

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ÓLEO ESSENCIAL DOS BOTÕES FLORAIS DO CRAVO-DA-ÍNDIA
(*Syzygium aromaticum*): EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
LARVICIDA FRENTE AO *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).**

ALEXANDRE ALBUQUERQUE DO NASCIMENTO

São Luís - MA - Brasil

2012

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ÓLEO ESSENCIAL DOS BOTÕES FLORAIS DO CRAVO-DA-ÍNDIA
(*Syzygium aromaticum*): EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
LARVICIDA FRENTE AO *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).**

**ALEXANDRE ALBUQUERQUE DO
NASCIMENTO**

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

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho.

São Luís – MA – Brasil

2012

**ÓLEO ESSENCIAL DOS BOTÕES FLORAIS DO CRAVO-DA-ÍNDIA
(*Syzygium aromaticum*): EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
LARVICIDA FRENTE AO *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).**

ALEXANDRE ALBUQUERQUE DO NASCIMENTO

BANCA EXAMINADORA

Aprovada em: / /

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

Prof^a. Dr^a. Aldaléa Lopes Brandes Marques
Doutora em Química Analítica - UFMA

Prof. Dr. Salvador Claro Neto
Doutor em Química Analítica – USP – São Carlos

DEDICO ESTE TRABALHO

A **Deus** pelo maravilhoso dom da existência. Permitindo que eu tenha valiosos momentos com pessoas maravilhosas...

Meus pais **Bonifácio e Fátima**, por todo amor e atenção incondicionais dedicados a mim e a meus irmãos...

Meus irmãos **Eduardo e Isabele** pelos bons momentos de carinho e amizade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por todas as coisas boas que acompanham minha vida.

A meus pais Bonifácio e Fátima pelo amor, cuidado, atenção e dedicação com que me tratam ao longo de minha vida.

Aos meus irmãos Eduardo e Isabele que estão sempre ao meu lado e minhas avós Luzia (*in memorian*) e América pelo amor que sempre dedicaram a mim.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho pela orientação sempre dedicada e prestativa, não somente neste trabalho, mas também em meus trabalhos de conclusão de curso de graduação e de especialização.

A minha namorada Leilany pelo companheirismo e lealdade demonstrados a todo momento.

Aos meus grandes amigos de Balsas-MA: Rodrigo, Márcio, Armando, Ederson, Maurício, Camilo, Eduardo, Claudinho, Danilo, Gernando, Marcelo, Sérgio, Thiago, Glauber e Zé Orlando (*in memorian*), por serem para mim exemplos de que a amizade verdadeira existe.

Aos amigos da UFMA: Acácio, Marcos, Márcio, Wandson, Marcelo, Maurício, Marlucy, Daniele, Sakae, Jefferson, Hawbertt, Andreson, Neto, Diana, Alyne, Lia, Thamara, Leonildes e Nira pelos bons momentos passados juntos.

Aos amigos do pavilhão tecnológico, em especial Marlucy, Leandra, Waléria e Silvio Marinho pela ajuda direta neste trabalho.

Aos professores e funcionários da Pós-Graduação em Química da UFMA.

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

“Não é nossa função controlar todas as marés do mundo, mas sim fazer o que pudermos para socorrer os tempos em que estamos inseridos, erradicando o mal dos campos que conhecemos, para que aqueles que viverem depois tenham terra limpa para cultivar. Que tempo encontrarão não é nossa função determinar.”

J. R. R. Tolkien

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
CAPÍTULO 1	
1 – INTRODUÇÃO.....	2
CAPÍTULO 2	
2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	6
2.1 – PLANTAS MEDICINAIS.....	6
2.2 – ÓLEOS ESSENCIAIS.....	8
2.2.1 – Processos de Extração.....	11
2.2.1.1 – Extração por Enfloração.....	12
2.2.1.2 – Extração por Prensagem.....	12
2.2.1.3 – Extração com Solventes Orgânicos.....	12
2.2.1.4 – Extração por Fluido Supercrítico.....	13
2.2.1.5 – Extração com Arraste por Vapor D'água.....	13
2.3 – CRAVO-DA-ÍNDIA (<i>Syzigium aromaticum</i>).....	14
2.4 – ASPECTOS SOBRE O EUGENOL.....	16
2.5 – TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	18
2.5.1 – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de massas.....	18
2.6 – A DENGUE.....	20
2.6.1 – Considerações Sobre o Mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	22
2.6.2 – O Ciclo de Vida do <i>Aedes aegypti</i>.....	24
2.6.2.1 – O ovo.....	25
2.6.2.2 – A larva.....	26
2.6.2.3 – A pupa.....	26
2.6.2.4 – O adulto.....	27

CAPÍTULO 3	
3 – OBJETIVOS.....	30
3.1 – GERAL.....	30
3.2 – ESPECÍFICOS.....	30
CAPÍTULO 4	
4 – PARTE EXPERIMENTAL.....	32
4.1 – EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	32
4.1.1 – Sistema Extrator.....	32
4.1.2 – Moinho Elétrico.....	33
4.1.3 – Refratômetro.....	33
4.1.4 – Balança Analítica.....	34
4.2 - PROCEDIMENTOS REALIZADOS NA EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	34
4.2.1 – Obtenção dos botões florais do cravo-da-índia.....	34
4.2.2 – Moagem.....	35
4.2.3 – Extração, tratamento e armazenamento do óleo Essencial.....	35
4.3 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL.....	36
4.3.1 – Densidade.....	36
4.3.2 – Solubilidade em Etanol (90%).....	36
4.3.3 – Índice de Refração.....	37
4.3.4 – Cor e Aparência.....	37
4.4 – ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL.....	37
4.4.1 – Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS).....	37
4.4.1.1 – Determinação pelo Método da Normalização.....	38
4.5 – OBTENÇÃO E CULTIVO DAS LARVAS.....	38
4.6 – TESTE DE TOXICIDADE.....	39
4.6.1 – Análise Estatística.....	40
CAPÍTULO 5	
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43

5.1 – AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA.....	43
5.2 – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	46
5.2.1 – Análise por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas.....	46
5.3 – ATIVIDADE LARVICIDA.....	54
CAPÍTULO 6	
6 – CONCLUSÃO.....	66
CAPÍTULO 7	
7 – PERSPECTIVAS FUTURAS.....	68
REFERÊNCIAS.....	69

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

CG	Cromatografia Gasosa
CL ₅₀	Concentração Letal 50%
EM	Espectrometria de Massas
eV	Elétron Volt
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
IE	Impacto de Elétrons
m/z	Relação massa-carga
M ⁺	Íon Molecular
ND ^{25°}	Índice de Refração a 25°C
OMS	Organização Mundial de Saúde
ppm	Parte por Milhão
SE	Erro Padrão
FHD	Febre de Dengue Hemorrágica
ISO	International Standard Organization
MS	Ministério da Saúde
IE	Impacto de Elétrons
µg	Micrograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fatores de influência na produção de metabólitos secundários de plantas.....	11
Figura 2. Árvore, botões florais ainda não abertos e botões secos do cravo-da-índia.....	14
Figura 3. Molécula de Eugenol.....	17
Figura 4. Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	22
Figura 5. Distribuição do <i>Aedes aegypti</i> no mundo em 2011. Países ou áreas de risco.....	23
Figura 6. Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	24
Figura 7. Ovos de <i>Aedes aegypti</i>	25
Figura 8. Larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	26
Figura 9. <i>Aedes aegypti</i> em fase de pupa.....	27
Figura 10. Fêmea do <i>Aedes aegypti</i>	28
Figura 11. Aparelho extrator de clevenger.....	32
Figura 12. Moinho elétrico.....	33
Figura 13. Refratômetro.....	33
Figura 14. Balança analítica.....	34
Figura 15. Fluxograma de obtenção do óleo e realização das análises.....	35
Figura 16. Armadilha utilizada para a coleta dos ovos do <i>Aedes aegypti</i>	38
Figura 17. Larvas do <i>Aedes aegypti</i> em terceiro estágio.....	39
Figura 18. Óleo essencial do cravo-da-índia.....	44
Figura 19. Cromatograma do óleo essencial do cravo-da-índia.....	46

Figura 20. Espectro de massas do pico cromatográfico do eugenol do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	48
Figura 21. Espectro de massas do eugenol.....	48
Figura 22. Fragmentação do eugenol e formação dos picos característicos.....	49
Figura 23. Espectro de massas do pico cromatográfico de copaeno do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	50
Figura 24. Espectro de massas do copaeno.....	50
Figura 25. Espectro de massas do pico cromatográfico do cariofileno do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	51
Figura 26. Espectro de massas do cariofileno.....	51
Figura 27. Espectro de massas do pico cromatográfico do humuleno do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	52
Figura 28. Espectro de massas do humuleno.....	52
Figura 29. Espectro de massas do pico cromatográfico do acetato de eugenila do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	53
Figura 30. Espectro de massas do acetato de eugenila.....	53
Figura 31. Taxa de mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> – expostas a seis concentrações diferentes do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> , após 24 horas – versus o logaritmo de cada dose aplicada.....	56
Figura 32. Taxa de mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> – expostas a seis concentrações diferentes do padrão de eugenol, após 24 horas – versus o logaritmo de cada dose aplicada....	56
Figura 33. Estimativa da CL ₅₀ do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada.....	57
Figura 34. Estimativa da CL ₅₀ do padrão de eugenol pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada.....	57
Figura 35. Comparação entre as taxas de mortalidade das larvas do	

mosquito <i>Aedes aegypti</i> proporcionadas pelo óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> e pelo padrão de eugenol.....	58
Figura 36. Variação da porcentagem de mortalidade com o aumento da concentração de óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	59
Figura 37. Variação da porcentagem de mortalidade com o aumento da concentração do padrão de Eugenol.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do óleo essencial de cravo-da-índia.....	44
Tabela 2. Composição química do óleo essencial de cravo-da-índia...	47
Tabela 3. Comparativo da composição química de diferentes óleos de cravo-da-índia.....	54
Tabela 4. Mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição em várias concentrações do óleo essencial do cravo-da-índia.....	55
Tabela 5. Mortalidade das larvas do <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição em várias concentrações padrão de eugenol.....	55

RESUMO

Neste trabalho a partir da extração e do estudo analítico do óleo essencial dos botões florais da espécie *Syzygium aromaticum* L., foi analisado o efeito larvicida do óleo contra larvas em terceiro estágio do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). Extraíu-se quantitativamente o óleo essencial por hidrodestilação. Determinaram-se as propriedades físico-químicas do óleo essencial (densidade, índice de refração, solubilidade, cor e aparência). Caracterizou-se quimicamente o óleo, quantificando seus componentes e identificando seu componente majoritário por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Calculou-se a CL₅₀ do óleo e do padrão de eugenol, além do limite de confiança a 95% de probabilidade, a partir dos métodos de Reed-Muench (1938) e Pizzi (1950), respectivamente. O rendimento do óleo foi de 3,54% m/m e 3,63 v/m. Pelo método utilizado foi possível identificar e quantificar os componentes: eugenol (52,53 %), cariofileno (37,25 %), humuleno (4,11 %), acetato de eugenila (4,05 %) e copaeno (2,05 %), sendo o eugenol o componente majoritário do óleo. O óleo exibiu atividade larvicida sendo totalmente letal a uma concentração de 120 µg.mL⁻¹. O óleo essencial obteve CL₅₀ de 63,36 (±2,12) µg mL⁻¹ e o padrão de eugenol 79,39 (±2,10) µg mL⁻¹. Os resultados promissores apontam para a necessidade de mais pesquisas com o óleo, para sua posterior utilização no combate às larvas de *Aedes aegypti*.

Palavras-Chave: Óleo essencial. *Syzygium aromaticum*. Eugenol. Atividade larvicida. *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

In this work, from the extraction and analytical study about the essential oil of the flower buds of *Syzygium aromaticum* species, was analyzed the larvicide effect of the oil against larvae on the third stage of the mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). The essential oil was extracted, quantitatively, by hydrodistillation. The physical-chemistry properties of the essential oil were determined (Density, refractive index, solubility, color and appearance). The oil was characterized, chemically, quantifying its components and identifying its major component by gas chromatography coupled to the mass spectrometry. In this research was calculated the oil CL_{50} and its eugenol standard, besides the confidence limit to 95% of probability, using the methods of Reed-Muench (1938) e Pizzi (1950), respectively. The oil yield was 3,54% m/m and 3,63 v/m. Through the method used was possible identify and quantify the components: Eugenol (52,53%), caryophyllene (37,25%), humulene (4,11%), eugenila acetate (4,05%) and copaene (2,05%), eugenol is the major oil's component. The oil exhibited larvicidal activity being totally lethal at concentration of $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$. The essential oil obtained CL_{50} of $63,36 (\pm 2,12) \mu\text{g.mL}^{-1}$ and an Eugenol standard $79,39 (\pm 2,10) \mu\text{g mL}^{-1}$. The promising results point to need of more researches with the oil to its subsequent utilization in the combat of *Aedes aegypti* larvae.

Keywords: Essential oil. *Syzygium aromaticum*. Eugenol. Larvicidal Activity. *Aedes aegypti*.

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença febril aguda caracterizada, em sua forma clássica, por dores musculares e articulares intensas. Porém o seu espectro clínico é muito amplo, variando de formas assintomáticas ou oligossintomáticas até formas graves e letais (MEDRONHO, 2006). Tem como agente um arbovírus do gênero Flavivírus da família Flaviviridae, do qual existem quatro sorotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (FUNASA, 2001). Atualmente, é a mais importante arbovírose (doença transmitida por artrópodes) que afeta seres humanos (MAROUN et al., 2008).

A OMS (Organização Mundial de Saúde) relata que dois quintos da população mundial estão em risco de infecção por dengue, com um aumento no número anual de casos. O vírus agora é endêmico em mais de 100 países (MURRELL et al., 2011). Todos os anos, o vírus infecta de 50 a 100 milhões de pessoas. Na ausência de uma vacina eficaz, o controle da dengue é limitado a combater os mosquitos que transmitem o vírus (RASGON, 2011).

O *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) (Diptera: Culicidae) é a principal espécie responsável pela transmissão da dengue no mundo. É originário da África, onde existem populações selvagens e domésticas (BRAGA & VALLE, 2007). Possui hábitos antropofílicos, com atividade hematofágica diurna e utiliza-se preferencialmente de depósitos artificiais de água limpa para colocar os seus ovos. Estes têm uma alta capacidade de resistir à dessecação, mantendo-se viáveis na ausência de água por até 450 dias (TAUIL, 2002).

A dengue pode ser transmitida por outras espécies de mosquitos como por exemplo, o *Aedes albopictus*, no entanto nas Américas o *Aedes aegypti* é o único transmissor do vírus com importância epidemiológica (BARRETO & TEIXEIRA, 2008).

O *Aedes aegypti* está intimamente associada com a habitação humana onde entra facilmente em edifícios para se alimentar e descansar. Fêmeas adultas alimentam-se preferencialmente do sangue de seres

humanos, outras espécies de vertebrados constituem apenas uma pequena proporção de seus repastos (JANSEN & BEEBE, 2010).

Até o momento, o único elemento controlável da cadeia epidemiológica da dengue é o seu vetor (*Aedes aegypti*) (MEDRONHO, 2006). A experiência tem mostrado que substâncias tóxicas aplicadas no ar para o controle do mosquito não são eficazes, uma vez que este é altamente domesticado, esconde-se dentro de casa em lugares como armários (GLUBER, 1989).

Nesse sentido a maioria dos programas de controle do mosquito tem como alvo o estágio larval em seus locais de reprodução utilizando-se larvicidas, porque o adulticidas pode apenas reduzir a população adulta temporariamente (CHUNG et al., 2010).

Os larvicidas mais comumente utilizados são compostos organofosforados tais como temefós, que é altamente ativo contra larvas de mosquitos e outros insetos aquáticos. O temefós é recomendado como o larvicida mais adequado para o controle do *Aedes* e *Anopheles*, porque tem baixa toxicidade para peixes, aves, mamíferos e seres humanos (PITASAWAT et al., 2007). No Brasil, os agentes da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), órgão do Governo Federal, aplicam o inseticida temefós, numa concentração de 100 ppm nos locais que servem de criadouros para larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Nessa concentração, obtém-se taxa de mortalidade de 100% (TELES, 2009).

No entanto o uso continuado de inseticidas tem provocado o aparecimento de populações resistentes e ocasionado problemas para o controle de vetores. Resistência tem sido detectada para todas as classes de inseticidas, afetando, direta e profundamente, a reemergência das doenças transmitidas por vetores (BRAGGA & VALLE, 2007).

Vários trabalhos vem mostrando o estabelecimento de resistência das populações de *Aedes aegypti* frente aos larvicidas comumente utilizados. Com relação ao Temefós Melo-Santos et al. (2009), relata a suscetibilidade do mosquito *Aedes aegypti* no município de Araripina e cita aumento de resistência. Resultados semelhantes são

citados por Carvalho et al. (2004) no distrito federal e Beserra et al. (2007) em vários municípios paraibanos.

Na busca por métodos ambientalmente seguros e relativamente baratos para controlar mosquitos, os extratos de plantas têm recebido muito interesse como potenciais agentes bioativos contra larvas de mosquitos (CHUNG et al., 2010).

Estudos como o de Silva et al. (2008) investigando a atividade larvicida de alguns óleos essenciais sugerem que as larvas de *Aedes aegypti* são suscetíveis à composição de alguns óleos essenciais, o autor ainda cita que o uso de produtos naturais pode ser considerado uma importante alternativa inseticida para o controle das larvas de *Aedes aegypti*. Outros trabalhos como o de Cheng et al. (2003) e Pitasawat et al. (2007), com óleos essenciais provenientes de várias espécies também apontam o potencial larvicida desses compostos frente ao *Aedes aegypti*.

