensaio.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Identificação botânica das espécies

As identificações das espécies foram realizadas através de análise morfológica e comparação utilizando bancos de dados. As espécies de limão estão descritas na Tabela 1, com seus respectivos nomes populares e números de depósito.

**Tabela 1-** Nomes comuns, científicos e números de depósito das espécies de limão em estudo.

Nome popular	Nome científico	Número de depósito
Limão comum	<i>Citrus × limon</i> (L.) Osbeck	11.169
Limão tanja	<i>Citrus sp</i>	11.170
Limão galego	<i>Citrus × aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle	11.168

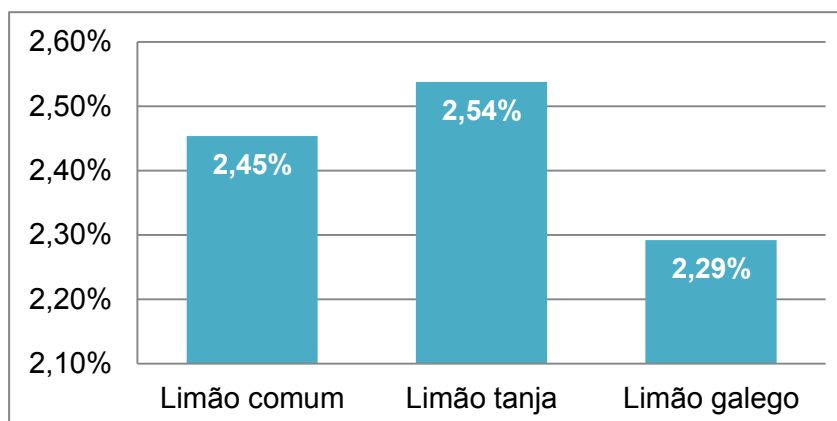
Devido a o limão tanja (*Citrus sp*) ser resultante de vários cruzamentos entre espécies, para melhor adaptação na região de cultivo, não se pode identificar a sua espécie, porém nesse estudo tomou-se o *Citrus limonia* para nível de comparação, por se aproximar mais caracteristicamente da espécie em questão e ter nomes populares semelhantes.

A identificação das plantas é muito importante, logo, há uma grande variedade de nomes populares para as diversas espécies do gênero *Citrus*, que de acordo com cada região se confundem entre si.

### 5.2. Rendimento dos óleos voláteis das espécies vegetais

Com a extração dos óleos essenciais obteve-se os volumes 2,47 mL para *Citrus × limon* (L.) Osbeck, 2,3 mL para *Citrus sp* (L. tanja) e 1,8 mL para *Citrus × aurantiifolia* (Christm.)Swingle, o que conferiu os seguintes rendimento expressos na Figura 11.

**Figura 11** - Rendimentos dos óleos essenciais extraídos das cascas de limão comum, limão tanja e limão galego.



O fato das extrações terem sido realizadas em apenas uma etapa (sem repetições) e não ser possível calcular um desvio padrão nos dados de rendimento não traz problemas ao estudo, pois o objetivo não era comparar os valores entre as diferentes espécies de limão. Assim como, as comparações com dados da literatura porque muitas são as variáveis (genéticas e edafoclimáticas) que influenciam na quantidade de óleo (PAULA et al., 2011). Por essas razões não foi realizado nenhum tratamento estatístico com o rendimento dos óleos.

A quantidade e qualidade de óleo essencial da casca de frutos cítricos dependem de vários fatores, tais como a natureza do fruto em si, proveniência genotípico, tipo de solo e clima, mas também do processo de extração. O teor de óleo na casca dos frutos cítricos varia de 0,5 a 5 %, peso/volume (TEIXEIRA; MARQUES; PIO et al., 2014).

### 5.3. Análises físico-químicas dos óleos essenciais

Resultados das análises físico-químicas dos óleos essenciais extraídos das cascas de limão comum, limão tanja e limão galego estão descritos na tabela 2.

**Tabela 2** - Resultados das análises físico-químicas dos óleos

Parâmetros Físico-Químicos	Limão comum	Limão tanja	Limão galego
Densidade (g/mL)	0,850	0.842	0.846
Solubilidade em etanol a 90%	1:3	1:3	1:3
Índice de refração (ND 25°)	1,476	1,475	1,475



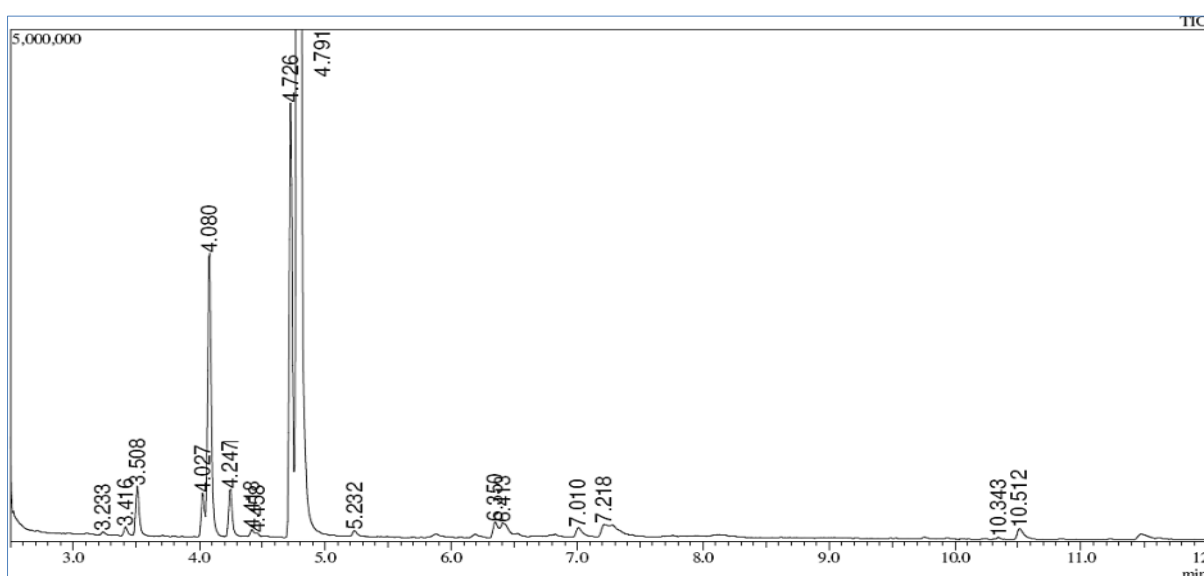
Mesmo existindo algumas variáveis que influenciam na qualidade de um óleo essencial, os óleos estudados apresentaram densidade correspondente ao que Martins (2011) cita que a Farmacopéia Européia e ISO (International Standard Organization) estabelecem para óleos essenciais de *Citrus*, um intervalo de 0,842-0,850, estando esse parâmetro físico-químico dentro dessa variação aceitável.

Os óleos estudados foram solúveis em álcool, na proporção de 1:3 por partes do óleo para partes da solução alcoólica, respectivamente. Outro parâmetro avaliado foi o índice de refração (ND 25°). Segundo Mouchrek Filho (2000), tal índice é muito importante para definir as características analíticas dos óleos essenciais e também no reconhecimento de falsificações. Os valores do índice obtido nos óleos estudados ficaram dentro da faixa de 1,470 a 1,476, recomendada também pela Farmacopéia Européia e ISO (International Standard Organization).

#### 5.4. Caracterização química dos óleos essenciais obtidas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas (CG-EM).

Através da cromatografia (Figuras 12 a 14), foram identificados os constituintes majoritários e minoritários do óleo essencial extraído das cascas das espécies de limão. No total foram identificados 17 para limão comum, 20 para limão tanja e 13 constituintes para limão galego (Tabelas 3a 5) com concentrações que variaram de 0,04 a 81.69% que corresponderam a 100% da composição dos óleos.

**Figura 12** - Cromatograma do óleo essencial de Limão comum



Fonte: AUTOR (2019).

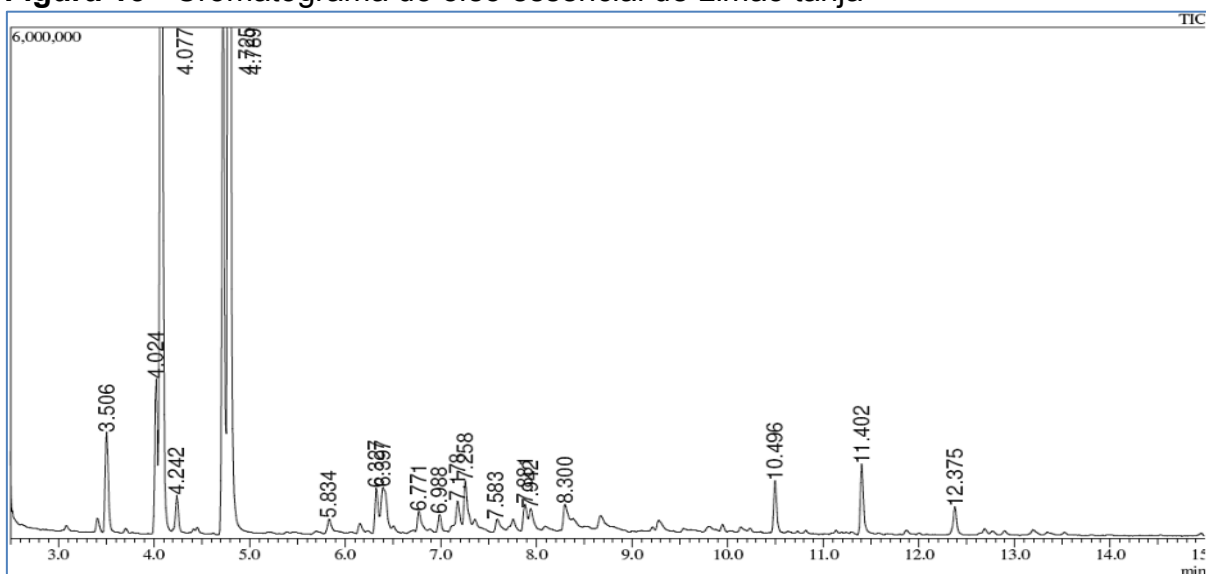
**Tabela 3** - Constituintes identificados no óleo essencial de limão comum

Pico	TR	Teor (%)	Nome
1	3.233	0.07	3-Hexen-1-ol, acetato, (Z)-
2	3.416	0.23	Biciclo[3.1.0]hex-2-eno, 2-metil-5-(1-metil
3	3.508	1.24	$\alpha$ - Pineno
4	4.027	1.11	Biciclo [3.1.0] hexano, 4-metileno-1- (1-meth
5	4.080	7.48	$\beta$ - Pineno
6	4.247	1.26	$\beta$ - Mirceno
7	4.418	0.21	Octanal
8	4.458	0.06	(6,6-Dimetilbiciclo [3.1.1] hept-2-en-2-il) metil
9	4.726	9.24	Benzeno, 1-metil-3-(1-metiletil)-
10	4.791	75.77	Limoneno
11	5.232	0.17	3-Careno
12	6.350	0.53	7-oxabicyclo [4.1.0] heptano, 1-metil-4- (1-m
13	6.413	0.60	7-oxabicyclo [4.1.0] heptano, 1-metil-4- (1-m
14	7.010	0.39	Terpinen-4-ol
15	7.218	1.11	$\alpha$ - Terpeneol
16	10.343	0.04	(E)-.beta.-Famesene
17	10.512	0.49	Biciclo [3.1.1] hept-2-eno, 2,6-dimetil-6- (4-m

Os principais constituintes dentre os 17 identificados no óleo extraído das cascas do limão comum (*Citrus × limon* (L.) Osbeck) nesse estudo, majoritário Limonene, seguido em ordem decrescente de teor, foram o Benzeno 1-metil-3-(1-metiletil)- com 9,24%,  $\beta$  - Pinenocom 7,48%,  $\beta$  - Myrcenocom 1,26%,  $\alpha$  - Pineno com 1,24% dentre outros com menor proporção.

Em um estudo de caracterização química e toxicidade de óleos essenciais de cítricos foi observado que *citrus limon* na sua constituição limoneno com 59,78%,  $\beta$  - Pinenocom 14,71%,  $\beta$  - Myrcenocom 0,54%,  $\alpha$  - Pinenocom 2,9% (MARTINS et al., 2017). Cannon et al. (2015), fazendo identificação e caracterização de novos compostos voláteis contendo Enxofre das cascas de Limão da região de Lisboa (*Citrus limon* L.) também encontrou como principais componentes do extrato de casca o limoneno (63,7%), beta-pineno (14,5%). Em um estudo correlacionando o óleo essencial de *Citrus Limon* L. com o crescimento de Tilápias, BABA et al. (2016), identificou limonene (54,4%),  $\beta$  - Pineno(8,81%),  $\alpha$  - Pineno(0,20%).

AMMAD et al. (2017), identificou apenas seis compostos para um *Citrus limon* L. coletado em abril de 2013, na região da Blida (Norte da Argélia). Dentre esses compostos encontraram limonene (61,68%) e beta-pinene (10,23%).

**Figura 13** - Cromatograma do óleo essencial de Limão tanja

Fonte: AUTOR (2019).