No sentido de contribuir com o combate a larvas do *Aedes aegypti*, no presente estudo extraiu-se o óleo essencial da espécie *Syzygium aromaticum*, realizou-se o estudo de suas características físicas e de sua composição química, além de testá-lo como larvicida frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti* em terceiro estágio.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 – PLANTAS MEDICINAIS

A OMS (Organização Mundial de Saúde) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2005).

Evidências arqueológicas mostram que o uso de drogas derivadas de plantas era amplo em culturas antigas. Nozes de bétela, uma planta aromática que contém substâncias psicoativas, eram mascaradas há 13 mil anos no Timor; e artefatos descobertos no Equador estendem o uso das folhas de coca há 5000 anos atrás. As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers. Este papiro foi descoberto e publicado por Georg Ebers, sendo traduzido pela primeira vez, em 1890, por H. Joachin. Foi encontrado nas proximidades da casa mortuária de Ramsés II, porém pertence à época da XVIII dinastia. Enumera mais ou menos 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal. (PINTO et al., 2002).

Simões et al. (1999) dizem que até o século XIX os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e seus extratos vegetais. Segundo os referidos autores as plantas medicinais e seus extratos constituíam a maior parte dos medicamentos, que àquele momento pouco se diferenciavam dos remédios utilizados na medicina popular. Dessa forma, os recursos começaram a ser estudados com os instrumentos científicos da época e paulatinamente a tendência de utilização das substâncias ativas isoladas, os chamados “princípios ativos”. As plantas para sobreviver e evoluir têm que competir por espaço e se defender do ataque de herbívoros e patógenos, em geral. Neste embate de milhões de anos, as plantas foram desenvolvendo suas próprias defesas químicas. Esta é uma das razões pelas quais a constituição

química das plantas é tão complexa, e porque muitas plantas biossintetizam substâncias para atuar em alvos específicos moleculares de seus predadores. Metabólitos secundários de plantas e microorganismos são produzidos para modular seus próprios metabolismos (FERREIRA & PINTO, 2010).

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. (MACIEL et al., 2002)

No entanto a utilização de plantas medicinais atualmente não se restringe somente aos países pobres ou em desenvolvimento. A organização Mundial de Saúde (OMS), estima que muitos países desenvolvidos têm uma grande proporção da população fazendo uso da prática tradicional de saúde, especialmente o uso das plantas medicinais. Embora o acesso à medicina moderna esteja disponível nestes países, o uso de ervas medicinais manteve a sua popularidade por razões históricas e culturais (AGRA et al., 2008).

Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PINTO et al., 2002). Plantas, como organismos que co-evoluem com insetos e outros microorganismos, são fontes naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas (SIMAS et al., 2004).

No Brasil, o uso das plantas medicinais foi disseminado principalmente pela cultura indígena. É um país rico em diversidade cujo território possui cinco principais biomas sendo designados como floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga (SOUSA et al., 2008). O país possui a maior diversidade genética de espécies de plantas

no mundo, mas menos de 10% foram avaliadas com respeito a suas características biológicas, e menos de 5% foram submetidos a estudos detalhados de fitoquímica (LUNA et al., 2005).

De acordo com Simas et al. (2004), plantas brasileiras ricas em óleos essenciais contendo sesquiterpenos como nerolidol e farnesol, monoterpenos como α e β -pineno, carvona e geraniol e fenilpropanóides como safrol, eugenol e aldeído cinâmico são alternativas interessantes para o controle de larvas do *Aedes aegypti*.

2.2 - ÓLEOS ESSENCIAIS

De acordo com Mouchrek Filho (2000), o termo "óleo essencial" é empregado para designar líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte – quase sempre agradável e são extraídos de plantas por algum processo específico, sendo o mais frequente a destilação por arraste de vapor d'água.

Simões et al. (2007) cita que os óleos essenciais são definidos pela International Standard Organization (ISO) 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)". São misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas. Também são chamados de óleos etéreos ou essências. Estes termos se referem à aparência oleosa a temperatura ambiente, daí a designação "óleo". Entretanto, devido à volatilidade, sua característica principal, os óleos essenciais diferenciam-se dos óleos fixos, misturas lipídicas obtidas geralmente de sementes (TELES, 2003).

Outras características dos óleos essenciais são:

- aparência oleosa à temperatura ambiente;
- aroma agradável e intenso da maioria dos óleos;
- solubilidade em solventes orgânicos apolares. Em água apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são denominadas hidrolatos;

- sabor: geralmente acre (ácido) e picante;
- cor: quando recentemente extraídos são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados; são poucos os óleos que apresentam cor, como o óleo volátil de camomila de coloração azulada pelo seu alto teor de azuleno;
- estabilidade: em geral não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, calor, luz, umidade e metais; a maioria possui índice de refração e são opticamente ativos;
- seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, e até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações, normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades ou traços (LUPE, 2007).

O termo "óleo essencial" foi usado pela primeira vez no século 16 por Paracelso von Hohenheim, que nomeou o componente eficaz de uma droga de 'Quinta essenciais". Em meados do século 20, o papel dos óleos essenciais foram reduzidas quase que inteiramente para usar em perfumes, cosméticos e aromas alimentares, enquanto seu uso em preparações farmacêuticas tinha declinado (EDRIS, 2007).

Atualmente, cerca de 3000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 possuem importância comercial, especialmente para as indústrias farmacêutica, de alimentos, agrônômica, sanitários, indústrias de cosméticos e perfumes (BAKKALI et al., 2008).

O significado biológico dos óleos essenciais tem sido discutido. As primeiras hipóteses consideravam os óleos essenciais como resíduos do fitometabolismo. Hoje, sabe-se que esses óleos apresentam várias ações, entre elas: impedem a perda excessiva de água da planta, seus componentes reagem como doadores de hidrogênio nas reações de oxidação-redução, também parecem ser importantes agentes de comunicação interespecífica (como polinização, atraindo insetos), além

disso desempenham um papel na defesa das plantas contra herbívoros, microorganismos e fungos. Todo esse potencial deveria ser melhor estudado para ser usado no desenvolvimento de estratégias de manejo de pragas, que incluam uma melhor proteção do ambiente (REGNAULT-ROGER, 1997).

A composição dos óleos essenciais é muito variável, nem todos os indivíduos da mesma espécie de planta têm uma composição química idêntica: a produção pode ser direcionada ou bloqueada em uma das etapas do metabolismo (REGNAULT-ROGER, 1997). Os óleos podem conter cerca de 20 a 60 componentes em concentrações muito diferentes. Eles são caracterizados por dois ou três componentes majoritários, em concentrações mais elevada (20-70%) em comparação com outros componentes presentes em quantidades menores. Geralmente esse componente majoritário determina as propriedades biológicas do óleo (BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais são constituídos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, ésteres e outras substâncias de baixo peso molecular, chamados muitas vezes de metabólitos secundários (CRAVEIRO & QUEIROZ, 1993).

Vários são os fatores que podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos secundários, entre os principais estão: sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes (macronutrientes e micronutrientes), altitude, poluição atmosférica, estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (Figura 1) (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

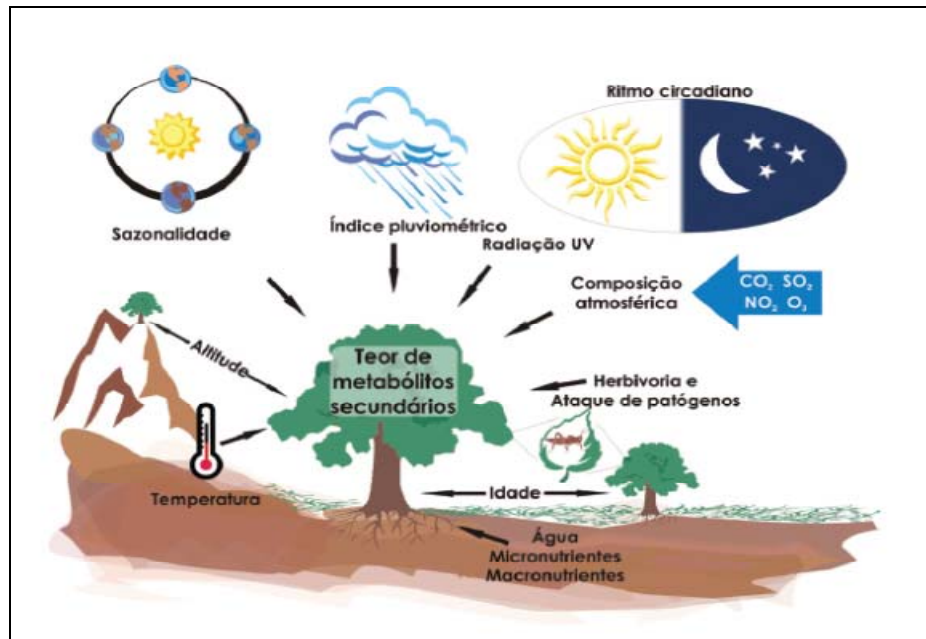


Figura 1. Fatores de influência na produção de metabólitos secundários de plantas.

Fonte: Gobbo-Neto & Lopes (2007).

Os gêneros de plantas capazes de elaborar os compostos que constituem os óleos essenciais são distribuídos em um número limitado de famílias, como Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae e Piperaceae (ENAN, 2001). O Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os 4 grandes produtores mundiais (BIZZO et al., 2009).

2.2.1 – Processos de Extração

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

2.2.1.1 - Extração por Enfloração

A enfloração é um método que já foi bastante utilizado, mas atualmente é empregado apenas por algumas indústrias de perfumes, no caso de algumas plantas com baixo teor de óleo de alto valor comercial. É empregada para extrair óleo essencial de pétalas de flores onde as pétalas são depositadas, a temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante certo tempo. Em seguida, estas pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Para se obter o óleo essencial, o álcool é destilado a baixa temperatura e o produto assim obtido possui alto valor comercial (WILLIANS, 1996).

2.2.1.2 - Extração por Prensagem

Na prensagem os pericarpos de frutos cítricos são prensados e a camada que contém o óleo essencial é, então, separada. Posteriormente, o óleo essencial é separado da emulsão formada com a água por decantação, centrifugação ou destilação fracionada (SIMÕES et al., 1999)

2.2.1.3 - Extração com Solventes Orgânicos

A extração de óleos essenciais com solventes orgânicos envolve o uso de compostos como o éter, éter de petróleo ou diclorometano que, entretanto, extraem outros compostos lipofílicos, além do óleo essencial. Por isso, os produtos obtidos assim raramente possuem valor comercial (SIMÕES & SPITZER, 1999).

2.2.1.4 - Extração por Fluido Supercrítico

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

2.2.1.5 - Extração com Arraste por Vapor D'água

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

A indústria utiliza, de preferência, o vapor d'água por ser reduzido o contato com a água, relativamente aos métodos anteriores, é menos acentuada a hidrólise dos ésteres e a polimerização de outros constituintes, em particular dos aldeídos (WILLIANS, 1996).

2.3 – CRAVO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*)

O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) (Figura 2) é uma planta arbórea, nativa das Ilhas Molucas (Arquipélago da Insulíndia, Indonésia), possui odor fortemente aromático, sabor ardente e característico (SILVESTRI et al., 2010). O nome deriva do francês “*clou*”, prego, por seu formato lembrar vagamente a forma de pequenos pregos irregulares (ALMA et al., 2007).

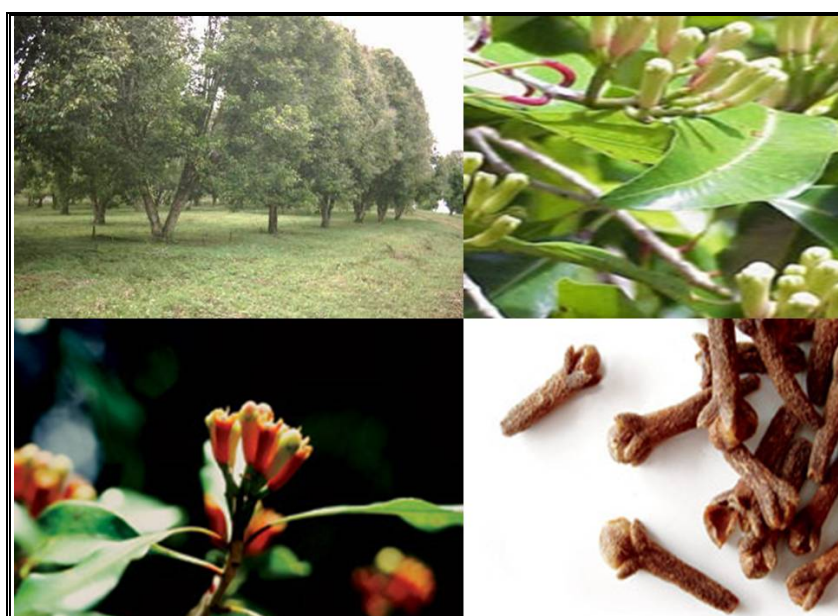


Figura 2. Árvore, botões florais ainda não abertos e botões secos do cravo-da-índia

Fonte: <http://www.ceplac.gov.br/radar/cravo.htm>

<http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC1693044-4529,00.html>

O cravo-da-índia possui vários sinônimos taxonômicos para seu nome científico, entre eles pode-se citar: *Caryophyllus aromaticum* L., *Eugenia aromatica* (L.) Baill., *Eugenia caryophyllata* Thunb., *Eugenia caryophyllus* C. Spreng, Bull. & Harr., *Jambosa caryophyllus* (Spreng.) Nied., *Myrtus caryophyllus* Spreng (GHEDIRA et al., 2010).

O cravo pertence à família Myrtaceae. As espécies desta família são particularmente ricas em óleos essenciais. A família é constituída de

140 gêneros e aproximadamente 3000 espécies (CERQUEIRA et al., 2009), divididas em 2 subfamílias, Myrtoideae e Leptospermoideae. No Brasil, todos os representantes nativos pertencem à subfamília Myrtoideae, a qual é constituída de apenas de uma tribo, Myrteae, que se divide em três subtribos, Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae (LIMBERGER et al., 2004).

O craveiro-da-índia é uma árvore de ciclo perene, que cresce a uma altura que varia de 10 a 12 metros, possui folhas ovais grandes e flores de cor vermelha que se apresentam em numerosos grupos de cachos terminais (ALMA et al., 2007). Essa planta vive por cerca de 100 anos e há alguns recordes de árvores atingindo 150 anos (OLIVEIRA et al., 2008).

O cravo-da-índia é colhido na forma de botão floral maduro e comercializado na forma de botão floral seco, sendo a qualidade do produto (cravo com cabeça proveniente de botão colhido antes da antese) primordial para a obtenção de melhores preços no mercado nacional e internacional. Os botões florais do craveiro-da-índia são colhidos com pedicelo, e estes são eliminados durante o processo de destalamento. Além disso, grande quantidade de folhas é derrubada durante o processo de colheita, seja ele manual ou químico. Tais resíduos provenientes da colheita também constituem fonte de óleos essenciais (OLIVEIRA et al., 2007). Os botões florais adquirem primeiro uma cor pálida e, gradualmente tornan-se verdes, então eles se tornam vermelho brilhante quando prontos para a coleta. Os botões são colhidas quando chegam a ter 1,5 - 2 cm de comprimento (ALMA et al., 2007).

Das sementes de aroma ativo, extrai-se o ácido eugênico, incolor e de sabor picante. Sua composição química é constituída principalmente por eugenol, acetato de eugenol, betacariofileno, ácido oleânico, e substâncias das classes: triterpeno, ceras vegetais, cetonas, resinas, taninos e esteróis (SILVESTRI et al., 2010).

A árvore do cravo, provavelmente, foi introduzida durante a colonização portuguesa. No sul da Bahia, a principal região produtora do

Brasil, não é possível definir precisamente quando a planta foi cultivada pela primeira vez, no entanto, a maioria das áreas de cultivo de cravo do estado foram plantadas em 1968, embora plantações muito antigas de cravo podem ser facilmente encontrada nos municípios de Ituberá e Nilo-Peçanha. A planta se adaptou muito bem à região, transformando o Estado da Bahia no maior produtor da especiaria no Brasil. Como consequência dos excelentes solo e condições climáticas a safra é explorada comercialmente, principalmente na parte inferior do Sul e no município de Una, também localizado na parte sul do estado (OLIVEIRA et al., 2008).

O óleo essencial do botão do cravo é pouco produzido, embora sua procura seja grande. O botão contém 17% de óleo essencial e o talo que o acompanha contém 4,5 – 6,0% (CRAVEIRO & QUEIROZ, 1993). O principal componente do óleo de cravo é geralmente considerado como eugenol seguido pelo β -cariofileno e menores quantidades de outros componentes, tais como álcool benzílico, mas as proporções variam amplamente (CHAIEB et al., 2007).

O eugenol exibe comprovadas atividades como antibacteriano, antimicótico antimicrobiano, antiinflamatório, anestésico, anti-séptico, antioxidante, alelopático e repelente (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

2.4 – ASPECTOS SOBRE O EUGENOL

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) (Figura 3), com fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$ e massa molar $164,2 \text{ g.mol}^{-1}$, apresenta-se como um líquido incolor a amarelo claro (que escurece quando exposto à luz), volátil, baixa solubilidade em água, cheiro forte e aromático de cravo, sabor ardente e picante (RABÊLO, 2010).

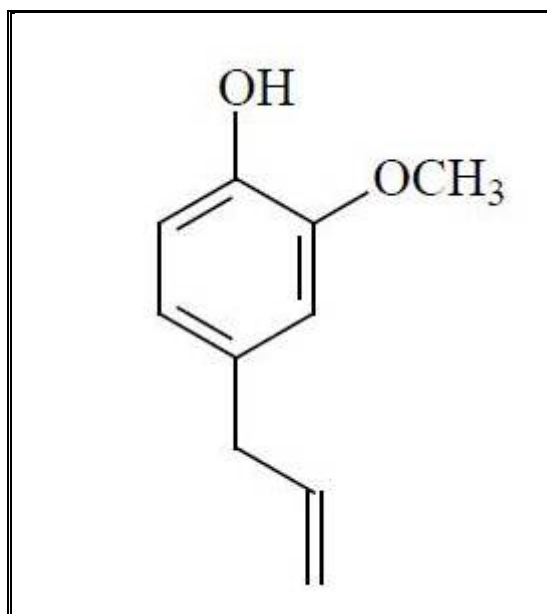


Figura 3 – Molécula do Eugenol

Eugenol é o principal componente do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.), mas é também um importante componente químico de óleos essenciais de muitas plantas aromáticas, tais como *Dicypelium cariophyllatum*, *Pimenta dioica*, *zehlnerivar Croton eugenoliferum* e *zehlneri* (SANTORO et al., 2007).

O eugenol pertence ao grupo dos fenóis e quimicamente os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais.

Em alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa (ANGELO & JORGE, 2007). Fenóis estão entre os maiores grupos de metabólitos secundários. Eles vão desde estruturas simples com um anel aromático até polímeros complexos tais como taninos e ligninas (GURIB-FAKIM, 2006).

Alguns produtos obtidos por sínteses químicas, a partir do eugenol, tais como metil eugenol e acetato de eugenila adquiriram um elevado valor comercial, devido às utilizações desses produtos como princípios ativos nas indústrias agroquímicas, substituindo os atuais

defensivos agrícolas por atrativos de insetos (feromônios) e nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (MOUCHREK FILHO, 2000).

O eugenol é amplamente utilizado em perfumaria, como aromatizante de alimentos e cigarros. Entre outras propriedades do eugenol estão: efeito alelopático na germinação e crescimento de plantas, efeito inibitório sobre crescimento de bactérias sendo utilizado como antisséptico, controle contra o barbeiro (*Rhodnius prolixus*), propriedade antioxidante, inibição da proliferação de células cancerosas, potencial leishmanicida, apresenta ainda efeito antiinflamatório, cicatrizante, analgésico. Seus efeitos medicinais compreendem o tratamento de náuseas, flatulências, indigestão, diarreia (MAZZAFERA, 2003; PEREIRA et al., 2008; KELECOM et al., 2002; MORAIS et al., 2009; YOO et al., 2005; GIL et al., 2008; SILVESTRI et al., 2010).

2.5 – TÉCNICAS ANALÍTICAS

A avaliação quantitativa e qualitativa de óleos essenciais envolve a utilização de diversas técnicas básicas, tais como: Cromatografia Gasosa (CG), Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), Espectrometria Vibracional de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e Espectrometria Eletrônica de Ultravioleta (UV) (MOUCHREK FILHO, 2000). No presente trabalho a técnica utilizada foi a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS).

2.5.1 – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

Existem no mercado várias empresas que oferecem o conjunto cromatográfico a gás-espectrometria de massas (CG-EM), acoplado por meio de uma interface que aumenta a concentração da amostra no gás de arraste, aproveitando a maior difusibilidade do gás. A velocidade de varredura é grande o suficiente para permitir a obtenção de diversos

espectros de massas por pico eluído no cromatógrafo. A conexão direta de colunas capilares de cromatografia gasosa ao espectrômetro de massas sem a interface de enriquecimento permite várias varreduras de massas rápidas em pontos diferentes de um pico cromatográfico, de modo a testar sua homogeneidade. Desse modo, é possível resolver picos cromatográficos parcialmente superpostos. Assim, a espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa fornece as fragmentações dos componentes individuais separados (ADAMS, 2007).

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

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

2.6 - A DENGUE

O *Aedes aegypti* foi reconhecido como transmissor da febre amarela em 1881, por Carlos J. Finlay. Em 1906, Bancroft publicou as primeiras evidências de que o mosquito também era o vetor de dengue, fato posteriormente confirmado por Agramonte, em 1906, e por Simmons, em 1931. Provavelmente, esse vetor foi introduzido nas Américas a bordo de barcos vindos da Europa, que cruzavam o Atlântico durante as primeiras explorações e colonizações européias ao Novo Mundo. Os primeiros registros de sua identificação em terras do Brasil foram em 1898, por Lutz, e em 1899, por Ribas. Atualmente, o vetor é encontrado em uma larga faixa do continente americano, que se estende do Uruguai até o sul dos Estados Unidos da América, com a ocorrência de surtos importantes de dengue em vários países, como Venezuela, Cuba, Brasil e, recentemente, Paraguai. No Brasil, o *Aedes aegypti* está presente nos 26 Estados e no Distrito Federal (BRAGA & VALLE, 2007).

Na década de 80, quase todas as cidades litorâneas do Brasil apresentaram registros do mosquito *Aedes aegypti* que, nos anos seguintes, expandiram-se também para o interior do país. Associado às debilidades dos serviços de saúde, constatou-se as fragilidades das ações individuais para com a proteção da saúde coletiva (MENDONÇA et al., 2009).

O número de casos elevou-se consideravelmente na década de 1990, sendo que em 1995 foram registrados mais de 100 mil casos e, a partir de 1997 já eram computadas mais de 200 mil ocorrências de dengue por ano. Em 2002, um novo recorde consolidou-se, havendo mais de 700 mil casos notificados (MENDONÇA et al., 2009). Em 1981, os sorotipos DEN-1 e DEN-4 foram os primeiros a serem isolados em uma epidemia de dengue ocorrida Boa Vista, Estado de Roraima. Após um silêncio epidemiológico, o sorotipo DEN-1 invadiu o Sudeste (Rio de Janeiro) e Nordeste (Alagoas, Ceará, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais) em 1986-1987, espalhando pelo país desde então, com as entradas dos

sorotipos DEN-2 em 1990-1991, e o DEN-3 em 2001-2002 (CÂMARA et al., 2007).

A introdução do sorotipo 3 do vírus da dengue em dezembro de 2001 provocou a maior e mais grave epidemia da doença no Brasil, tendo sido notificados mais de 1,2 milhão de casos em 2001 e 2002, ocorrendo também a co-circulação dos sorotipos 1 e 2 (MEDRONHO, 2006).

Em relação à Febre Hemorrágica de Dengue (FHD) constatou-se que entre os anos de 2000 e 2003, a faixa etária mais atingida era dos 30 anos ou mais, seguida pela faixa etária dos 15 aos 29 anos. No entanto, nos anos de 2006 e 2007 ficou evidente a elevação da incidência de FHD na faixa etária de até 15 anos (MENDONÇA et al., 2009).

Em 1996 aconteceu a primeira epidemia na ilha de São Luís, com 4.641 casos notificados. Nesse mesmo ano realizou-se um inquérito soroepidemiológico na ilha, estimando-se que 41,40% da população estudada se encontrava sensibilizada pelo DEN-1. A epidemia prosseguiu até 1998, havendo dificuldade para confirmação dos casos em laboratório. Em 2001 foi isolado o sorotipo DEN-2. O *Aedes aegypti* foi introduzido em São Luís em 1969, mas só chamou a atenção dos órgãos de saúde no ano de 1995, quando se detectaram os primeiros casos de dengue clássica no bairro da Cohab-Anil (GONÇALVES NETO & REBÊLO, 2004).

O *Aedes aegypti* tem mostrado uma grande capacidade de adaptação a diferentes situações ambientais consideradas desfavoráveis. Adultos já foram encontrados em altitudes elevadas e larvas em água poluída (TAUIL, 2002).

Não se dispõe ainda de uma vacina eficaz para uso preventivo contra o dengue, apesar de todos os esforços de pesquisa para a sua produção e desenvolvimento. Enquanto não se puder contar com esta medida de controle, o único elo vulnerável da cadeia epidemiológica é o vetor (TAUIL, 2001).

No entanto, o combate ao principal vetor do dengue encontra atualmente um novo ponto crítico. Trata-se do problema da resistência crescente dos insetos aos larvicidas e adulticidas de uso habitual nas

atividades de controle (TAUIL, 2002). A resistência é definida pela OMS como a habilidade de uma população de insetos tolerar uma dose de inseticida que, em condições normais, causaria sua morte (BRAGA & VALLE, 2007). O mosquito já apresentava, há muitos anos, resistência aos inseticidas organoclorados. Muitos pesquisadores relatam a resistência das larvas e dos adultos aos inseticidas organofosforados e dos adultos aos piretróides. Prophiro (2008) estudando os efeitos do temefós sobre larvas do *Aedes aegypti* no terceiro estágio verificou um processo de estabelecimento de resistência ao organofosforado em algumas cidades da região sul do Brasil.

Assim, o monitoramento da resistência dos mosquitos deve ser permanente, bem como a pesquisa de novos produtos inseticidas, eficazes e ecologicamente seguros (TAUIL, 2002).

2.6.1 – Considerações Sobre o Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

O *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (Figura 4) é um mosquito originário da África, onde existem populações selvagens e domésticas.



Figura 4. Mosquito *Aedes aegypti*

Fonte: www.dengue.org/mosquito_aedes.html

É um mosquito doméstico e antropofílico, com atividade hematofágica diurna e utiliza-se preferencialmente de depósitos artificiais de água limpa para colocar seus ovos (CDC, 2011).

Quanto ao aspecto antropofílico do *Aedes*, encontra-se na literatura trabalhos que mostram comportamento peculiar deste mosquito. Segundo Harrington et al. (2001), o *Aedes aegypti* acumula maior reserva energética quando ingere sangue com baixa concentração de isoleucina (sangue humano), em comparação com sangue com alta concentração de isoleucina (roedores e aves).

A ocorrência do *Aedes aegypti* se dá principalmente nas regiões tropicais. Dados do ano de 2011 indicam as áreas de maior risco (em amarelo no mapa da Figura 5).

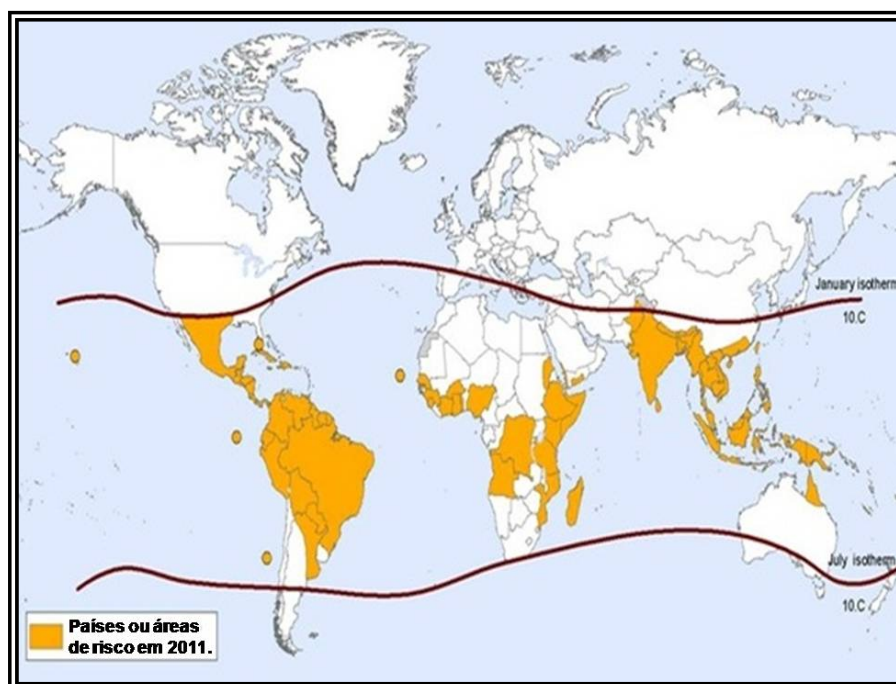


Figura 5. Distribuição do *Aedes aegypti* no mundo em 2011. Países ou áreas de risco.

Fonte: WHO – World Health Organization.

http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_DengueTransmission_ITHRiskMap.png

Com o aumento da produção de resíduos e diversos recipientes e entulhos derivados do petróleo que, lançados a céu aberto (em ruas, quintais e terrenos baldios) acumulam água das chuvas e favorecem a

proliferação dos mosquitos (MENDONÇA et al., 2009), pela urbanização acelerada que criou cidades com deficiências de abastecimento de água e de limpeza urbana; pela intensa utilização de materiais não-biodegradáveis, e pelas mudanças climáticas o *Aedes* parece ter encontrado no mundo moderno condições muito favoráveis para uma rápida expansão (FUNASA, 2002).

2.6.2 – O Ciclo de Vida do *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* é uma espécie doméstica, que se reproduz, preferencialmente, em água parada e limpa, acumulada em recipientes fabricados pelo homem, como latas, pneus, vasos etc, dentro ou perto das habitações.

Para que se possa combater o mosquito *Aedes aegypti* é necessário que entenda seu ciclo de vida (Figura 6).

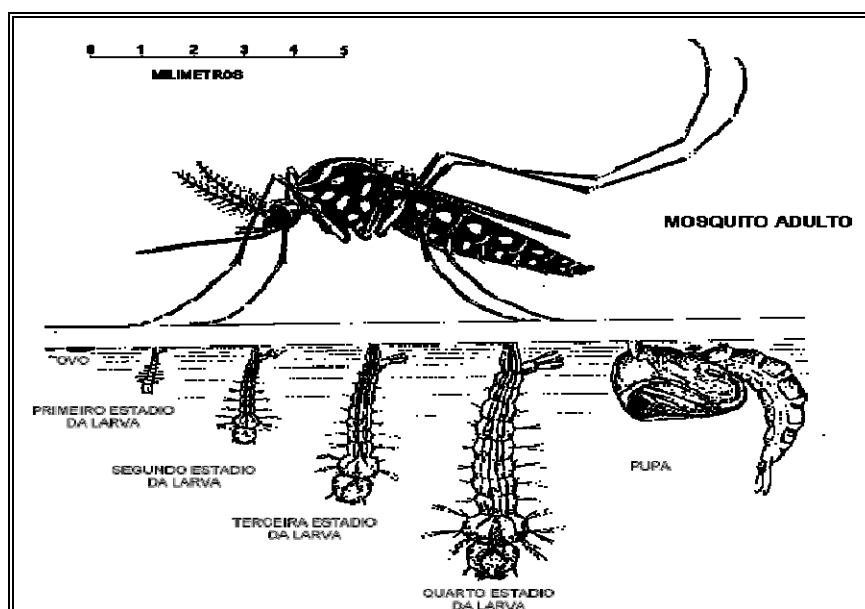


Figura 6. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*

Fonte: http://www.cecom.unicamp.br/dengue/index.php?option=com_content&view=article&id=47&Itemid=54

Podendo-se identificar o elo mais vulnerável de seu ciclo e selecionar a forma de ação contra o mesmo. Seu ciclo de vida

compreende 4 estágios: OVO – LARVA – PUPA – ADULTO. Os três primeiros estágios são aquáticos (MARINHO, 2010).

2.6.2.1 - O ovo

Os ovos do *Aedes aegypti* (Figura 7), medem aproximadamente 1mm de comprimento e possuem contorno alongado e fusiforme. No momento da postura os ovos são brancos, mas rapidamente adquirem a cor negra brilhante.



Figura 7. Ovos de *Aedes aegypti*

Fonte: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/galeria/galeria.html>

A fecundação se dá durante a postura e o desenvolvimento do embrião se completa em 48 horas em condições favoráveis de umidade e temperatura. Uma vez completado o desenvolvimento embrionário, os ovos são capazes de resistir a longos períodos de dessecação que podem prolongar-se por mais de um ano. Já foi observada a eclosão de ovos com até 450 dias, quando colocados em contato com a água.

A capacidade de resistência dos ovos de *Aedes aegypti* à dessecação é um sério obstáculo para sua erradicação. Esta condição permite que os ovos sejam transportados a grandes distâncias, em recipientes secos, tornando-se assim o principal meio de dispersão do inseto (dispersão passiva) (FUNASA, 2001).

2.6.2.2 - A larva

As larvas do *Aedes aegypti* (Figura 8) passam a maior parte do tempo alimentando-se principalmente de material orgânico acumulado nas paredes e fundo dos depósitos.

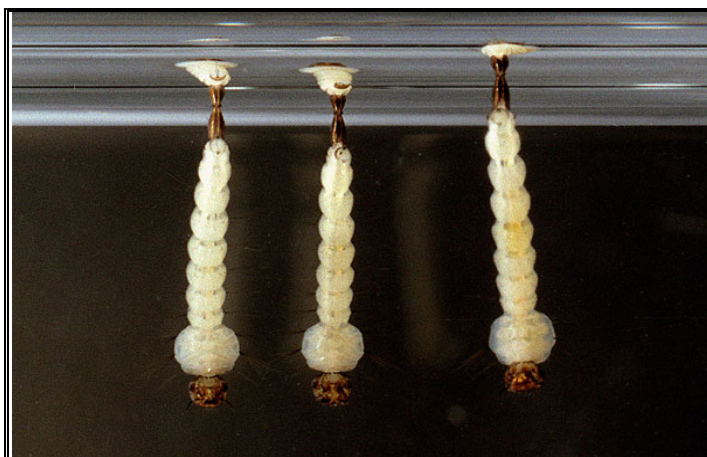


Figura 8. Larvas do mosquito *Aedes aegypti*

Fonte: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/oportunista.html>

As larvas possuem quatro estágios evolutivos. A duração da fase larvária depende da temperatura, disponibilidade de alimento e densidade de larvas no criadouro. Em condições ótimas, o período entre a eclosão e a pupação pode não exceder cinco dias.

Para respirar, a larva vem à superfície, onde fica em posição quase vertical. Movimenta-se em forma de serpente, fazendo um "S" em seu deslocamento. É sensível a movimentos bruscos na água e, sob feixe de luz, desloca-se com rapidez, buscando refúgio no fundo do recipiente (fotofobia) (FUNASA, 2001).