**Tabela 4** - Constituintes identificados no óleo essencial de limão tanja

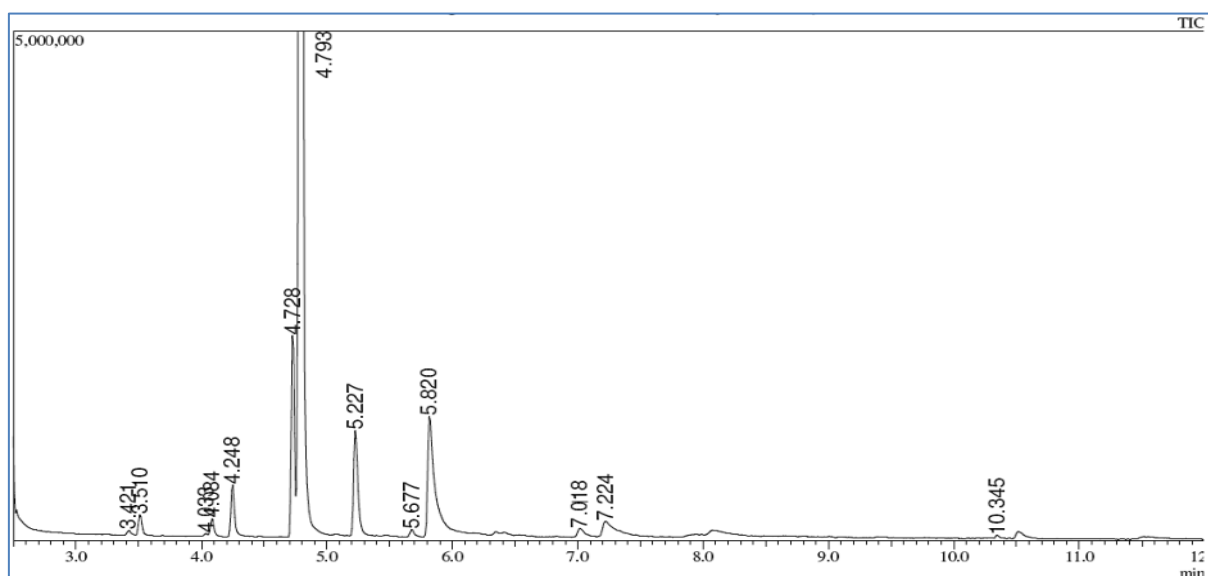
Pico	T.R.	Teor (%)	Nome
1	3.506	2.40	$\alpha$ -Pineno
2	4.024	3.01	$\beta$ -Filandro
3	4.077	23.01	$\beta$ -Pineno
4	4.242	0.83	$\beta$ -Mirceno
5	4.725	13.55	Benzeno, 1-metil-3-(1-metil,etil)-
6	4.789	44.75	Limoneno
7	5.834	0.38	Linalol
8	6.327	0.98	7-oxabicyclo [4.1.0] heptano, 1-metil-4- (1-metil)
9	6.397	1.78	7-oxabicyclo [4.1.0] heptano, 1-metil-4- (1-metil)
10	6.771	0.64	Pinocarvone
11	6.988	0.44	Terpinen-4-ol
12	7.178	0.77	L- $\alpha$ -Terpineol
13	7.258	1.20	Biciclo [3.1.1] hept-2-eno-2-metanol, 6,6-dimetil
14	7.583	0.62	2-ciclohexen-1-ol, 2-metil-5- (1-metiletano
15	7.881	0.75	2,6-Octadienal, 3,7-dimetil-, (Z)-
16	7.942	0.64	Carvona
17	8.300	0.65	2,6-Octadienal, 3,7-dimetil-, (E) -
18	10.496	1.26	Biciclo [3.1.1] hept-2-eno, 2,6-dimetil-6- (4-m
19	11.402	1.66	$\beta$ -Bisabolene
20	12.375	0.67	Óxido de cariofileno

Dentre as espécies estudadas, o limão tanja (*citrus* sp), foi o que apresentou maior número de componentes, 20 no total. Os mais relevantes foram o Limoneno com maior percentual seguido de  $\beta$  - pineno (23, 01%), benzeno, 1-methyl-3-(-1metil) (13,55%),  $\alpha$  - Pineno(2,4%), 7-oxiabicyclo[4.1.0]heptano.1-metil (2,76%) . Alguns compostos encontrados na literatura se mostram em comum com

os componentes identificados no óleo extraído das cascas do limão tanja neste estudo: limoneno (65,7%),  $\beta$  - pineno (23,01%),  $\alpha$  - Pineno(2%),  $\beta$  - mirceno (1,9%), Terpinen-4-ol (1%) e linalol (0,2%) (AMORIN et al., 2016).

Em um estudo onde avalia os efeitos esquistossomicidas do essencial de *Citrus limonia* mostrou os compostos com seus respectivos percentuais, limonene (29,9%),  $\beta$  - pineno (12,0%),  $\alpha$  - Pineno(2,1%),  $\beta$  - mirceno (3,1%) e Terpinen-4-ol (1,0%) (MOARA et al., 2016).

**Figura 14** - Cromatograma do óleo essencial de Limão galego



Fonte: AUTOR (2019).

**Tabela 5** - Constituintes identificados no óleo essencial de limão galego

Pico	T.R.	Teor (%)	Nome
1	3.421	0.13	Biciclo [3.1.0] hex-2-eno, 2-metil-5- (1-metil
2	3.510	0.54	$\alpha$ - Pineno
3	4.033	0.07	Biciclo [3.1.0] hex-2-eno, 4-metil-1- (1-metil
4	4.084	0.45	$\beta$ - Pineno
5	4.248	1.38	$\beta$ -Mirceno
6	4.728	4.66	$\rho$ - Cimeno
7	4.793	81.69	Limoneno
8	5.227	3.33	$\gamma$ -Terpinene
9	5.677	0.22	(+)-4-Careno
10	5.820	6.31	Linalol
11	7.018	0.39	Terpinen-4-ol
12	7.224	0.77	$\alpha$ -Terpineol
13	10.345	0.07	$\alpha$ -Farneceno

O óleo essencial do limão galego (*Citrus aurantifolia* Swingle) apresentou maior conteúdo de limoneno dentre as espécies estudadas, porém foi o que demonstrou menor quantidade de compostos. Foram identificados 13 componentes, nos quais se destaca limoneno (81,69%), Linalol (6,31%),  $\rho$  - Cimeno(4,66%),  $\gamma$  - Terpineno(3,33%),  $\beta$  - Mirceno(1,38%).

O óleo essencial de *Citrus aurantifolia* foi caracterizado por 49 constituintes (93,6% do óleo total) em um estudo comparativo da capacidade antioxidante e atividade inibitória da *Colinesterase*, nos quais os componentes dominantes foram os hidrocarbonetos limoneno (49,2%),  $\beta$  - Pineno(14,1%),  $\gamma$  - Terpineno (6,6%) e  $\beta$  - Mirceno(3,1%) (TUNDIS et al., 2012)

OCHOA et al. (2018), em trabalho que analisava óleos essenciais de sete tipos de plantas verificou que o limão galego (*Citrus aurantifolia* Swingle) apresentou percentuais para os componentes Limoneno (98.6%),  $\beta$  - Pineno(0.1%),  $\alpha$  - Pineno (0.1%).

Diversos fatores influenciam na qualidade e na composição química de um óleo essencial, incluindo a composição do solo, temperatura e clima de cultivo, presença de agrotóxico, época de colheita, partes utilizadas da planta, a espécie botânica, exposição ao sol, ventos e tantos outros (SANTOS et al., 2012).

Para todos os óleos de *Citrus* testados, os dados de espectros de massa revelaram que o limoneno é o principal composto nas três espécies, sendo que, o limão galego (81,69%) apresentou maior percentual em relação aos limões comum (75,77%) e tanja (44,75%) desse composto. Assim, corroboramos o que já vem sendo mostrado na literatura a respeito deste componente para as substâncias cítricas, com tudo, nota-se que o percentual de limonene difere entre os trabalhos, Campelo et al., (2013), González-Molina et al., (2010) e Mahalwal; Ali, (2003).

Dentre os componentes identificados nas três espécies de limão foram observados os seguintes compostos em comum entre elas:  $\beta$  - Pineno,  $\beta$  - Pineno,  $\beta$  - Mirceno, Limoneno e Terpineno-4-ol.

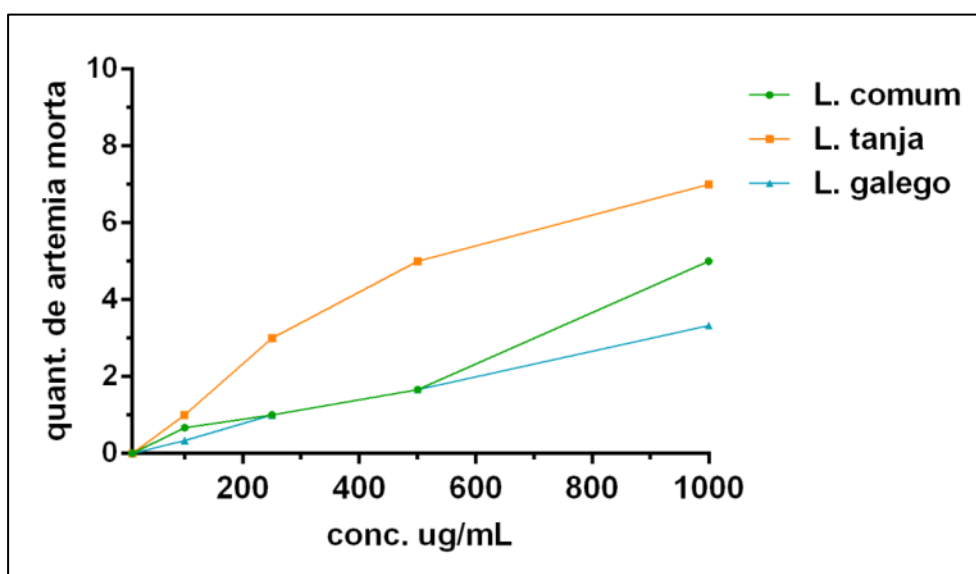
AMORIN et al. (2016), em um estudo de propriedades anti-inflamatória de óleos essenciais de espécies de *Citrus* identificou para *citrus limon*, *citrus limonia* e *citrus aurantifolia* dentre seus constituintes  $\alpha$  - Pineno(0,7%; 2%; 0,6%),  $\beta$  - Pineno(13,1%; 9%; 8,5%),  $\beta$  - Mirceno(2,7%; 1,9%; 1%), Limoneno (53,9%; 65,7%; 3,1%) e Terpineno-4-ol (0,5%; 1,0%; 1,6%) respectivamente.

Observa-se que mesmo utilizando as mesmas espécies, há uma diferença numérica entre esse estudo e a literatura. Essas variações provavelmente ocorrem devido a fatores relacionados ao método de extração dos óleos, características genéticas das espécies e condições ambientais em que foram cultivadas (ASSUNÇÃO, 2013).

### 5.5. Teste de toxicidade frente à *Artemia salina* Leach

No bioensaio para averiguar provável toxicidade frente *Artemia salina* Leach, os óleos de limão comum, limão tanja e limão galego apresentaram  $CL_{50}$  de 1032, 503,5 e 1843 $\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivamente, com 95% de confiança e  $p < 0,05$ . A Figura 15 apresenta a correlação positiva entre as concentrações dos óleos (eixo x) e a mortalidade (eixo Y).

**Figura 15** - Mortalidade de *Artemias salinas* com o aumento da concentração dos óleos essenciais.



Fonte: dados da pesquisa, plotado no software Graphpad prism 6.0

Em geral, segundo RAHMAN et al. (2001), os compostos bioativos são tóxicos às larvas de *Artemia salina* Leach. Assim, a letalidade a este microcrustáceo pode ser utilizada como um teste preliminar rápido e simples, durante o isolamento de produtos naturais. O critério estabelecido por Dolabela (1997) para classificação da toxicidade dos óleos essenciais considera um produto altamente tóxico quando  $CL_{50} \leq 80\mu\text{g.mL}^{-1}$ , moderadamente tóxico para  $80\mu\text{g.mL}^{-1} < CL_{50} < 250\mu\text{g.mL}^{-1}$  e levemente tóxico ou atóxico quando  $CL_{50} \geq 250\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

O teste de toxicidade sobre a *Artemia salina* L. é um ensaio biológico amplamente utilizado por ser rápido, confiável e de baixo custo. A relação entre o grau de toxicidade e a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *Artemia salina* L., tanto como extratos orgânicos, quanto em extratos aquosos com valores de CL<sub>50</sub> acima 1000 µg.mL<sup>-1</sup>, são considerados atóxicos, baixa toxicidade quando a CL<sub>50</sub> for superior a 500µg.mL<sup>-1</sup>; de toxicidade moderada para CL<sub>50</sub> entre 100 e 500 µg.mL<sup>-1</sup>e muito tóxico quando a CL<sub>50</sub> for inferior 100 µg.mL<sup>-1</sup> (AMARANTE, 2011).

Apesar dos avanços na área de controle de insetos vetores, ainda há muitos impedimentos quanto ao uso desses métodos. Muitas vezes por conta da escassez de experimentos científicos que determinem a toxidade destes produtos ao homem e a real possibilidade de sua utilização, considerando-se que as pesquisas já desenvolvidas objetivaram apenas a verificação da atividade larvicida desses produtos.

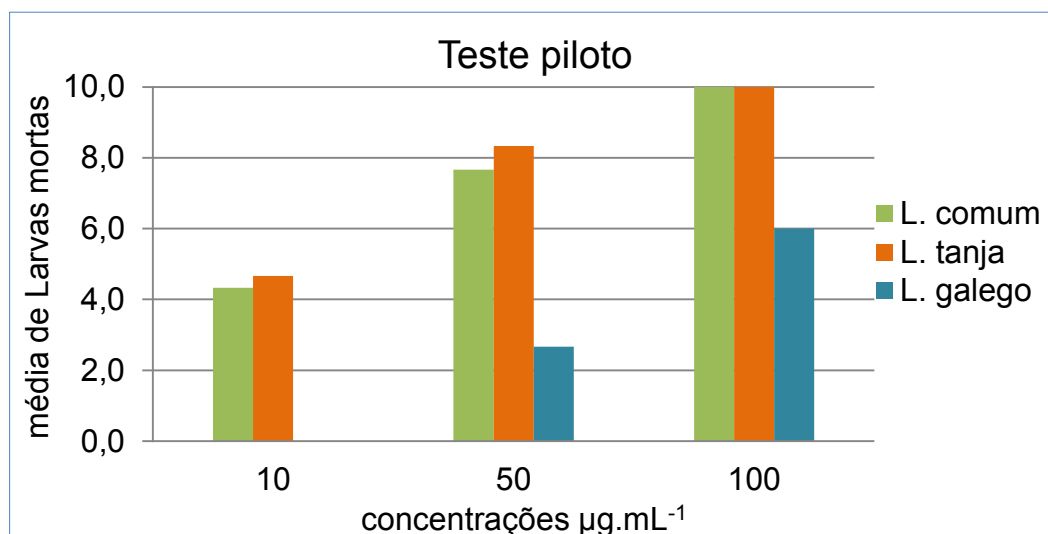
Diante dos resultados e comparando com padrões citados pela literatura, todos os óleos essenciais testados neste estudo são considerados “atóxicos”, indicando a segurança na utilização desses óleos.

## **5.6. Atividade larvicida dos óleos essenciais frente às larvas de *Aedes aegypti***

### **5.6.1. Teste piloto para a atividade larvicida**

Neste estudo foi realizado um teste piloto com os óleos essenciais nas concentrações de 10, 50 e 100 µg.mL<sup>-1</sup> a fim de verificar a existência ou não da atividade larvicida. O quantitativo de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* nas diferentes concentrações de exposição pode ser observado na Figura 16.

**Figura 16** - Mortalidade de larvas frente às concentrações de óleo das espécies de limão.



A aplicação da análise de variância (ANOVA) para o teste piloto nos óleos de limão comum, tanja e galego ( $p = 2,64 \times 10^{-4}$ ;  $p = 2,44 \times 10^{-5}$ ;  $p = 1,03 \times 10^{-4}$  respectivamente) foi observado que é significativa, existe uma correlação entre o aumento da concentração e a mortalidade das larvas de *Aedes aegypti*, mostrando que há atividade larvicida para os óleos essenciais.