2.6.2.3 - A pupa

As pupas (Figura 9) não se alimentam. É nesta fase que ocorre a metamorfose do estágio larval para o adulto.



Figura 9. *Aedes aegypti* em fase de pupa

Fonte: <http://www.fiocruz.br/rededengue/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infolid=32&sid=12>

Quando inativas se mantêm na superfície da água, flutuando, o que facilita a emergência do inseto adulto. O estado pupal dura, geralmente, de dois a três dias.

A pupa é dividida em cefalotórax e abdômen. A cabeça e o tórax são unidos, constituindo a porção chamada cefalotórax, o que dá à pupa, vista de lado, a aparência de uma vírgula. A pupa tem um par de tubos respiratórios, que atravessam a água e permitem a respiração (FUNASA, 2001).

2.6.2.4 - O adulto

O *Aedes aegypti* (Figura 10) é escuro, com faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais e um desenho em forma de lira no mesonoto. Nos espécimes mais velhos o desenho da lira pode desaparecer, mas dois tufo de escamas branco-prateadas no clépeo, escamas claras nos tarsos e palpos permitem a identificação da espécie.

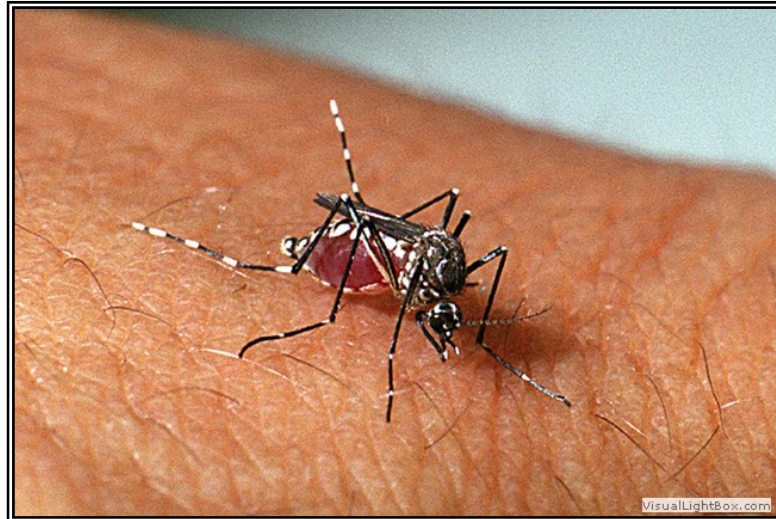


Figura 10. Fêmea do *Aedes aegypti*.

Fonte: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/galeria/galeria.html>

O macho se distingue essencialmente da fêmea por possuir antenas plumosas e palpos mais longos.

Logo após emergir do estágio pupal, o inseto adulto procura pousar sobre as paredes do recipiente, assim permanecendo durante várias horas, o que permite o endurecimento do exoesqueleto, das asas e no caso dos machos a rotação da genitália em 180°.

Dentro de 24 horas após emergirem, podem acasalar, o que vale para ambos os sexos. O acasalamento geralmente se dá durante o vôo, mas ocasionalmente pode se dar sobre uma superfície vertical ou horizontal. Uma única inseminação é suficiente para fecundar todos os ovos que a fêmea venha a produzir durante sua vida (FUNASA, 2001).

CAPÍTULO 3
OBJETIVOS

3 - OBJETIVOS

3.1 - GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral caracterizar analiticamente e avaliar o uso do óleo essencial dos botões florais da espécie *Syzygium aromaticum* como agente larvicida frente ao mosquito *Aedes aegypti*.

3.2 – ESPECÍFICOS

- Extrair quantitativamente o óleo essencial botões florais do cravo-da-índia;
- Determinar as propriedades físico-químicas do óleo essencial: densidade, índice de refração, solubilidade, cor e aparência;
- Identificar analiticamente os componentes do óleo usando a cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa (CG/EM);
- Quantificar os componentes do óleo essencial pelo método da normalização por Cromatografia Gasosa (CG);
- Testar a atividade larvicida óleo essencial de *Syzygium aromaticum* frente ao *Aedes aegypti*.
- Calcular a concentração letal CL_{50} do óleo a partir do teste de toxicidade (atividade contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*).

CAPÍTULO 4**PARTE EXPERIMENTAL**

4 – PARTE EXPERIMENTAL

O presente trabalho foi desenvolvido com a parceria dos seguintes laboratórios e instituições: Laboratório de Pesquisa em Química Analítica (LPQA), Central Analítica, Laboratório de Físico-Química e Microbiologia do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão – UFMA e da Central Analítica da Unicamp-SP.

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

4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

4.1.1 Sistema Extrator

Para a extração do óleo essencial do *Syzygium aromaticum*, utilizou-se a hidrodestilação com extrator de Clevenger (Figura 11), empregado para extração de óleo menos densos que a água (SANTOS et al., 2004).



Figura 11. Aparelho extrator de Clevenger

Ao extrator foi acoplado um balão de fundo redondo, tendo uma manta aquecedora como fonte geradora de calor.

4.1.2 Moinho Elétrico

Utilizou-se o moinho elétrico marca Tecnal, modelo TE - 340 para a trituração das amostras.



Figura 12. Moinho elétrico

4.1.3 Refratômetro

Utilizou-se um refratômetro marca AABE, modelo 2 WAJ, para as medidas de índice de refração.



Figura 13. Refratômetro

4.1.4 Balança analítica

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



Figura 14. Balança Analítica

4.2 – PROCEDIMENTOS REALIZADOS NA EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO DA ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*)

A obtenção do óleo essencial do cravo-da-índia e as análises foram realizadas seguindo as etapas descritas a seguir.

4.2.1 - Obtenção dos botões florais do cravo-da-índia

Os botões florais de cravo-da-índia utilizados neste trabalho foram adquiridos no mercado informal do projeto Reviver, no município de São Luís no Maranhão. Após a obtenção, os botões de cravo foram devidamente selecionados e acondicionados em sacos plásticos que foram então lacrados e guardados em local sem exposição solar. Depois de

adquiridos os botões florais, foram realizadas as seguintes etapas mostradas na Figura 15.

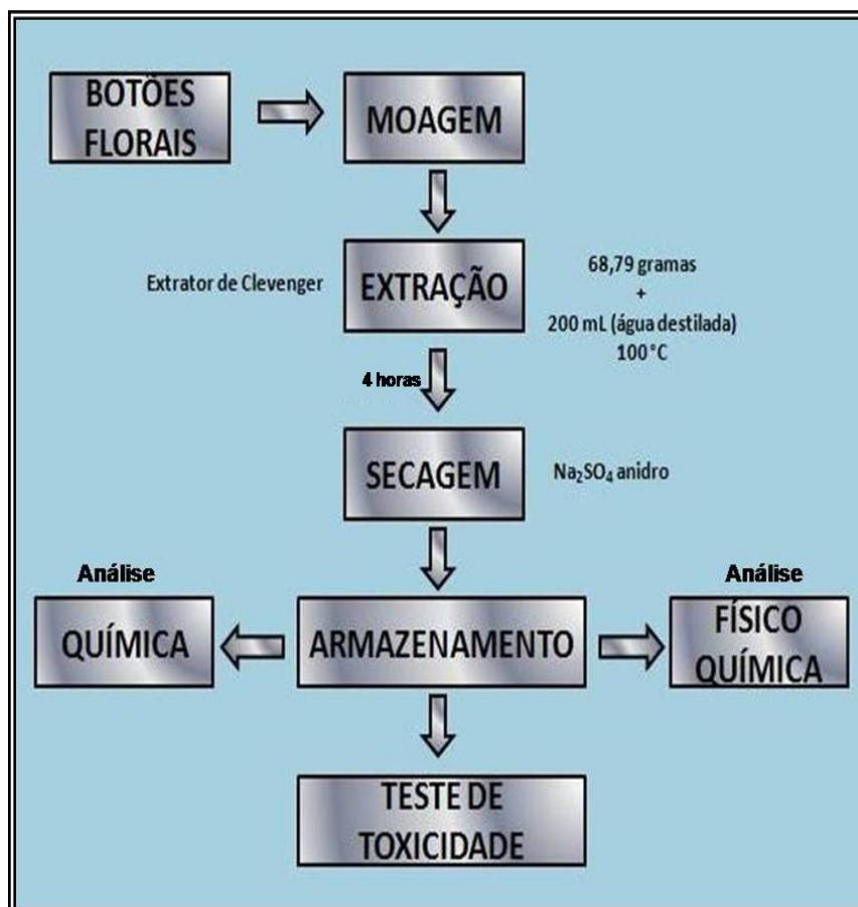


Figura 15. Fluxograma de obtenção do óleo e realização das análises

4.2.2 - Moagem

Os botões secos foram triturados em um moinho elétrico de facas (TECNAL, modelo TE-340) e o material obtido foi armazenado em frasco de polietileno para posterior extração do óleo essencial.

4.2.3 - Extração, tratamento e armazenamento do óleo essencial

O óleo essencial do cravo foi extraído em um Sistema Extrator de Clevenger, acoplado a um balão de fundo redondo de 1000 mL e uma manta elétrica como fonte geradora de calor.

Na extração do óleo essencial, pesou-se aproximadamente 68,79 gramas dos botões florais secos do cravo da Índia e adicionou-se 200 mL de água destilada. Em seguida, ajustou-se a temperatura da manta elétrica em 100°C. Após 4 horas de recolheu-se o óleo essencial. O óleo foi seco por meio de percolação com Na₂SO₄ anidro. Essas etapas foram realizadas em triplicata e as amostras foram armazenadas em recipientes de vidro sobre refrigeração para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis.

O rendimento da extração foi calculado na relação volume/massa e massa/massa, observando o volume obtido no próprio sistema de extração.

4.3 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

As propriedades físico-químicas do óleo essencial determinadas foram: densidade, solubilidade em etanol a 90% v/v, índice de refração, cor e aparência.

4.3.1 – Densidade

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

4.3.2 - Solubilidade em etanol (90%)

Na determinação da solubilidade, utilizou-se uma solução de etanol/água a 90% (v/v) mantendo-se constante o volume de óleo e adicionando-se proporcionalmente volumes diferentes e crescentes da solução alcoólica até se atingir a completa solubilização.

4.3.3 - Índice de refração

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

4.3.4 - Cor e Aparência

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

4.4 – ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

4.4.1 - Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM)

Para a determinação química do óleo, foi utilizada a análise por meio da cromatografia gasosa contendo uma coluna capilar HP-5MS, 5% difenil, 95% dimetil polisiloxano (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm de espessura de filme) com fase estacionária. O cromatógrafo do modelo QP-500 fabricado pela Shimadzu tendo hélio como gás de arraste, com fluxo na coluna de 1 mL.min⁻¹.

Para as análises, foram injetadas alíquotas de 0,3 µL da amostra diluída (1,0 mg do óleo em 1000 µL de diclorometano com pureza de 99,9 %), fixando-se as seguintes condições: temperatura do injetor em 280 °C; split de 1:10; programação de temperatura do forno de 40 °C (5,0 min.) a 240 °C (com taxa de aquecimento de 4°C/min.) e de 240 a 300 °C (com taxa de aquecimento de 8 °C/ min., 7,5 min).

No Espectrômetro de Massas do tipo quadrupolo linear o modo de varredura foi de 0,5 seg/scan, a faixa de varredura variou de 40 a 500 daltons cada uma, a linha de transferência foi de 280°C e o filamento desligado em 0,0 a 4,0 min.

4.4.1.1 Determinação pelo Método da Normalização

A determinação da concentração do eugenol e dos demais componentes do óleo essencial por esse método foi obtida através da integração eletrônica das áreas dos picos cromatográficos, utilizando o programa AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution Mass & Identification System): Programa utilizado para a interpretação dos espectros de massas quando havia diferenças significativas entre o espectro de massas obtido e o encontrado na biblioteca do CG/EM.

4.5 – OBTENÇÃO E CULTIVO DAS LARVAS

Para a coleta dos ovos do *A. aegypti*, foram utilizados jarros de plástico para planta, de aproximadamente 500 mL, semi-preenchidos com água e um pedaço de madeira de dimensões aproximadamente 20cmx5cm com uma parte imersa e outra não.



Figura 16. Armadilha utilizada para a coleta dos ovos do *Aedes aegypti*.

Os ovos do *Aedes aegypti* foram imersos numa bacia plástica, de formato retangular, com cerca de 3 litros de água mineral para a eclosão. Após a imersão dos ovos, 0,5 g de ração de rato foi adicionado à água para auxiliar no crescimento das larvas. Todo o material foi mantido no interior de uma gaiola de madeira e coberta com uma tela de tecido, apropriada para insetos, a fim de evitar a contaminação por ovos de outras espécies de mosquito. Após a eclosão, as larvas foram acompanhadas até que atingissem o 3º estágio do desenvolvimento, quando então foram utilizadas nos ensaios de atividade larvicida. Foram necessários de quatro a cinco dias para que as larvas atingissem o tamanho ideal para os ensaios.

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

4.6 – TESTE DE TOXICIDADE

O teste de toxicidade foi realizado com larvas no terceiro estágio (Figura 13). As larvas selecionadas foram transferidas para uma placa de Petri contendo 20 mL de água mineral (26-28°C), utilizando-se uma pipeta de Pasteur.



Figura 17. Larvas do *Aedes aegypti* em terceiro estágio.

Cada teste foi feito em triplicata para cada concentração testada. Inicialmente foi feita uma solução contendo apenas o tensoativo TWEEN 80 dissolvido em água (branco), para que se tivesse certeza de que o TWEEN 80 não era tóxico às larvas. Em seguida foram preparadas soluções com concentrações diferentes do óleo essencial. As soluções foram preparadas pesando-se o óleo essencial e adicionando-se sobre o mesmo o TWEEN 80, seguindo-se da adição de água destilada e transferindo a solução para um balão de 1000 mL. Para cada concentração testada foram transferidos 100 mL para recipientes de plástico, contendo exatamente 10 larvas cada um.

As larvas foram expostas às soluções por 24 horas, sendo monitoradas de hora em hora. Ao fim dos períodos registrou-se a mortalidade.

4.6.1 – Análise estatística

Após os testes, montou-se uma tabela (Tabela 4, página 56) com os valores das seis concentrações, logaritmo (log) das mesmas, o número de larvas mortas após 24 horas (média dos três pontos), número de larvas vivas após 24 horas (média dos três pontos), o acumulado de mortos (soma das células de mortos abaixo) e o acumulado de vivos (soma das células de vivos acima).

A análise estatística dos dados foi realizada de acordo com o método descrito por Reed & Muench (1938 apud Colegate & Molyneux, 1993) , o qual parte do princípio de que um animal que sobreviva a certa dose, também irá sobreviver em qualquer outra dose menor que aquela e consequentemente o animal que morrer com certa dose, também irá morrer em doses maiores que aquela. A partir da tabela descrita acima, contendo os dados de mortalidade para cada concentração testada, é construído um gráfico onde se observa uma curva para o acúmulo de animais mortos em cada concentração e outra curva para o acúmulo de sobreviventes. O ponto de intercessão entre as curvas é a Concentração

Letal 50% (CL₅₀), pois nesse ponto o número de animais sobreviventes é igual ao número de animais mortos.

O intervalo de confiança foi calculado segundo o método descrito por Pizzi (1950), no qual se constrói um gráfico do percentual de mortos *versus* logaritmo (log) da dose. A seguir determina-se o valor de "R", que é a diferença entre o log da dose que mata 75% das larvas e o log da dose que mata 25% das larvas. Calcula-se também a variável "h" que consiste na média das diferenças dos valores de log das doses. Com esses dados determina-se o log do erro padrão (SE), através da seguinte fórmula: $(SE)^2 = 0,79 \times h \times R/20$. Finalmente, o valor do intervalo de confiança é igual 2×10^{SE} .

CAPÍTULO 5
RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Avaliação das características físico-químicas do óleo essencial do cravo-da-índia.

As características físico-químicas dos óleos essenciais podem sofrer alterações devido a vários fatores entre os quais pode-se citar: o ar, a luz, o calor, a água e impurezas diversas de origem natural ou oriunda de falsificações. As alterações podem ser reconhecidas tanto por mudanças de suas características organolépticas (aroma, cor, sabor, transparência, fluidez), como também dos valores dos seus parâmetros químicos e físicos. Desta maneira, diminuindo as suas qualidades, reduz-se de igual modo o seu aproveitamento nas indústrias de perfumaria, cosmética, alimentos, químicas (TELES, 2003).

Segundo Mouchrek Filho (2000), a cinética de extração do óleo essencial é um dos principais parâmetros físico-químico da indústria de essências, pois além de estar diretamente relacionada com a qualidade do óleo essencial, se reflete no tempo de extração e na natureza econômica do processo, além de ser peculiar a cada tipo de essências a ser extraída.

Uma destilação rápida pode conduzir a um produto contendo predominantemente constituintes mais voláteis mais destituídos das melhores características; ao contrário, uma extração prolongada encarece o produto e também pode elevar a quantidade de compostos de aroma menos estimados (CHAAR, 2000; MOUCHREK FILHO, 2000).

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

O óleo essencial extraído do cravo-da-índia pode ser visto na Figura 18.



Figura 18. Óleo essencial do cravo-da-índia

Os parâmetros físico-químicos dos óleos essenciais são importantes não apenas para determinação da qualidade, como também para o controle da sua pureza. Os resultados das características físico-químicas do óleo essencial de cravo-da-índia são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do óleo essencial de cravo-da-índia.

Parâmetros Físico-químicos	<i>Syzygium aromaticum</i>
Densidade (g.mL ⁻¹)	0,973
Solubilidade em etanol a (90%)	1:2
Índice de refração (N _D 25°)	1,526
Cor	Amarelado
Aparência	Límpido
Odor	Característico
Rendimento (% m/m)	3,54
Rendimento (% v/m)	3,63

O óleo essencial apresentou valor de densidade de $0,973 \text{ g.mL}^{-1}$, a maioria dos óleos essenciais apresentam valores de densidade menores do que 1, sendo normalmente a fase superior quando em contato com água. Quanto à solubilidade, o óleo mostrou-se solúvel em uma solução de etanol a 90% na proporção de 1 parte de óleo para 2 de solução acoólica.