Foi observado após 24h do teste piloto, que na concentração  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , houve uma baixa mortalidade de larvas para óleo de limão comum e limão tanja, sendo que para o limão galego nem apresentou mortalidade nessa concentração. Nota-se na faixa de concentração 50-100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  onde foi maior a mortalidade de larvas para os limões comum e tanja, o limão tanja alcançou 90% de mortalidade na concentração  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e limão comum acima dela, enquanto que o limão galego mostra que sua concentração para 90% de mortalidade é maior que  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### 5.6.2. Teste do potencial larvicida frente às larvas de *Aedes aegypti*

No estudo da atividade larvicida, os óleos essenciais de limão comum, tanja e galego, foram ativos frente às larvas em terceiro estágio do *Aedes aegypti* nas concentrações  $90 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $65 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $130 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, com mortalidade de 100% das larvas testadas. Embora esse resultado nos dê uma dimensão da atividade biológica, um cálculo estatístico das concentrações letais ( $CL_{50}$   $CL_{90}$ ) (tabela 4) com software Graphpad prism 6.0 conforme comunicado técnico



93 (EMBRAPA, 2016), nos deu uma estimativa de inferir este resultado para uma população, considerando uma distribuição estatística do tipo normal.

**Tabela 6** - Resultado da CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> para cada espécie de limão

Espécie	CL <sub>50</sub> µg/mL	CL <sub>90</sub> µg/mL
<i>Citrus x limon</i> (L. comum)	<b>40,22</b> (34,58 - 46,77)	<b>68,88</b> (61,77 - 76,80)
<i>Citrus x sp</i> (L. Tanja)	<b>20,26</b> (16,21 - 25,33)	<b>82,99</b> (56,39 - 122,1)
<i>Citrus x aurantiifolia</i> (Christm.) (L. galego)	<b>69,71</b> (65,86 - 74,05)	<b>115,3</b> (102,2 - 130,0)

Nota: Os números entre parênteses são referentes ao intervalo de confiança da [CL<sub>50</sub>] e [CL<sub>90</sub>] a 95% de significância.

A WHO (2005), não estabelece uma faixa de concentração padrão para determinar a eficácia da atividade larvicida de produtos naturais. No entanto, Komalamisra et al., (2005) consideram potenciais larvicidas baseados em produtos naturais com CL<sub>50</sub> < 50 µg.mL<sup>-1</sup> como ativo, 50 µg.mL<sup>-1</sup> < CL<sub>50</sub> < 100 µg.mL<sup>-1</sup> como moderadamente ativo, 100 µg.mL<sup>-1</sup> < LC<sub>50</sub> < 750 µg.mL<sup>-1</sup> como efetivo, e LC<sub>50</sub> > 75 µg.mL<sup>-1</sup> como inativo.

Kiran et al. (2006), consideram os compostos com CL<sub>50</sub> < 100 µg.mL<sup>-1</sup> como aqueles com um efeito larvicida significativo. De acordo com Cheng et al. (2003) a atividade larvicida do óleo essencial é ativa quando a CL<sub>50</sub> < 100 µg.mL<sup>-1</sup>; inativa quando a CL<sub>50</sub> > 100 µg.mL<sup>-1</sup> e altamente ativa quando a CL<sub>50</sub> < 50 µg.mL<sup>-1</sup>.

Observando os resultados apresentados na Tabela 4 e comparando com as classificações da literatura supracitada, os óleos essenciais extraídos das cascas das espécies de limão são considerados biologicamente ativos frente às larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti*.

Os resultados obtidos neste trabalho são inéditos para *Citrus aurantiifolia* e complementam os de *Citrus limone* e *Citrus limonia* Osbeck descritos na literatura. Os estudos de Amer e Mehlhorn (2016) e de Oliveira (2013), confirmaram que há atividade contra larvas em terceiro estágio do *Aedes aegypti* dos óleos essenciais extraídos das cascas de *Citrus limon*, com boas CL<sub>50</sub>, 95 µg.mL<sup>-1</sup> e 10 µg.mL<sup>-1</sup> respectivamente.

No entanto, os valores do óleo de Limão tanja diferem dos altos valores encontrados por Cavalcanti et al. (2004), utilizando o óleo essencial de *Citrus limonia*

Osbeck (Limão tanja) com uma  $CL_{50}$  de  $519 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  contra larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti*.

A atividade larvicida de óleos essenciais é influenciada por diversos fatores. Um estudo realizado por (Fernandez et al., 2014) mostra que a atividade larvicida é maior nas estações primavera, verão e outono, e menor no inverno, confirmando assim a influência da sazonalidade, sendo a possível causa da diferença entre esses estudos.

Alguns estudos dizem que a potencialidade biológica de cada óleo essencial varia segundo a espécie vegetal, a origem, a composição e os mecanismos de ação contra a praga em questão (LEYVA, 2009; TELES, 2009).

Observando os percentuais dos compostos em comum entre as três espécies de limão (Tabela 7), nota-se que para óleos essenciais que mostraram maiores quantidades desses compostos obtiveram melhor atividade larvicida, tendo uma proporcionalidade no aumento da CL em relação ao o aumento dos percentuais desses compostos.

**Tabela 7** - Percentuais dos compostos em comum entre as espécies e suas respectivas  $CL_{50}$

Composto	Teor do composto (%)		
	L. comum	L. tanja	L. galego
$\alpha$ - Pineno	1,24	2,40	0,54
$\beta$ - Mirceno	1,26	0,83	1,38
$\beta$ - Pineno	7,48	23,01	0,45
Limoneno	75,77	44,75	81,69
Terpinen-4-ol	0,39	0,44	0,39

A literatura mostra atividade biológica frente às larvas de *Aedes aegypti* para alguns desses compostos, Limoneno (Govindarajan et al. (2012), Cheng et al. (2013), Park et al. (2011);  $\alpha$ -Pineno Perumalsamy et al. (2009), Cheng et al. (2009), Michaelakis et al., 2009;  $\beta$ -Pineno Govindarajan ( 2010 ), Perumalsamy et al. (2009); Terpinen-4-ol Perumalsamy et al. (2009), indicando atividade sinérgica entre os compostos. Todavia, não foram realizados nesses estudos o teste de toxicidade para esses compostos para que sejam utilizados de forma isolada.

O óleo essencial do limão tanja, em relação ao de limão comum e ao limão galego apresentou maiores percentuais desses compostos ( $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -Pineno,  $\beta$ -Mirceno, Limoneno e Terpinene-4-ol), sendo a possível causa do seu

melhor potencial larvicida, pois mostrou a melhor  $CL_{50}$  frente às larvas de *Aedes aegypti*.

A utilização de compostos vegetais no controle de vetores é um campo promissor na atualidade, apresentando inúmeras vantagens e impactos. Aponta-se como impacto ambiental sua rápida degradação, diminuindo as chances de permanência no ambiente e intoxicação aos outros organismos que não são alvos, assim como o menor índice de desenvolvimento de resistência pelos vetores.

## 6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos nas análises realizadas com os óleos essenciais extraídos das cascas das espécies *Citrus x limon* (L.) Osbeck, *Citrus x sp* e *Citrus x aurantiifolia* (Christm.) Swingle, concluiu-se que:

Os rendimentos tiveram valores considerados bons para extração por hidrodestilação segundo a literatura e quanto à qualidade, os parâmetros físico-químicos avaliados apresentaram resultados satisfatórios segundo a Farmacopeia e a ISO.

A caracterização por CG-EM permitiu a identificação dos componentes presentes nos óleos essenciais, além de identificar o componente majoritário dos óleos como sendo o Limoneno, o que se mostrou compatível com os dados encontrados na literatura.

As baixas toxicidades desses óleos frente às *Artemias Salinas* indicam a possibilidade de uso desses produtos, se traduzindo em vantagem por ser um procedimento menos agressivo ao meio ambiente.

Os resultados obtidos no teste larvicida demonstraram que os óleos essenciais de *Citrus x limon* (limão comum), Osbeck, *Citrus sp* (Limão tanja) e *Citrus x aurantiifolia* (Christm.) Swingle (limão galego) tiveram ação larvicida significativa contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti* testados. Isto indica, portanto, boas perspectivas para uso experimental desses óleos no controle de arboviroses (Dengue, Febre Chikugunia, Zika e Febre Amarela) transmitidas por esse vetor.

## REFERÊNCIAS

- AMARANTE, C. B.; MÜLLER, A.H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazônica**, v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011.
- AMORIM, J.L.; SIMAS, D.L.R.; PINHEIRO, M.M.G.; MORENO, D.S.A.; ALVIANO, C.S.; SILVA, A.J.R.; FERNANDES, P.D. Anti-Inflammatory Properties and Chemical Characterization of the Essential Oils of Four Citrus Species. **PLOS ONE**, v.11, n.4, p. 1-18, abr. 2016.
- ASSUNÇÃO, G. V. Caracterização química e avaliação da atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* do óleo essencial da espécie *Citrus sinensis* L. Osbeck (laranja doce). 2013. 97f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós- Graduação em Química, 2013.
- BABA, E.; ACAR, Ü.; ÖNTAŞ, C.; KESBIÇ, O. S.; YILMAZ, S. Evaluation of Citrus limon peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. **Aquaculture**, v. 465, p. 13-18, dez. 2016.
- BRASIL. **Microcefalia: causas, sintomas, tratamento e prevenção**. Ministério da saúde, 2018. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/microcefalia>. Acesso em: 21 jun. 2018.
- BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. **Boletim Epidemiológico**, v. 50, n. 5, 2019. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/26/2019-004-Dengue-SE-5-publica---o-18-02-2019.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança**. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2016, 58 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia relacionada à infecção pelo vírus Zika**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015, 55p.
- CAETANO, B. **Siciliano, tahiti, galego e cravo: veja as diferenças entre os tipos de limão**. Minha vida, 2017. Disponível em: <https://www.minhavidacom.br/alimentacao/galerias/31642-siciliano-tahiti-galego-e-cravo-veja-as-diferencas-entre-os-tipos-de-limao>. Acesso em: 05 maio 2019.
- CAMPELO, L. M. L.; SÁ, C. G.; FEITOSA, C. M.; SOUSA, G. F.; FREITAS, R. M. Constituintes químicos e estudos toxicológicos do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus limon* Burn (Rutaceae). *Rev. Bras. Plantas Med.*, Campinas, v.15, n.4, p.708-716, 2013.
- CAMPOS G.S.; BANDEIRA A.C.; SARDI S.I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Diseases*, v. 21, n. 10, p. 1885-1886, out. 2015. Disponível em: [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/10/15-0847\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/10/15-0847_article). Acesso em: 3 nov. 2018.

CANNON, R. J.; KAZIMIERSKI, A.; CURTO, N. L.; LI J.; LAURENCE TRINNAMAN, A. J.; JANCZUK, D. A.; DA COSTA, N. C.; CHEN, MI. Z. Identification, Synthesis, and Characterization of Novel Sulfur Containing Volatile Compounds from the In-Depth Analysis of Lisbon Lemon Peels (*Citrus limon* L. Burm. f. cv. Lisbon). **J. Agric. Food Chem.**, v 63, n.7, p. 1915–1931, 2015.

CARDOSO C.W.; PAPLOSKI I.A.; KIKUTI M.; RODRIGUES M.S.; SILVA M.M.; CAMPOS G.S.; Outbreak of exanthematous illness associated with Zika, Chikungunya, and Dengue viruses, Salvador, Brazil. **Emerg Infect Diseases**, v. 21, n 12, Dez. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4672408/>. Acesso em: 3 nov. 2018.

CARVALHO, F. D.; MOREIRA, L. A. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species?. **Neotrop Entomol**, Minas Gerais, v 46. p. 243 – 255, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13744-017-0520-4>. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/18660/2/Fabiano.pdf/>. Acesso em: 3 nov. 2018.

CASSADOU, S.; BOUCAU, S.; PETIT-SINTUREL, M.; HUC, P.; LEPARGOFFART, I.; LEDRANS, M. Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. **Euro Surveill**, v. 19, n.13, p.2752, 2014.

CAVALCANTE, K. R. L. J.; TAUIL, P. L. Risco de reintrodução da febre amarela urbana no Brasil. Artigo de opinião. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 26, n.3, Jul-Sep. 2017. Disponível em: [https://www.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2237-96222017000300617&lng=en&lng=en&gathStatIcon=true#](https://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222017000300617&lng=en&lng=en&gathStatIcon=true#). Acesso em maio 2019.

Cavalcanti, E.S.B.; Morais, S.M.; Lima, M.A.; Santana, E.W.P. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti*. L. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 99, p. 541- 544, 2004.

CELI, R. **Reino Plantae: principais características e classificações**. Stoodi, 2019. Disponível em: <https://www.stoodi.com.br/blog/2019/02/20/reino-plantae/>. Acesso em: 05 maio 2019.

CHANTAWEE, A.; SOONWERA, M. Efficacies of four plant essential oils as larvicide, pupicide and oviposition deterrent agents against dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* Linn (Diptera: Culicidae). **Asian Pac. J. Trop Biomed.**, v. 8, n. 4, p. 217-225, 2018. Disponível em: <http://www.apjtb.org/text.asp?2018/8/4/217/231284>. Acesso em: 08 maio 2019.

CHENG, S.S.; CHANG, H.T.; CHANG, S.T.; TSAI, K.H.; CHEN, W.J. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresour Technol**, v. 89, n. 1, p. 99-102, ago. 2003.

CONTI, B.; FLAMINI, G.; CIONI, P.L.; CECCARINI, L.; MACCHIA, M.; BENELLI, G. Mosquitocidal essential oils: Are they safe against non-target aquatic organisms?. **Parasitol Res.**, v. 113, n.1, p. 251-259, 2014.

COSTA, F.; SILVA, J.; SOUZA, C.; MENDES, J. Dinâmica populacional de *Aedes aegypti* (L) em área urbana de alta incidência de dengue. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberlândia, v.41, n.3, p.309-312, 2018.

COSTA, Z. G. A, ROMANO, A.P.M; ELKHOURY, A.N.M; FLANNERY, B. Evolução da história da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. **Rev Pan-Amaz Saúde**. v. 2, p. 11-26, 2011.

CURK, F.; OLLITRAULT, F.; GARCIA-LOR, A.; LURO, F.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P. Phylogenetic Origin of Limes and Lemons Revealed by Cytoplasmic and Nuclear Markers. **Annals of Botany**, v.117, n. 4, p. 565–583, abr. 2016.

DIFERENÇA. **Tipos de limão**. Diferença, 2017. Disponível em: <https://www.diferenca.com/tipos-de-limao-e-suas-caracteristicas/>. Acesso em: 05 maio 2019.

DOLABELA, M. F. **Triagem in vitro para a atividade antitumoral e anti- T.cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. 1997. 128p.Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

FARNESI, LC.; MARTINS, A.J.; VALLE, D.; REZENDE, G.L. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.104, n.1, p.124–126, 2009.