O óleo de cravo-da-índia apresentou nos parâmetros físico-químicos analisados um índice de refração ($N_D 25^\circ$) de 1,526. Esse valor é coerente com valores encontrados na literatura. Sulieman et al. (2007), determinou o índice de refração de 1,531 para o óleo do cravo. Reis (2006) investigando o óleo de cravo extraído dos talos e frutos secos do cravo da Índia, relatou um índice de refração 1,523 e 1,525 respectivamente. Além do valor encontrado na pesquisa se mostrar bem próximo dos encontrados na literatura, ele se mostra ainda muito próximo do índice de refração citado para o padrão de eugenol que é de 1,541 (ALDRICH, 2001). O eugenol é tido como componente majoritário do óleo do cravo, por isso a proximidade dos valores.

O óleo apresentou-se transparente logo após ser extraído tornando-se levemente amarelado com o passar do tempo. Sua aparência foi límpida, não sendo observada nenhuma presença de impureza ou particulado. O seu odor foi característico do cravo-da-índia, sendo o odor idêntico ao do eugenol puro, seu componente majoritário.

O rendimento da extração foi calculado diante da quantidade de óleo que se obteve a partir de uma determinada massa vegetal. Nesse experimento partiu-se de uma massa de 68,79 g dos botões florais do cravo da Índia e obteve-se 2,5 mL de óleo essencial em cada extração dessa forma o rendimento (% v/m) foi de 3,63 %. Como a densidade do óleo foi determinada em $0,973 \text{ g.mL}^{-1}$, rendimento (% m/m) foi de 3,54 %. Segundo Simões et al. (2007), a composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo, geralmente, específica para um determinado órgão e característica para o seu desenvolvimento, mas as condições ambientais são capazes de causar variações

significativas. Silvestri et al. (2010), encontrou rendimento de 1,87% (v/m), já Lee & Shibamoto (2001) e Raina et al. (2001), obtiveram rendimentos de 2,75% (m/m) e 4,8% (v/m) respectivamente.

5.2 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

5.2.1 - Análise por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas

Por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foi possível separar e identificar cinco constituintes do óleo essencial, os quais são apresentados na Figura 19, seguindo a ordem de eluição.

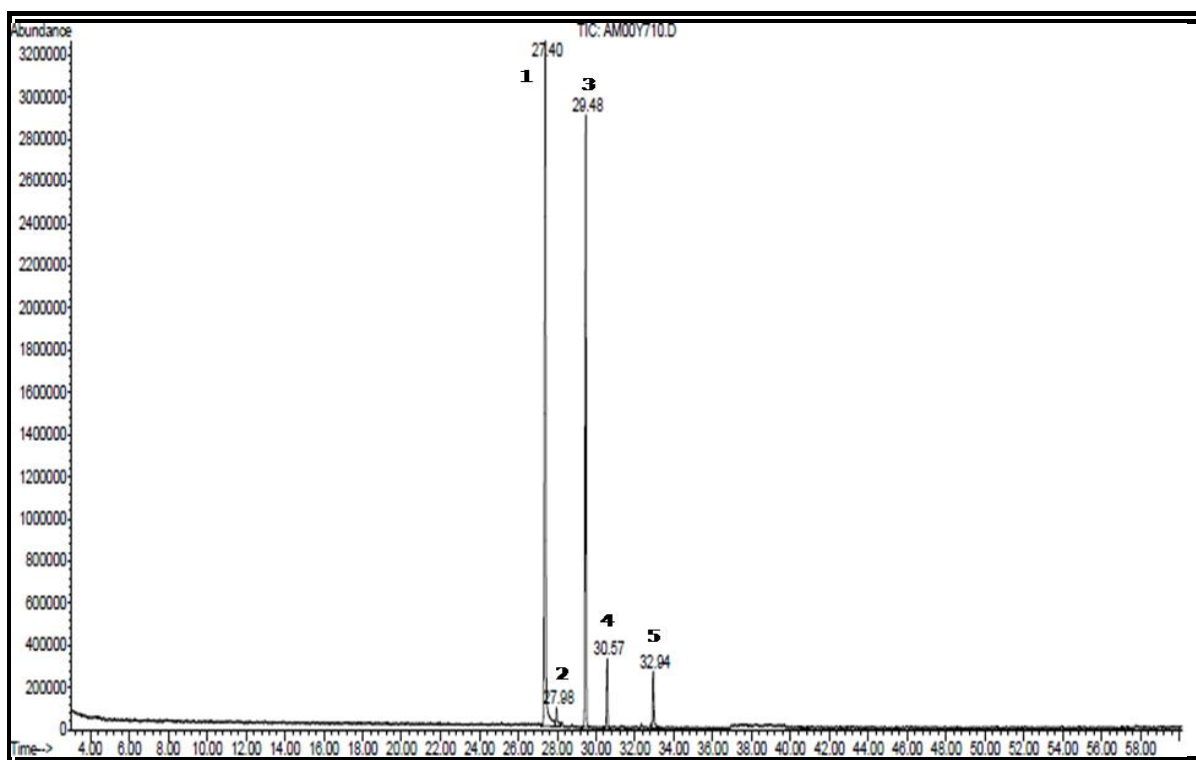


Figura 19. Cromatograma do óleo essencial do cravo da Índia.

O cromatograma apresentado na figura 19 apresenta um pico (pico 1) mais intenso com tempo de retenção de 27,40 min correspondente ao Eugenol. Os demais picos mostrados correspondem a:

copaeno (pico 2), cariofileno (pico 3), humuleno (pico 4) e acetato de eugenila (pico 5), com os respectivos tempos de retenção: 27,99 min, 29,47 min, 30,57 min e 32,94 min.

Na Tabela 2 são apresentados os compostos presentes no óleo essencial, cujos picos foram apresentados no cromatograma da Figura 19.

Tabela 2. Composição química do óleo essencial de cravo-da-índia.

Pico	Tr (min)	Substância	Teor (%)
1	27,40	Eugenol	52,53
2	27,99	Copaeno	2,05
3	29,47	Cariofileno	37,25
4	30,57	Humuleno	4,11
5	32,94	Acetato de eugenila	4,05

Verificam-se também os tempos de retenção de cada substância na coluna e o seu respectivo teor no óleo essencial. A quantificação do eugenol e dos demais componentes foram determinadas pela integração da área do pico correspondente. O alto teor relacionado ao pico 1 do cromatograma (52,53%), confirma o eugenol como o componente majoritário do óleo essencial, seguido pelo cariofileno (pico 3) com 37,25%.

Relacionam-se a seguir (Figuras 20 a 30), os espectros de massas dos picos dos compostos mais abundantes apresentados na Figura 19, com as respectivas propostas de identificação por comparação com os dados da espectroteca e com a literatura (ADAMS, 2007; SILVERSTEIN et al., 2007).

Os fenóis apresentam um pico intenso que corresponde ao íon molecular, fazendo com que sua identificação seja facilitada. O pico do íon molecular é o próprio pico base (SILVERSTEIN et al., 2007). No espectro da Figura 20 pode-se observar um pico intenso com $m/z = 164 [M^+]$, cuja massa corresponde exatamente à fórmula $C_{10}H_{12}O_2$, confirmando a presença majoritária do componente eugenol no óleo. Logo depois é

mostrado um espectro de massas característico do eugenol descrito por Adams (2007).

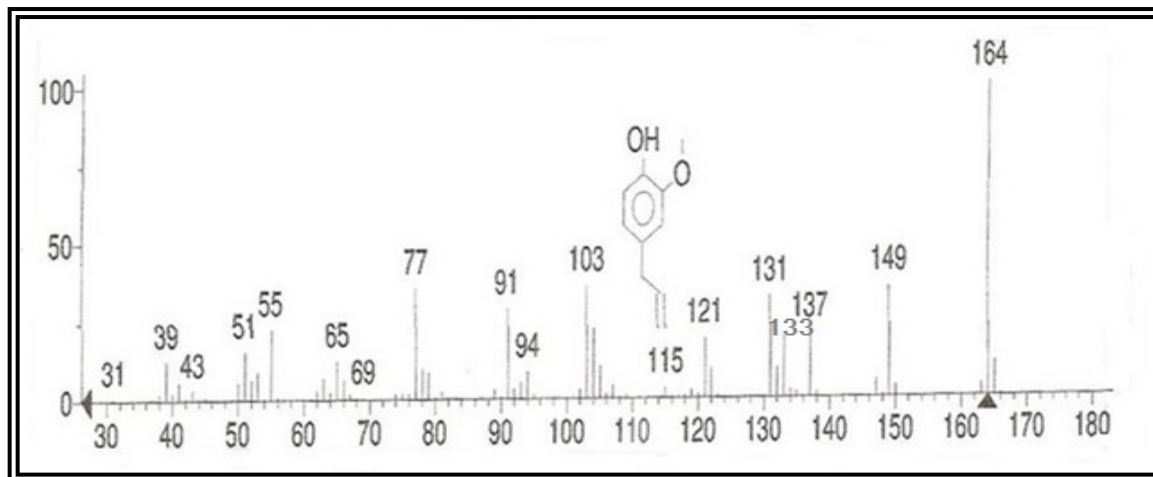


Figura 20. Espectro de massas do pico cromatográfico de eugenol do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*.

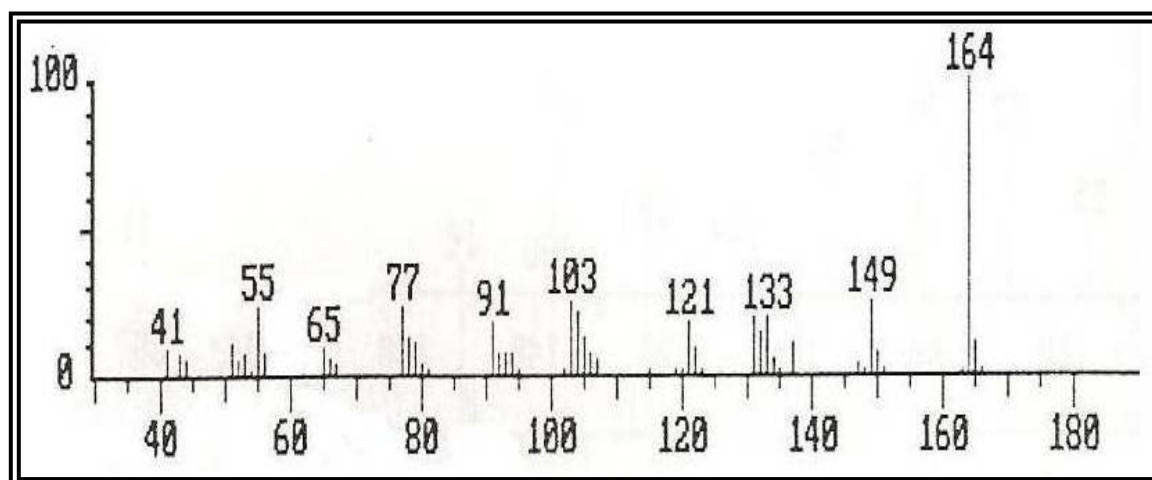


Figura 21. Espectro de massas do Eugenol
Fonte: Adams (2007).

Outros picos ajudam a confirmar a estrutura do eugenol. O espectro apresenta um pico em $m/z = 77$ o qual é característico de um rearranjo da molécula gerando o íon $[C_6H_5^+]$. O pico $m/z = 65$ corresponde a outro rearranjo, que leva ao íon $[C_5H_5^+]$. Ambos os picos respectivamente são originados por rearranjo – com a saída do grupo CO.

Os espectros mostram ainda picos típicos da quebra de fenóis e éteres aromáticos, sendo o pico $m/z=149$ $[M-15]$ característico da perda

do radical metila ($\text{CH}_3\bullet$). Já o fragmento com pico em $m/z=133$ [M-31] é referente à perda do grupo (OCH_3) do éter (SILVERSTEIN et al., 2007). Na figura 22 é apresentado o mecanismo de fragmentação dos principais picos característicos formados pelo eugenol (CORTEZ et al., 1998).

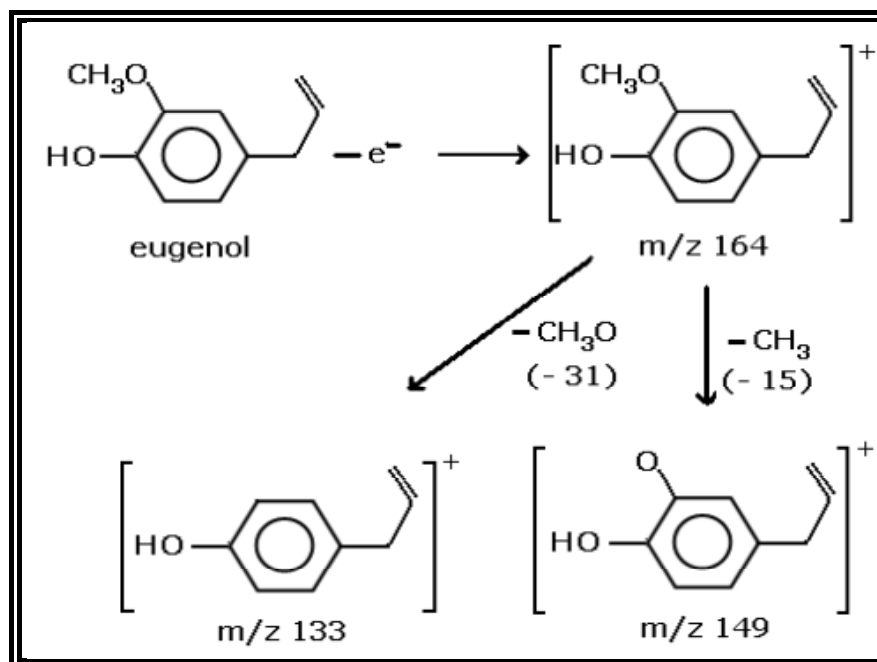


Figura 22. Fragmentação do eugenol e formação dos picos característicos.

Fonte: Cortez et al., 1998

O pico 2 do cromatograma mostrado na Figura 19, foi identificado como sendo o Copaeno de fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ e massa molecular $204\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Esse hidrocarboneto sesquiterpeno, apresenta o pico do íon molecular $m/z\ 204$ e o pico base em $m/z = 161$ [M-43], o qual é referente a perda de um grupo isopropila [C_3H_7^+], com um pico de fragmentação $m/z = 119$ [M-42] que é referente à [C_3H_6^+]. Abaixo é mostrado o espectro de massas do copaeno descrito por Adams (2007).

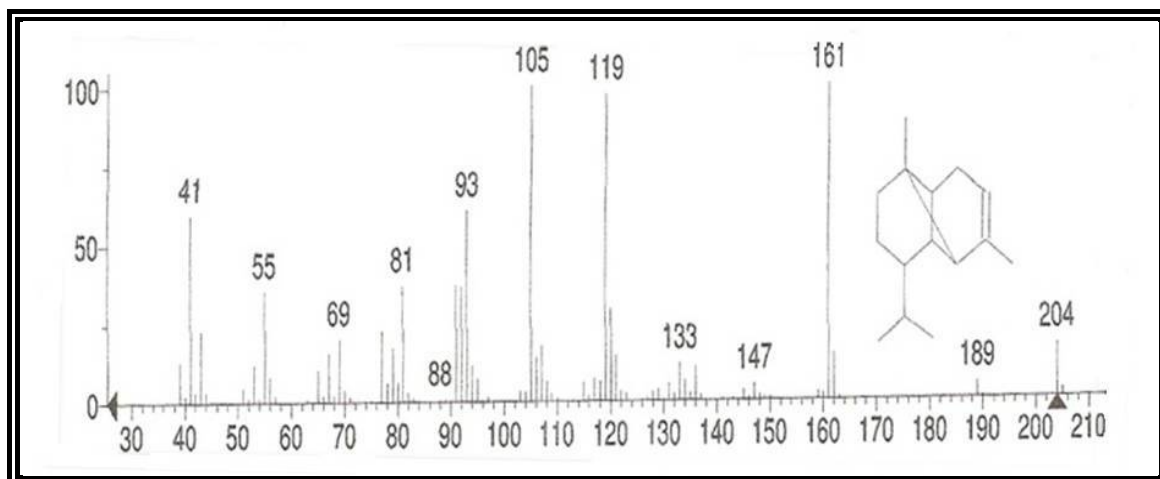


Figura 23. Espectro de massas do pico cromatográfico de copaeno do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*.

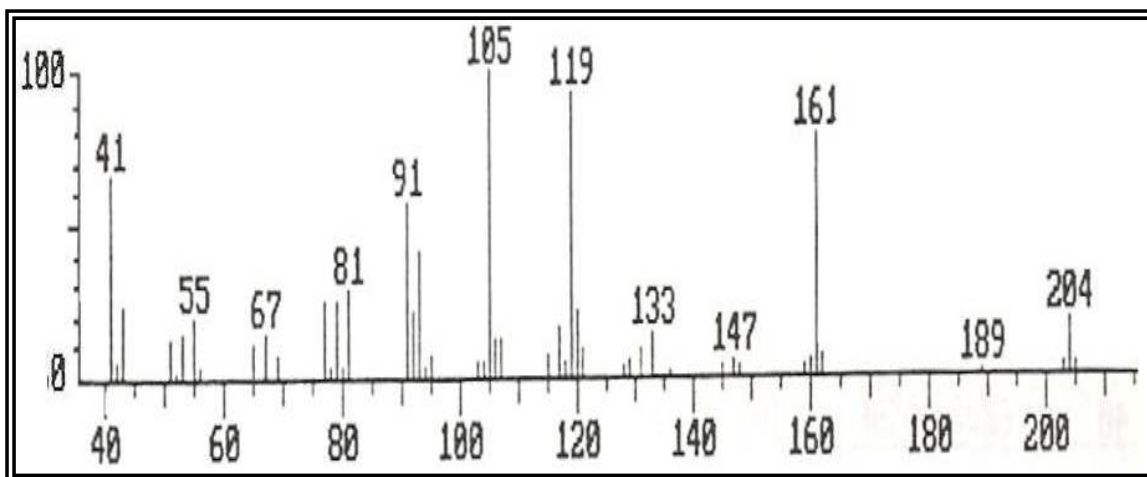


Figura 24. Espectro de massas do copaeno
Fonte: Adams (2007).