FAULL, K.J.; WILLIAMS, C.R. Intraspecific variation in desiccation survival time of *Aedes aegypti* (L.) mosquito eggs of Australian origin. **J Vector Ecol**, v. 40, p.292–230, 2015.

FERNANDEZ, C. M. M., BARBA, E. L., FERNANDEZ, A. C. M., CARDOSO, B. K., BORGES, I. B., TAKEMURA, O. S.;Gazim, Z. C. Larvicidal Activity of Essential Oil from *Tetradenia riparia* to Control of *Aedes aegypti* Larvae in Function of Season Variation. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(5), 813–823. 2014. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.89284>.

FONSECA, E.O.L.; MACORIS, M.L.G.; SANTOS, R.F.; MORATO, D.G.; ISABEL, M. D.S. S.; CERQUEIRA, N.A.; MONTE-ALEGRE, A.F. Estudo experimental sobre a ação de larvicidas em populações de *Aedes aegypti* do município de Itabuna, Bahia, em condições simuladas de campo. **Epidemiol. Serv. Saude, Brasília**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2019.

FREITAS, A.R.R.; ANGERAMI, R.N.; ZUBEN, A.P.B.V.; DONALISIO, M.R. Introduction and transmission of zika virus in brazil: new challenges for the americas. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 58, n. 24, ago. 2016.

GARCIA-LOR, A.; CURK, F.; MORILLON, R.; SNOUSSI, H.; ANCILLO, G.; LURO, F.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P. A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the “true citrus fruit trees” group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. **Annals of Botany**, v. 111, n. 1967, p. 1-19, 2013.

GONZÁLEZ-MOLINA, E.; DOMÍNGUEZ-PERLES, R.; MORENO, D. A.; GARCÍA-VIGUERA, C. Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 327–345, 2010.

GOUVÊA, M. M. Time-spatial model on the dynamics of the proliferation of *Aedes aegypti*. [Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation](#), v. 44, p. 130-143, mar. 2017.

GREGORY, C.; ODUYEBO, T.; BRAULT, A.; BROOKS, J.; CHANG, K.W.; HILLS, S.; KUEHNERT, M.; MEAD, P.; MEANEY-DELMAN, D.; RABE, I.; et al. Modes of transmission of Zika virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n.10, p.875 - 883, dez. 2017.

HALSTEAD, S. B. Reaparecimento do chikungunya, anteriormente chamado de dengue, nas Américas. **Emerg Infect Dis.**, v. 21, n. 4, p. 557-61, 2015.

HARTMANN, I.; SILVA, A.; WALTER, M. E.; JEREMIAS, W. J. Investigação do Efeito Larvicida de *Petiveria alliacea* (Guiné) sobre as Larvas de Mosquitos da Espécie *Aedes Aegypti*. **Rev. Virtual Quim.**, 2018, v. 10, n.3, p. 529-541, 2018.

Instituto Oswaldo Cruz. Dengue, vírus e vetor: curiosidades sobre o *Aedes Aegypti*. Disponível em <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/curiosidades.html>. Acesso em dez de 2018.

JAVED, F.; MANZOOR, K.N.; ALI, M.; HAQ, I.U.; KHAN, A.A.; ZAIB, A.; MANZOOR, S. Zika virus: what we need to know?. **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 1, p.3-16, set. 2017.

JOHANSSON M.A.; VASCONCELOS, P.F.; STAPLES, J.E.; Todo o iceberg: estimar a incidência da infecção pelo vírus da febre amarela a partir do número de casos graves. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. V. 108, p. 482-487, 2014.

KIRAN, S.R.; BHAVANI, K.; DEVI, P.S.; RAO, B.R.R.; REDDY, J. Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Bioresource Technology**, v. 97, n.18, p.2481-2484, 2006.

KOMALAMISRA, N.; TRONGTOKIT, Y.; RONGSRIYAM, Y.; APIWATHNASORN, C. Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. **Southeast Asian Journal Trop Med Public Health**, v.36, n.6, p.1412-1422, 2005.

KOTSAKIOZI, P.; EVANS, B.; GLORIA-SORIA, A.; KAMGANG, B.; MAYANJA, M.; LUTWAMA, J.; GOFF, G.; AYALA, D.; PAUPY, C.; BADOLO, A.; PINTO, J.; SOUSA, C.; TROCO, A.; POWELL, J. Population structure of a vector of human diseases: *Aedes aegypti* in its ancestral range, Africa. **Ecology and Evolution**, New Haven, v.8, n.16, p.7835-7848, 2018.

KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Potencial Inseticida de Plantas da Família Annonaceae. In: **V Congresso Internacional & Encontro Brasileiro sobre Annonaceae**, Botucatu - SP, v. 36, p. 224-243, Janeiro 2014.



KUNO, G.; ENNIFER, R. H.; Re-examination of the history of etiologic confusion between dengue and chikungunya. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n.11, p.1-11, nov. 2015.

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

LIMA-CAMARA, T.N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 50, n. 36, mar. 2016.

LIMA-CAMARA, T.N.; URBINATTI, P.R.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. Encontro de *Aedes aegypti* em criadouro natural de área urbana, São Paulo, SP, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v.50, n. 3, jun. 2016.

LOPES, J.M.S.; DÉO, T.F.G.; ANDRADE, B.J.M.; GIROTO, M.; FELIPE, A.L.S.; JUNIOR, C.E.I.; BUENO, C.E.M.S.; SILVA, T.F.; LIMA, F.C.C. Importância Econômica do Citros no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Ano X, n. 20, dez. 2011.

MAHALWAL, V. S.; ALI, M. Constituintes voláteis das frutas Cascas de limão cítrico (Linn) Burm. F. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 6, n.1, p.31–35, 2003.

MANSUY, J.M.; SUBERBIELLE, E.; CHAPUY-REGAUD, S.; MENGELLE, C.; BUJAN, L.; MARCHOU, B.; DELOBEL, P.; GONZALEZ-DUNIA, D.; MALNOU, C.E.; IZOPET, J.;MARTIN-BLONDEL, G. Zika virus in semen and spermatozoa. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 10, p. 1106–1107, out. 2016.

MARTÍNEZ DE SALAZAR, P.; SUY, A.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; RODÓ, C. SALVADOR, F.; MOLINA, I. Zika fever. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 34, n. 4, p.247–52, abr. 2016.

MERÊNCIO, I.; TASCA, F.; VIEIRA, C. Indicadores socioambientais de focos do *Aedes aegypti* no extremo sul de Santa Catarina. **Acta Brasiliensis**, v.2, n.2, p.53-57, 2018.

MEYER B.N.; FERRIGNI N.R.; PUTNAM L.B.; JACOBSEN L.B.; NICHOLS D.E.; MCLAUGHLIN J.L; Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med.**, v. 45, n.5, p. 31-45, 1982.

MICHAELAKIS, A.; PAPACHRISTOS, D.;, KIMBARIS, A.; KOLIOPOULOS, G.; GIATROPOULOS, A.; POLISSIOU, M. G. *Citrus* essential oils and four enantiomeric pinenes against *Cx. pipiens* (Diptera: *Culicidae*). **Parasitol Res.** v.105 n.3, p769–773, 2009.

MIGLIORINI, A.A.; CONTADOR, M.H.; CARVALHO, F.K.; MARQUES, J.A. Polifenóis do Limão-Cravo: Otimização do Processo de Extração. *In: XXV Encontro Anual de Iniciação Científica*, 2016. Londrina-PR, 2016.

MILLEZI A.F.; BAPTISTA N.N.; CAIXETA D.S.; ROSSONI D.F.; CARDOSO M.G.; PICCOLI R.H. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.1, p.18-24, 2014.

MIRANDA, C.A.S.F.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; RODRIGUES, L.M. A.; FIGUEIREDO, A.C.S. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016.

MOHAMED, A.A.; EL-EMARY, G.A.; ALI, H.F. Influence of some citrus essential oils on cell viability, glutathione-s-transferase and lipid peroxidation in Ehrlich ascites Carcinoma cells. **Journal of American Science**, v. 6, p. 820–826, 2010.

NARANG, N.; JIRAUNGKOORSKUL, W. Anticancer activity of key lime, *Citrus aurantifolia*. **Rev. Pharmacogn**, v. 10, n. 20, p. 118–22, jul.-dec. 2016.

NAVARRO-SILVA, M. A.; MARQUES, F. A.; DUQUE, J. E. L. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 53, n.1, p.1-6, 2009.

NOGUEIRA, R.C.; CERQUEIRA, H.F.; SOARES, M.B.P. Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. **Expert Opinion Ther Pat.**, v. 20, n. 2, p. 145-157, fev. 2010.

OLIVEIRA, M. B.. **Extraction, characterization and evaluation of larvicidal activity essential oil of linnaeus citrus limon (lemon) front mosquito Aedes aegypti**. 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2013.

OLIVEIRA, R. L. Biologia e comportamento do vetor. *In*: VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; CUNHA, R. V. da (Org.). **Dengue: teorias e práticas**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2015. Cap. 3. p. 75-92.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Epidemiological Update**: Neurological syndrome, congenital anomalies and Zika virus infection. Pan American Health Organization, World Health Organization, jan. 2016.

PARK, H.M.; KIM, J.; CHANG, K.S.; KIM, B.S.; YANG, Y.J.; KIM, G.H.; SHIN, S.C.; PARK, I.K. Larvicidal activity of Myrtaceae essential oils and their components against *Aedes aegypti*, acute toxicity on *Daphnia magna*, and aqueous residue. **J Med Entomol**, v. 48, p. 405-10, 2011.

PEREIRA, Á.I.S.; PEREIRA, A. G.S.; LOPES SOBRINHO, O.P.; CANTANHEDE, E.K.P.; SIQUEIRA, L.F.S. Atividade antimicrobiana no combate as larvas do mosquito *Aedes aegypti*: Homogeneização dos óleos essenciais do linalol e eugenol. **Educ. quím.**, v. 25, n. 4, p. 446-449, 2014.

PIRES, L. K. S.; GRISOTTO, M. G.; GRISOTTO, R. F. O uso de plantas da Amazônia na produção de bioprodutos para tratamentos de pele. **Rev. Investig. Bioméd.**, São Luis, v. 9, p.78-88, 2017.

RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M. I.; THOMSON, W. J. **Bioassay techniques for drug development**. 1 ed. Amsterdam: Harwood academic publishers, 2001. 214 p.

REDA, S.Y.; LEAL, E.S.; BATISTA, E.C., BARANA, A.C.; SCHNITZE, E.; CARNEIRO, P.I.B. Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (*Citrus*

limonia Osbeck) e limão siciliano (*Citrus limon*), um resíduo agroindustrial. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 672-676, out.-dez. 2005.

RIBEIRO, M. S. **Análise comparativa entre as metodologias de monitoramento da infestação do *Aedes aegypti*, associadas à transmissão de dengue nos municípios de Itaboraí e Guapimirim, Rio de Janeiro**. 93f. 2013. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro.

ROSA, C.S.; VERAS, K.S.; SILVA, P.R.; LOPES NETO, J.J.; CARDOSO, H.L.M.; ALVES, L.P.L.; BRITO, M.C.A.; AMARAL, F.M.M.; MAIA, J.G.S.; MONTEIRO, O.S.; MORAES, D.F.C. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 18, n. 1, p. 19-26, 2016.

SAAD, G. A; LÉDA, O. P. H.; SÁ, I. M.; SEIXLACK, A. C. C. **Fitoterapia popular contemporânea: tradição e ciência na prática clínica**. 1º d. Elsevier, 2009. 402p.

SANTOS, V.M.C.S.; SCHNEIDER, T.R.; BIZZO, H.R.; DESCHAMPS, C.. Alternativas de propagação na produção de óleo essencial de *Mentha canadensis* L. no Litoral Norte Catarinense. **Rev. bras. plantas med.**, v.14, n.1, p. 97-102, 2012.

SANTOS-LIMA, T.M.; SANTOS, D.R.V.; SOUZA, R.M.; BASTOS, N.G.; VANNIER-SANTOS, M.A.; NUNES, E.S.; DIAS-LIMA, A.G. Plantas medicinais com ação antiparasitária: conhecimento tradicional na etnia. **Rev. Bras. Pi. Med.**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 240-247, 2016.

SEGONDY, M. Arboviroses à risque de transmission autochtone en France métropolitaine. **Revue Francophone des Laboratoires**, v. 2016, n. 487, p.35-46, dez. 2016.

SERRALVES. **Citrus limon (L.) Burm. fil.** Serralves, 2015. Disponível em: [serralves.ubiprism.pt/documentos/especie/945/download](http://serralves.ubiprism.pt/documentos/especie/945/download). Acesso em: 05 maio 2019.

SILVA, M. O. M. D.; FARIAS, E.T.N.; SANTOS, E.M.; NASCIMENTO, J.E.A.; SILVA, G.O.M.; SILVA, L.A. Plantas medicinais – conhecendo e valorizando os recursos naturais da caatinga, no alto do capibaribe. *In: XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX*, 2013. Recife: [s.n.]. 2013.

SPENCER, J.L.; LAHON, A.; TRAN, L.L.; ARYA, R.P.; KNEUBEHL, A.R.; VOGT, M.B.; XAVIER D.; ROWLEY DR.; KIMATA JT.; RICO-HESSE RR. Replication of Zika Virus in Human Prostate Cells: A Potential Source of Sexually Transmitted Virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 217, n.4,p.538–547, fev. 2018.

SUMMER J. **The natural History of Medicinal Plants**. Timber Press, Portland, Oregon, 2000.

SUSHEELA, P.; RADHA, R.; PADMAPRIYANGA, S. Evaluation of larvicidal action of natural extracts on mosquito larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **International Journal of Mosquito Research**, v. 3, n. 6, p. 26-30, 2016.

TEIXEIRA, J. P. F.; MARQUES, M. O. M.; PIO, R. M. Caracterização dos óleos essenciais em frutos de nove genótipos de tangerina. **Citrus Research & Technology, Cordeirópolis**, v. 35, n.1, p. 1-10, 2014.

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.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M.R; BONESI, M.; MENICHINI, F.; MASTELLONE, V.; COLICA, C.; MENICHINI, F. Comparative Study on the Antioxidant Capacity and Cholinesterase Inhibitory Activity of Citrus aurantifolia Swingle, C. aurantium L., and C. bergamia Risso and Poit. Peel Essential Oils. **Journal of Food Science**, v. 77, p 40-46, 2012.

WANG, W.; WU, N.; ZU, Y.G. Antioxidative activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil compared to its main components. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1019-1022, jun. 2008.

WEAVER S.C.; LECUIT M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito borne disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 372, n.13, p.1231-1239, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **A Toolkit for national dengue burden estimation**. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO, 2018.