Percebe-se que o íon-molecular apresenta uma intensidade relativa $m/z = 204$, seguida do fragmento com $m/z = 189$ [$M - 15$], que representa perda de grupo metila. O pico em $m/z = 93$ é explicado como uma estrutura de fórmula $[C_7H_9^+]$ (SILVERSTEIN et al., 2007).

O pico 3 do cromatograma da Figura 19, corresponde ao Cariofileno, de fórmula $C_{15}H_{24}$ com massa molecular correspondente a 204 g mol^{-1} . O espectro (figura 25), mostra alguns picos característicos de terpenos como pico em $m/z = 41$ referente ao íon $[C_3H_5^+]$, $m/z = 55$ referente a $[C_4H_7^+]$ e $m/z = 69$ referente a $[C_5H_9^+]$. Assim como o

copaeno possui o pico em $m/z = 93$ é explicado como uma estrutura de fórmula $[C_7H_9^+]$ (SILVERSTEIN et al., 2007).

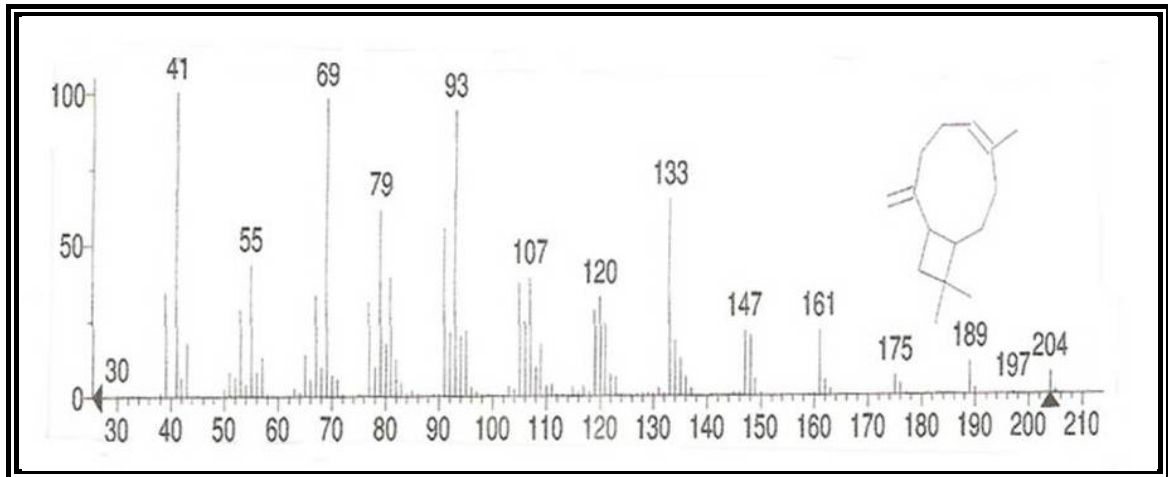


Figura 25. Espectro de massas do pico cromatográfico de cariofileno do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*.

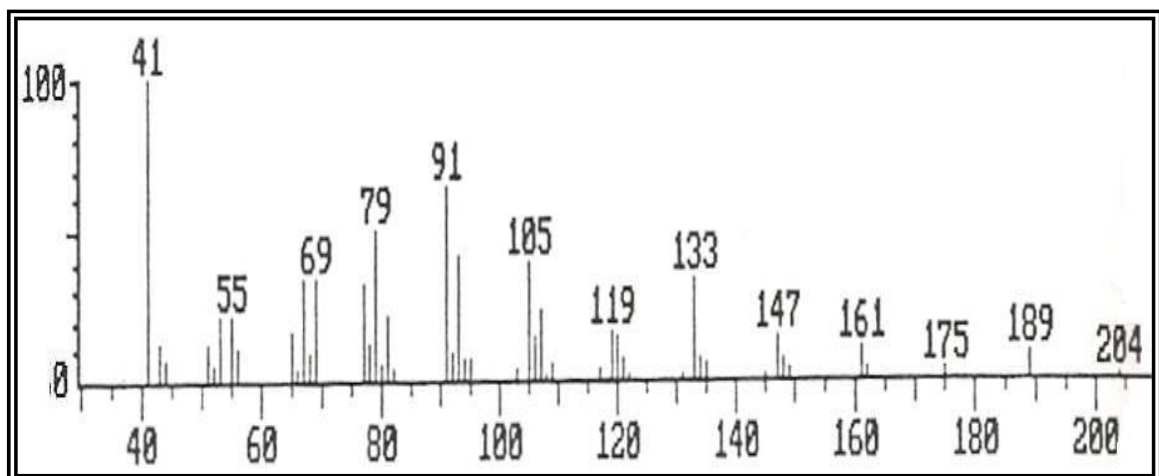


Figura 26. Espectro de massas do Cariofileno

Fonte: Adams (2007).

O pico 4 foi identificado como sendo o Humuleno de fórmula $C_{15}H_{24}$ e massa molecular correspondente a 204 g mol^{-1} (Figura 27).

Esse hidrocarboneto apresenta o pico do íon molecular $m/z 204$ e o pico característico em $m/z 93$. O pico em $m/z 41$ é atribuído ao fragmento $C_3H_5^+$ formado durante a clivagem da ligação carbono-carbono, acompanhado de perda de hidrogênio (SILVERSTEIN et al., 2007).

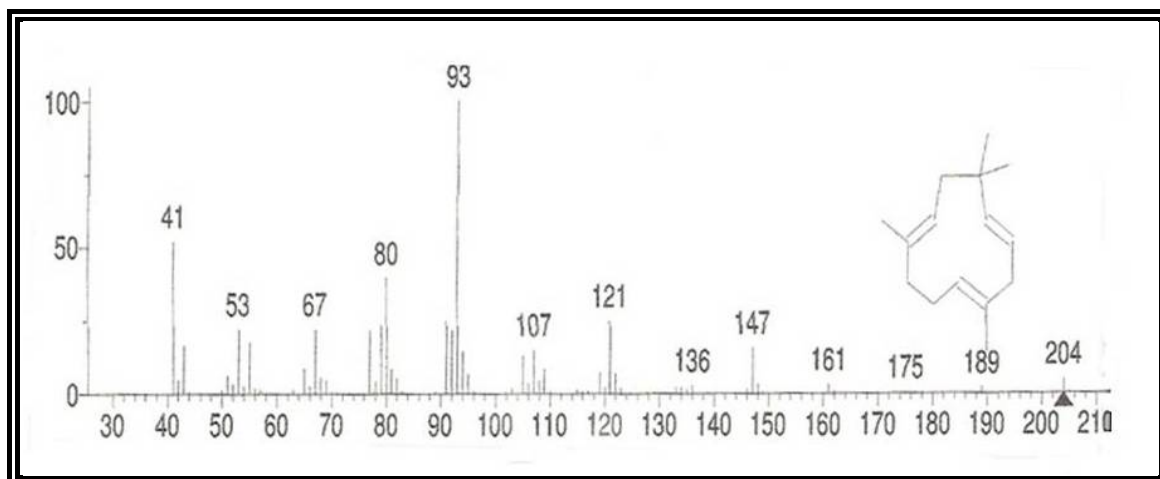


Figura 27. Espectro de massas do pico cromatográfico de humuleno do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*.

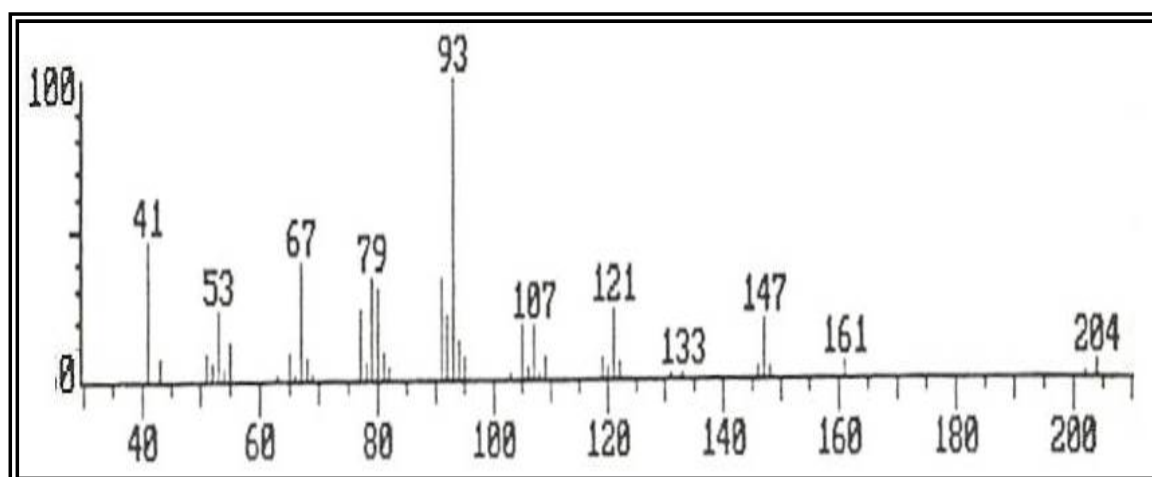


Figura 28. Espectro de massas do Humuleno
Fonte: Adams (2007).

O pico 5 do cromatograma da Figura 19 trata-se do Acetato de eugenila, $C_{12}H_{14}O_3$, confirmado pela presença do íon molecular m/z 206 no espectro de massa da Figura 29.

A fácil clivagem da estrutura alifática em fenóis substituídos origina um pico mais intenso que o pico do íon molecular, o qual foi observado em m/z 164 [M-42] que é referente à fragmentação do grupo C_2H_2O . O pico m/z 149 [M-15] é referente à perda do grupo metila e a do pico m/z 131[M-18] é resultante da perda da molécula de água. (SILVERSTEIN et al., 2007).

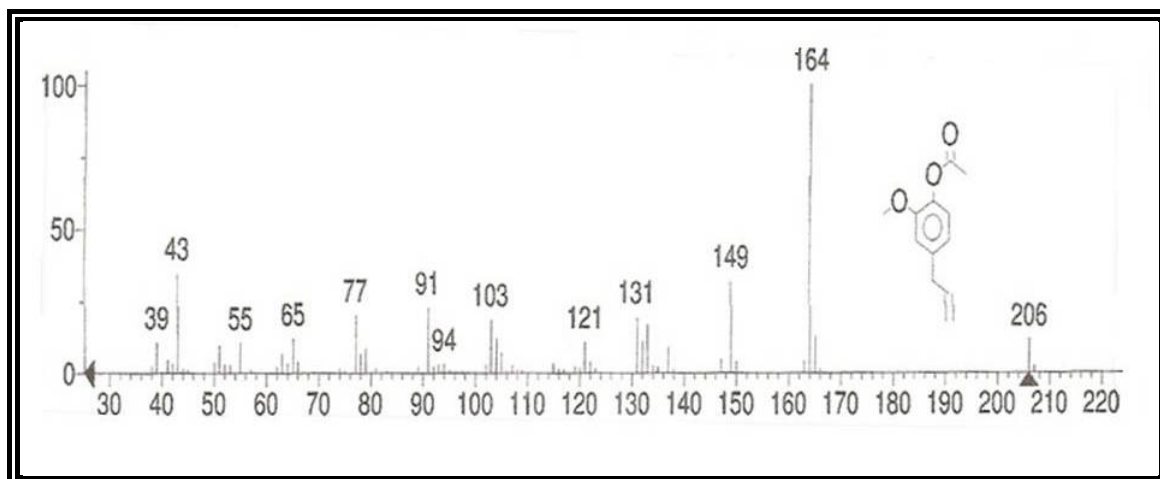


Figura 29. Espectro de massas do pico cromatográfico do acetato de eugenila do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*.

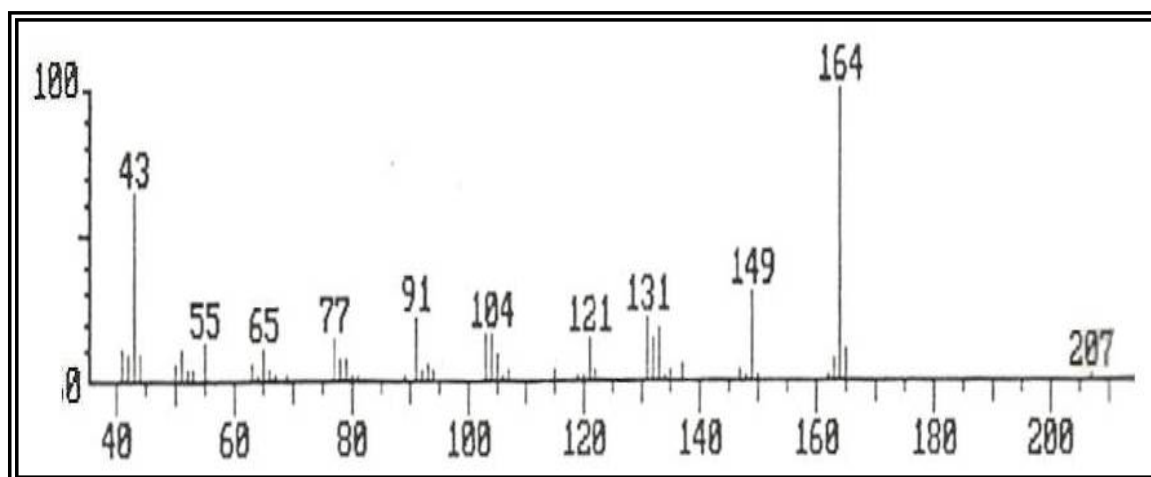


Figura 30. Espectro de massas do Acetato de eugenila
Fonte: Adams (2007).

Para o óleo estudado foram identificados cinco principais componentes: Eugenol (52,53%), Caryofileno (37,25%), Humuleno (4,11%), Acetato de Eugenila (4,05%) e Copaeno (2,05%). Outros estudos da composição química do óleo essencial de *S. aromaticum* encontrados na literatura mostram diferenças em suas composições e seus teores de componentes. Isso se deve a fatores extrínsecos como a influência do clima e solo dos locais de cultivo que podem ocasionar variações nos teores e nas composições químicas dos óleos essenciais de espécies como o *S. aromaticum* (OLIVEIRA et al., 2009).

Um comparativo mostrado na tabela 3 entre óleos essenciais extraídos de *Syzygium aromaticum* em diferentes trabalhos ilustra essas diferenças.

Tabela 3. Comparativo da composição química de diferentes óleos de cravo-da-índia.

	Eugenol (%)	Cariofileno (%)	Humuleno (%)	Acetato de Eugenila (%)	Copaeno (%)
Trabalho	52,53	37,25	4,11	4,05	2,05
Óleo 1	88,38	0,64	-	10,98	-
Óleo 2	90,3	4,83	-	1,87	-
Óleo 3	94,41	2,91	0,36	-	0,04
Óleo 4	88,58	1,38	0,19	5,62	-
Óleo 5	87,00	3,56	0,40	8,01	0,10
Óleo 6	59,3	24,9	2,8	4,2	1,2

Óleo 1 (OLIVEIRA et al., 2009); Óleo 2 (SILVESTRI et al., 2010); Óleo 3 (RAINA et al., 2001); Óleo 4 (CHAIEB et al., 2007); Óleo 5 (ALMA et al., 2007); Óleo 6 (FICHI et al., 2007).

Os óleos 1,2,3 e 4 foram obtidos pelo método da hidrodestilação, o óleo 5 por destilação por arraste de vapor e o óleo 6 de uma amostra comercial.

Na literatura o eugenol é sempre apresentado como componente majoritário do óleo de cravo. Seu teor varia muito de um óleo para outro e os teores dos componentes minoritários também.

5.3 – ATIVIDADE LARVICIDA

A atividade larvicida do óleo essencial extraído dos botões florais da espécie *Syzygium aromaticum* foi testada em seis concentrações diferentes: 30, 50, 70, 100, 110 e 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo 10 o número de larvas do mosquito *Aedes aegypti* utilizadas no ensaio larvicida para cada concentração.

Para cada concentração testada, os ensaios foram realizados em triplicata. Os dados sobre o número de larvas vivas e de larvas mortas

foram encontrados através de uma média das três repetições para cada uma das seis concentrações testadas (Tabela 4).

Da mesma forma que o óleo, o padrão de Eugenol foi testado em um ensaios com 10 larvas cada (Tabela 5). Os testes foram realizados em triplicata para as concentrações de 20, 50, 70, 90, 100 e 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 4. Mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição em várias concentrações do óleo essencial do cravo-da-índia.

Dose ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Log dose	Mortos	Vivos	Acumul. Mortos	Acumul. Vivos	Mortalidade (%)
120	2,079	10,0	0,0	37,3	0,0	100
110	2,041	9,3	0,7	27,3	0,7	93
100	2,000	9,0	1,0	18,0	1,7	90
70	1,845	7,3	2,7	9,0	4,4	73
50	1,699	1,7	8,3	1,7	12,7	17
30	1,477	0,0	10,0	0	22,7	0

Tabela 5. Mortalidade das larvas do *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição em várias concentrações padrão de eugenol.

Dose ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Log dose	Mortos	Vivos	Acumul. Mortos	Acumul. Vivos	Mortalidade (%)
120	2,079	10,0	0,0	29,7	0	100
100	2,000	8,7	1,3	19,7	1,3	87
90	1,954	7,6	2,4	11,0	3,7	76
70	1,845	2,7	7,3	3,4	11,0	27
50	1,699	0,7	9,3	0,7	20,3	7
20	1,301	0,0	10,0	0	30,3	0

De acordo com a tabela 4, a concentração de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do óleo essencial não apresentou atividade larvicida. A partir da concentração 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ o óleo passa a provocar a morte das larvas.

As taxas de percentagem das mortalidades das larvas frente ao óleo e o padrão de eugenol puro são mostradas na Figura 31 e 32, ambas as substâncias mostraram-se totalmente letais às larvas na concentração de 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e Log dose 2,0791.

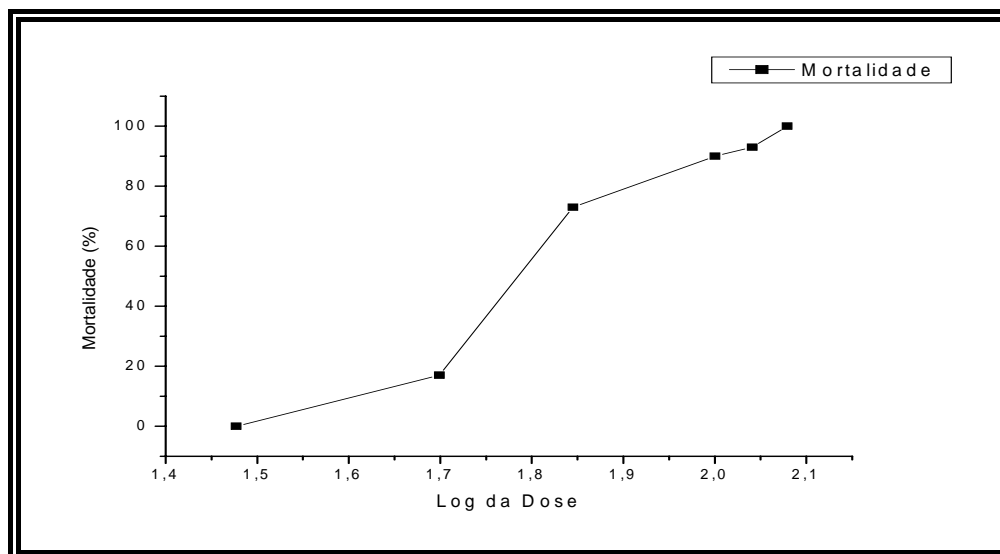


Figura 31. Taxa de mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* – expostas a seis concentrações diferentes do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, após 24 horas – versus o logaritmo de cada dose aplicada.

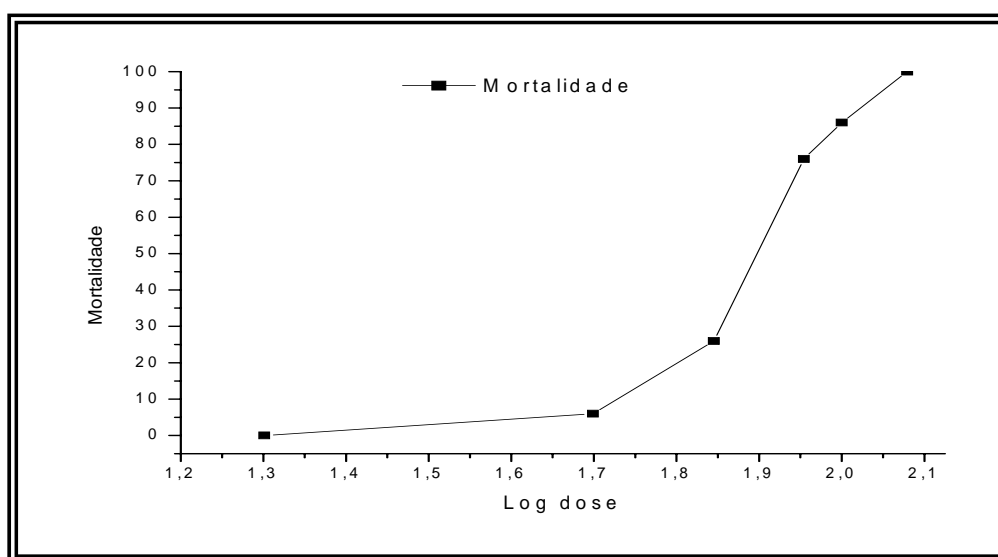


Figura 32. Taxa de mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* – expostas a seis concentrações diferentes do padrão de eugenol, após 24 horas – versus o logaritmo de cada dose aplicada.

As Concentrações letais CL_{50} para o óleo essencial do *Syzygium aromaticum* (Figura 33) e para o Padrão de eugenol puro (Figura 34) foram calculadas através da intersecção das curvas de indivíduos acumulados mortos e indivíduos acumulados vivos. Tendo como resultado a concentração de $63,36 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com um intervalo de confiança de 2,12

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o óleo e $79,39 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com intervalo de confiança de $2,10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o padrão de eugenol.

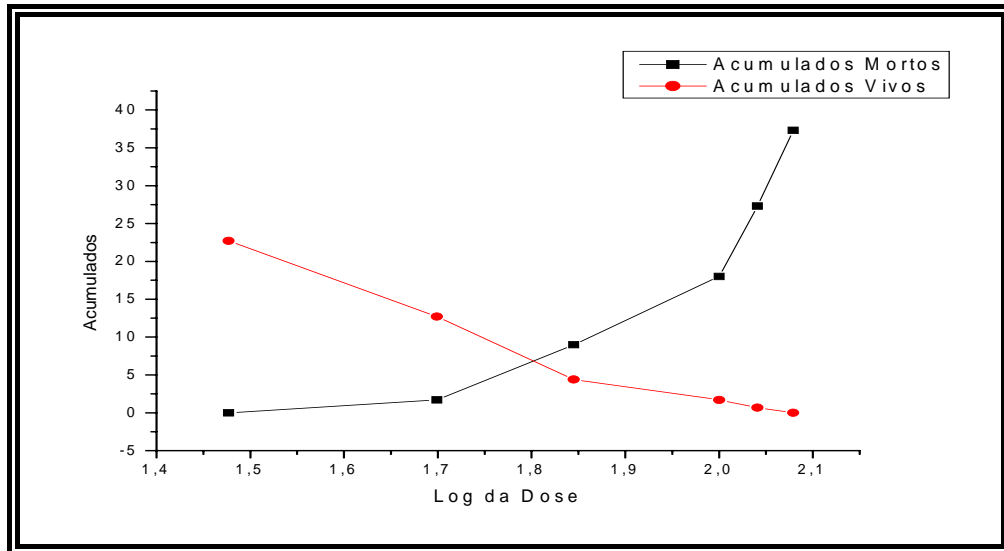


Figura 33. Estimativa da CL_{50} do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada.

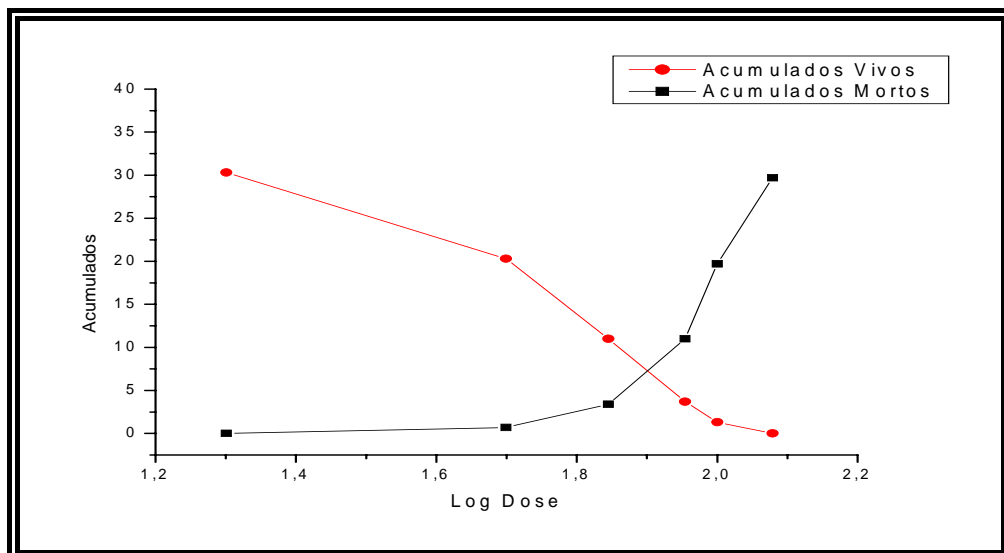


Figura 34. Estimativa da CL_{50} do padrão de eugenol pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada.

A concentração Letal 50% (CL_{50}), é a concentração na qual o número de larvas vivas e mortas se igualam. A CL_{50} para o óleo foi encontrada próxima ao Log dose 1,8018 (abaixo da concentração de

70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e Log dose 1,8998 (concentração menor que 90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) para o padrão de eugenol. De acordo com CHENG et al. (2003) valores de $\text{CL}_{50} < 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ são considerados ativos.

Um comparativo entre as mortalidades das larvas em função dos logaritmos das doses do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e do padrão puro de eugenol é apresentado na figura 35.

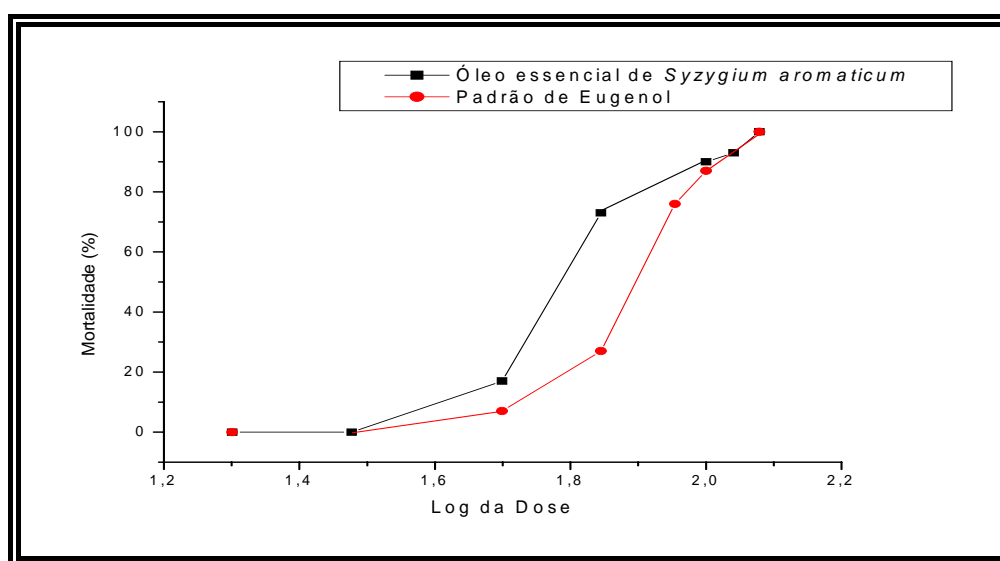


Figura 35. Comparação entre as taxas de mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* proporcionadas pelo óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e pelo padrão de eugenol.

Observando a Figura 35, pode-se verificar que o óleo apresenta melhor atividade larvicida do que o padrão de eugenol em concentrações menores, isso pode ser confirmado pelo menor valor de concentração letal 50% CL_{50} , que foi de 63,36 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o óleo e de 79,39 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o padrão de eugenol. No entanto para concentrações maiores os dois passam a ter a atividade larvicida semelhante, sendo que para concentrações a partir de 110,10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ambos exibem atividades idênticas, ambos atingindo o máximo de mortalidade (100%) na concentração de 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Pode-se notar um aumento no potencial larvicida do óleo essencial quando sua concentração se aproxima de valores próximos ao valor da concentração letal 50%. Aumentando-se a concentração de 30

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ (sem atividade larvicida) para $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, há um aumento de 17% na mortalidade das larvas. Já o aumento na concentração de 50 para $70 \mu\text{g.mL}^{-1}$, faixa em que se encontra a CL_{50} , a mortalidade aumenta de 17 para 73%, ou seja 56%. Ambos os aumentos de concentração (30-50 e 50-70) foram de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, no entanto a porcentagem de mortalidade aumentou. A partir da concentração de $70 \mu\text{g.mL}^{-1}$ há uma diminuição na mortalidade.

Aumentado-se a concentração de 70 para $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (aumento de $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$), a mortalidade aumenta em 17% e finalmente quando a concentração sobe de 100 para $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$, nota-se um aumento de apenas 10% na mortalidade. Essa variação na mortalidade com o aumento da concentração de óleo essencial pode ser observada na figura 36.

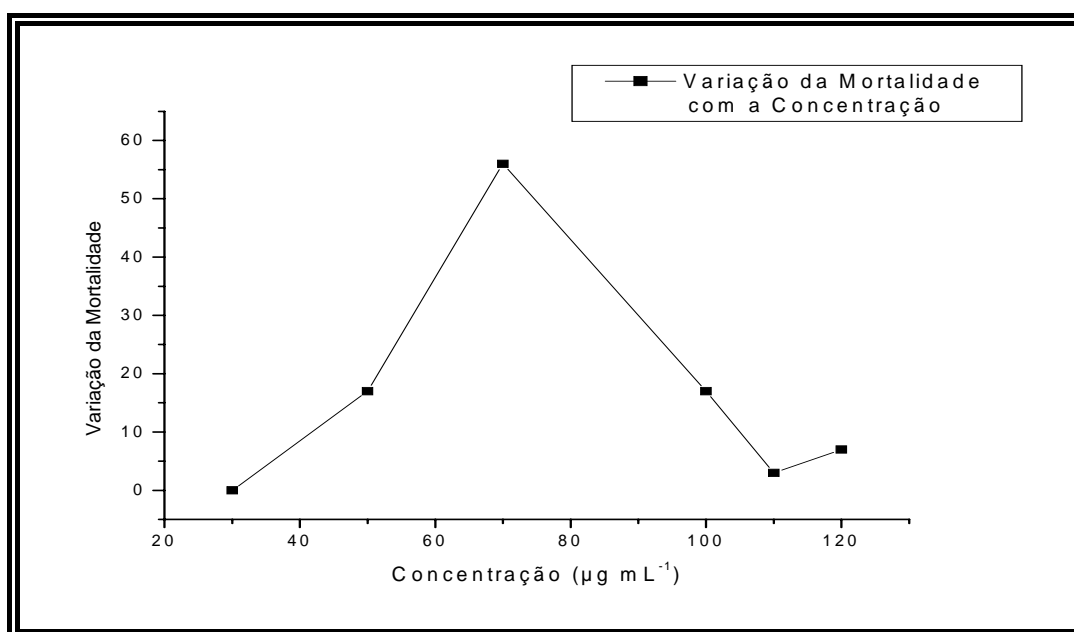


Figura 36. Variação da porcentagem de mortalidade com o aumento da concentração de óleo essencial de *Syzygium aromaticum*.

Esse mesmo efeito foi ainda mais pronunciado quando se compara o aumento da porcentagem de mortalidade com a concentração para o padrão de Eugenol.

O aumento na concentração do padrão de eugenol de 20 para 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e de 50 para 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (aumentos de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), aumenta a porcentagem de mortalidade em 7% e 20%. Já o aumento de concentração na faixa em que se encontra a concentração letal 50% (CL_{50}), de 70 a 90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ causa um aumento de 49% na porcentagem de mortalidade. Um aumento de 100 a 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ proporciona um aumento de 13% na mortalidade (Figura 37).

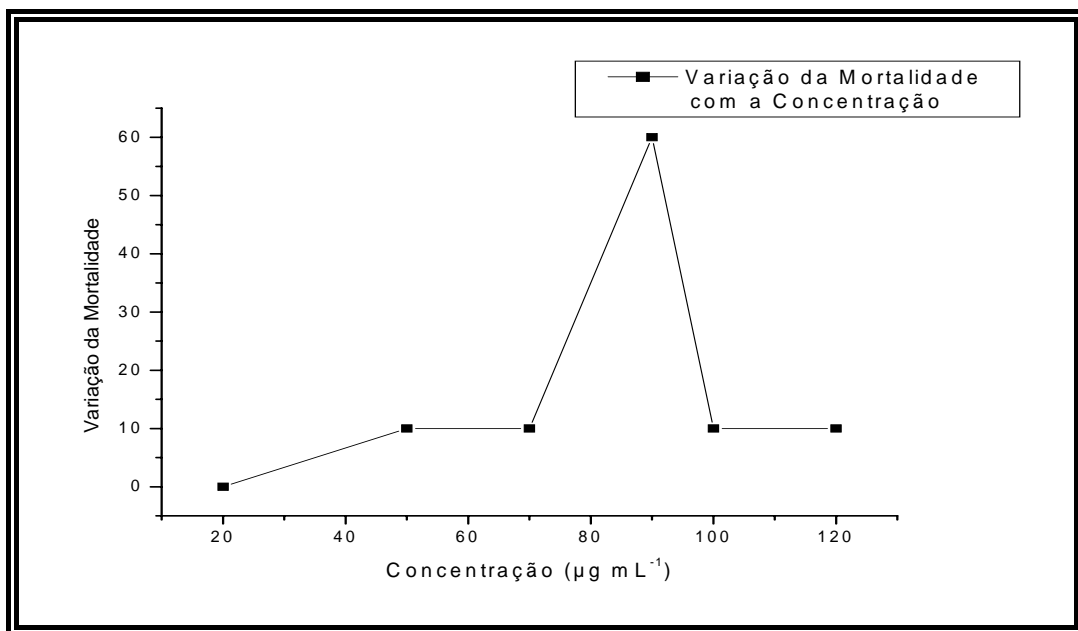


Figura 37. Variação da porcentagem de mortalidade com o aumento da concentração do padrão de Eugenol.

A co-evolução de plantas com insetos obrigou-as a criar defesas químicas naturais para o manejo de pragas de insetos. Sendo botânicas, essas defesas são menos propensas a causar danos ecológicos. Um grande número de plantas tem sido aproveitadas por suas propriedades inseticidas contra pragas de insetos diversos (RATTAN, 2010).

O óleo essencial da espécie vegetal *Syzygium aromaticum* bem como o padrão puro da substância eugenol demonstraram possuir atividade larvicida considerável contra o *Aedes aegypti*. Essa atividade pôde ser evidenciada pelos valores de CL_{50} abaixo de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo

de 63,36 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o óleo e de 79,39 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o padrão de eugenol.

Essa atividade larvicida do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* não foi de todo uma surpresa, pois encontra-se na literatura vários trabalhos sobre o potencial biológico desse óleo contra insetos e outros organismos. Segundo Shapiro (2011), o óleo de cravo tem sido estudado por suas propriedades antibacteriana, antimicrobiana e antifúngica contra manifestações cutâneas infecciosas, antiinflamatórias, repelentes, citotoxicidade contra insetos, anestésicas entre outras além de ter demonstrado ser ambientalmente seguro e não tóxico para os seres humanos, para uso em medicina, perfume e aromas alimentares.

De acordo com Chaieb (2007), a atividade biológica do óleo de *Eugenia caryophyllata* (outro nome de *Syzygium aromaticum*) foi investigada contra diversos parasitas. Foi mostrado que o óleo tem atividade contra larvas de *Culex pipiens*, atividade inseticida contra *Pediculus capitis* e mosquitos *Dirus anopheles*.

Iniang & Emosairue (2005 apud Lucca, 2009), estudando a atividade repelente de extratos aquosos de pantas sobre moleque-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus* Germar) obtiveram para cravo-da-índia e pimenta dióica um nível de repelência de 60 a 80%. Segundo os autores esse efeito repelente do cravo-da-índia estaria relacionado com sua característica pungente, que sugere uma ação fumigante contra insetos.

Dayan et al. (2009), citam o cravo da Índia como inseticida eficaz sobre pragas de artrópodes, pulgões, ácaros entre outros. Um estudo de Bhat & Kemprij (2009), confirmou o potencial biocida do óleo essencial das folhas de *S. aromaticum* contra o *Aedes albopictus*.

Dessa forma o óleo de cravo é usado na agricultura orgânica como uma alternativa para os métodos de agricultura não-orgânicos. Pois acredita-se ser o óleo de cravo um biopesticida mais seguro do que os pesticidas químicos (SHAPIRO, 2011).

Óleos essenciais de plantas em geral, têm sido reconhecidos como importantes recursos naturais de inseticidas. Sua natureza lipofílica

facilita-lhes interferir com funções metabólicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais dos insetos, sendo geralmente pesticidas ecologicamente menos agressivos e seguros para os seres humanos e outros mamíferos (PRAJAPATI, 2005).

No entanto, segundo Lahlou (2004), a atividade biológica de óleos essenciais está diretamente relacionada com sua composição química. Essa relação de composição e atividade, muitas vezes sugere que a atividade biológica de um óleo pode ser atribuída tanto a seus componentes majoritários, quanto a componentes presentes em menor concentração. É possível que eles ajam em conjunto sinergicamente, contribuindo para toxicidade total do óleo testado.

Nesse trabalho o componente majoritário foi identificado como sendo o Eugenol com (52,53%), segundo a literatura (BREWER, 2011), os principais componentes do óleo essencial de cravo são fenilpropanóides tais como eugenol, carvacrol, timol, e cinamaldeído. O cravo também contém uma variedade de compostos não-voláteis (taninos, esteróis, flavonóides e triterpenos). Algumas dessas substâncias como terpenos e fenilpropanóides voláteis sintetizados por espécies vegetais podem ter, dependendo do inseto em análise, propriedades atrativas (alimentação, polinização) e/ou deterrentes e inseticidas (SIMAS et al., 2004).

O eugenol pertence à classe dos fenóis e também é classificado como fenilpropanóide. Encontra-se na literatura relatos sobre a atividade larvicida desses compostos. Segundo (SIMAS et al., 2004), os fenilpropanóides safrol, eugenol e aldeído cinâmico foram ativos contra larvas do *Aedes aegypti* com CL_{50} de 49,0; 44,5 e 24,4 ppm, respectivamente. O eugenol e outros compostos das folhas de *Cinnamomum osmophloeum* mostraram ainda uma forte atividade contra cupins (*Coptotermes formosanus*). Possui também atividade inseticida comprovada contra espécies de besouros *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* (HUANG et al., 2002).

Em um estudo da ação larvicida de óleos contendo limoneno, linalol e eugenol frente ao mosquito *Aedes aegypti*, Furtado et al. (2005)

confirmaram atividade larvicida para esses compostos e segundo os autores os óleos apresentaram melhores atividades que os padrões testados isoladamente (como ocorreu no presente trabalho). Ainda segundo eles há a possibilidade de outros compostos serem responsáveis pela atividade larvicida do óleo essencial ou ainda a existência de um sinergismo entre o composto majoritário e outro(s) componente(s) do óleo, existentes em menor fração.

Esse tipo de comportamento de óleos essenciais já foi relatado em outros trabalhos. Em estudo de Gillij et al. (2008), com atividade repelente de óleos essenciais, o autor sugere que fenômenos sinérgicos entre os diversos componentes dos óleos essenciais podem resultar em uma maior bioatividade (um aumento de resposta repelente) do óleo como um todo em relação aos seus componentes isolados.

Geralmente se atribui o potencial biológico ao componente majoritário. No presente trabalho apesar de mostrado que o óleo essencial possui maior atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* deve-se ressaltar que o eugenol puro também se mostrou eficiente no combate às larvas. Evidenciando que um efeito sinérgico no óleo em questão não é responsável por conferir a atividade larvicida, mas sim potencializa essa atividade. Outras substâncias presentes em menor quantidade no óleo também possuem atividade contra insetos, o sesquiterpeno β -cariofileno é citado como um forte repelente contra o *Aedes aegypti* (GILLIJ et al., 2008).

Em trabalho de Simas et al. (2004), o autor destaca a importância da lipofilicidade de terpenos para a atividade larvicida em *Aedes aegypti*, quando se compararam monoterpenos e sesquiterpenos de estruturas correlatas. Também foi observada a menor atividade de fenilpropanóides contendo núcleos benzênicos que possuem substituintes nucleofílicos, como hidroxila, metoxila e benzodioxola.

O número de ligações duplas conjugadas parecem contribuir para um aumento na potência, já que compostos aromáticos, tais como,

timol, carvacrol, e eugenol apresentam potencial larvicida mais elevado do que a carvona (SANTOS et al., 2011).

De acordo com Rattan (2010), os óleos essenciais e seus constituintes afetam os processos bioquímicos, que especificamente perturbam o equilíbrio endócrino dos insetos. Eles podem ser neurotóxicos ou podem atuar como reguladores de crescimento de inseto, interrompendo o processo normal de morfogênese. Esse modo de ação neurotóxica possui os seguintes sintomas em artrópodes: hiperatividade seguido por hiperexcitação levando rapidamente à queda e imobilização. Essa ação neurotóxica foi reportada para o eugenol por Enan (2001 apud Fichi et al., 2007), tendo esse composto apresentado atividade neuroinseticida frente ao *Periplaneta americana*.

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

CAPÍTULO 6
CONCLUSÃO

6 - CONCLUSÃO

Diante dos resultados concluiu-se que foi possível caracterizar analiticamente o óleo essencial do *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), além disso:

- Os botões florais secos do *Syzygium aromaticum*, forneceram um óleo essencial cujo rendimento foi de 3,54% (m/m) e 3,63 (v/m), um valor considerado bom para extração por hidrodestilação;
- Quanto à qualidade, os parâmetros físico-químicos avaliados apresentaram resultados satisfatórios;
- A caracterização por CG-EM permitiu a identificação de cinco componentes presentes no óleo essencial. Além de identificar o componente majoritário do óleo como sendo o eugenol, o que se mostrou compatível com os dados encontrados na literatura;
- Os resultados mostrados sugerem que o óleo essencial de *Syzygium aromaticum* possui atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti*, mais acentuado do que o padrão puro de eugenol, com uma CL_{50} de 63,36 ($\pm 2,12$) $\mu\text{g.mL}^{-1}$.
- Dessa forma o óleo essencial dos botões florais de *Syzygium aromaticum* apresenta-se como uma alternativa natural no combate às larvas do *Aedes aegypti*. Os resultados foram considerados promissores, no entanto faz-se necessário um número maior de pesquisas até que se possa utilizar o óleo de *Syzygium aromaticum* como larvicida.

CAPÍTULO 7

PERSPECTIVAS FUTURAS

7 - PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realizar a extração do óleo essencial da espécie vegetal *Syzygium aromaticum* utilizando diferentes técnicas, como fluido supercrítico, verificando possíveis alterações na composição química, no rendimento e propriedades físicas;
- Isolar e testar como agentes larvicidas outros componentes do óleo essencial do *Syzygium aromaticum*;
- Testar a atividade do óleo frente a larvas de outras espécies nocivas aos seres humanos;
- Fazer a investigação do efeito residual do óleo essencial do *Syzygium aromaticum* (persistência larvicida).

8 - REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Illinois: Allured. p. 118, 2007.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(3): 472-508, 2008.
- ALDRICH. *Handbook of fine chemicals and laboratory equipment*. Brasil. p.804. 2001.
- ALMA, M. H.; ERTAS, M.; NITZ, S.; KOLLMANNBERGER, H. Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.). *BioResources*, 2(2): 265-269, 2007.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 66(1): 232-240, 2007.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475, 2008.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue in Brazil: Epidemiological situation and Contribution to a Research Agenda. *Estudos Avançados*, 22(64): 53-72, 2008.
- BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; QUEIROGA, M. F. C.; CASTRO JÚNIOR, F. P. Resistência de Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao Organofosforado Temefós na Paraíba. *Neotropical Entomology*. 36(2): 303-307, 2007.
- BHAT, S. K.; KEMPRAJ, V. Biocidal potential of clove oils against *Aedes albopictus* – A comparative study. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 8 (24): 6933-6937, 2009.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, Vol. 32, No 3: 588-594, 2009.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Serv. Saúde*. Brasília, 16(4): 279-293, 2007.

BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol . 10: 221-247, 2011.

CÂMARA, F. P.; THEOPHILO, R. L. G.; SANTOS, G. T.; PEREIRA, S. R. F. G.; CÂMARA, D. C. P.; MATOS, R. R. C. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(2): 192-196, 2007.

CARVALHO, M. S. L.; CALDAS, E. D.; DEGALLIER, N.; VILARINHOS, P. T. R.; SOUZA, L. C. K. R.; YOSHIZAWA, M. A. C.; KNOX, M. B.; OLIVEIRA, C. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. *Revista Saúde Pública*. 38(5): 623-629, 2004.

CAVALCANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M.; LIMA, M. A. A.; SANTANA, E. W. P. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L.. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 99(5): 541-544, 2004.

CDC, Centers for Disease Control and Prevent. Division of vector-borne infections diseases. Dengue fever. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue>>. Acessado em: 29 jul. 2011.

CERQUEIRA, M. D.; MARQUES, E. J.; MARTINS, D.; ROQUE, N. F.; CRUZ, F. G.; GUEDES, M. L. S. VARIACÃO SAZONAL DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). *Quimica Nova*, 32: 6, 1544-1548, 2009.

CEPLAC - Comissão Executiva de Planejamento da Lavoura Cacaueira. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/cravo.htm>>. Acessado em 15 set. 2011.

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

CHAIIB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A. B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The Chemical Composition and Biological Activity of Clove Essential Oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): A Short Review. *Phytotherapy research*, Vol. 21: 501-506, 2007.

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

CHUNG, I. M.; SEO, S. H.; KANG, E. Y.; PARK, W. H.; MOON, H. I. Larvicidal effects of the major essential oil of *Pittosporum tobira* against *Aedes aegypti* (L.). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 25(3): 391-393, 2010.

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

CORTEZ, D. A. G.; CORTEZ, L. E. R.; PESSINI, G. L.; DORO, D. L.; NAKAMURA, C. V. Análise do óleo essencial da alfavaca *Ocimum gratissimum* L. (LABIATAE). *Arq. Ciênc. Saúde*, 2(2):125, 1998.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. *Química Nova*, 16(3): 224-228, 1993.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. *Natural products in crop protection. Biorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 4022-4034, 2009.

Distribuição do *Aedes aegypti* no mundo em 2011. Países ou áreas de risco. WHO, World Health Organization. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_DengueTransmission_ITHRiskMap.png>. Acessado em: 15 de março de 2012.

DRÁUZIO VARELLA. *Aedes aegypti*. Disponível em: <<http://drauziovarella.com.br/doencas-e-sintomas/aedes-aegypti/>>. Acessado em 08 set. 2011.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytotherapy research*, 21: 308-323, 2007.

ENAN E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 130: 325-337, 2001.

FERNANDES, R. P. *Caracterização química, avaliação da citotoxicidade e avaliação da atividade moluscicida dos óleos essenciais extraídos da folha Pimenta dióica Lindl, casca Citrus limon linneo e rizoma do gengibre Zingiber officinale Roscoe frente ao molusco transmissor de esquistossomose*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2010. Tese de Doutorado, 123p.

FERREIRA, B. J.; SOUZA, M. F. M.; SOARES Filho, A. M.; Carvalho, A. A. Evolução histórica dos programas de prevenção e controle da dengue no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, 14(3): 961-972, 2009.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. *Quimica Nova*, 33(9): 1829, 2010.

FICHI, G.; FLAMINI, G.; GIOVANELLI, F.; OTRANTO, D.; PERRUCCI, S. Efficacy of an essential oil of *Eugenia caryophyllata* against *Psoroptes cuniculi*. *Experimental Parasitology*, Vol. 115: 168–172, 2007.

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

FUNASA. Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor : manual de normas técnicas. - 3. ed., rev. - Brasília : Ministério da Saúde : Fundação Nacional de Saúde. 84 p., 2001

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

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

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

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

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

GHEDIRA, K.; GOETZ, P.; LE JEUNE, R. *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflier. *Phytotherapie*, V.8: 37-43. 2010.

GIL, E. S.; PAULA, J. R.; NASCIMENTO, F. R. F.; BEZERRA, J. C. B. Produtos naturais com potencial leishmanicida. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 29, No.3: 223-230, 2008.

GILLIJ, Y.G.; GLEISER, R.M.; ZYGADLO, J.A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology*, Vol. 99: 2507–2515, 2008.

GLUBER, D. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990's: top down or bottom up. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40: 571-578, 1989.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. PLANTAS MEDICINAIS: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quimica Nova*, Vol. 30, No 2: 374-381, 2007.

GONÇALVES NETO, V. S.; REBÊLO, J. M. M. Aspectos epidemiológicos do dengue no Município de São Luís, Maranhão, Brasil, 1997-2002. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 20(5): 1424-1431, 2004.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 1-93, 2006.

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

HUANG, Y.; HO, S. H.; LEE, H. C.; YAP, Y. L. Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research*, Vol. 38: 403-412, 2002.

LUCCA, P. S. R. *Potencial inseticida de extratos de funcho, erva-doce, cravo-da-índia e do preparado homeopático para o controle de pulgão em couve*. Cascavel, programa de pós-graduação em engenharia agrícola, UNIOESTE, 2009. Dissertação de mestrado, 75p.

JANSEN, C. C.; BEEBE, N. W. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes and infection*, 12: 272-279, 2010.

KELECOM, A.; ROCHA, M. A.; MAJDALANI, E. C.; GONZALEZ, M. S.; MELLO, C. B. Novas atividades biológicas em antigos metabólitos: ácido oleanólico e eugenol de *Eugenia caryophyllata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Vol. 12: 70-71, 2002.

LAHLOU, M. Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils. *Phytotherapy research*, Vol. 18: 435-448, 2004.

LEE, K. G.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. *Food Chemistry*, 74: 443-448, 2001.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J. M. Óleos voláteis de espécies de *myrcia* nativas do rio grande do sul. *Quimica Nova*. Vol. 27, No. 6: 916-919, 2004.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 97: 199-206, 2005.

LUPE, F. A. *Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia*. Campinas, Instituto de Química, UNICAMP, 2007. Dissertação de mestrado, 120p.

MACIEL M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quimica Nova*, Vol. 25, No 3: 429-438, 2002.

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

MAROUN, S. L. C.; MARLIERE, R. C. C.; BARCELLUS, R. C.; BARBOSA, C. N.; RAMOS, J. R. M.; MOREIRA, M. E. L. Case report: vertical dengue infection. *Jornal de Pediatria*, 84(6): 556-559, 2008.

MARQUES, C.C.A. MIRANDA, C. Influência de extratos de formas evolutivas sobre atividades de oviposição de fêmeas de *Aedes (s) albopictus* (Skuse). *Ver. Saúde Publ.*, São Paulo, 26(4): 269-271, 1992.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. *Revista Brasileira de Botânica.*, V.26, No. 2: 231-238, 2003.

MEDRONHO, R. A. Dengue e o ambiente urbano. *Revista Brasileirade Epidemiologia*, 9(2): 159-161, 2006.

MELO-SANTOS, M. A. V.; VARJAL-MELO, J. J. M.; ARAÚJO, A. P.; GOMES, T. C. S.; PAIVA, M. H. S.; REGIS, L. N.; FURTADO, A. F.; MAGALHÃES, T.; MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; AYRES, C. F. J. Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Tropica*. 113: 180-189, 2009.

MENDONÇA, F. A.; SOUZA, A. V.; DUTRA, D. A. SAÚDE PÚBLICA, URBANIZAÇÃO E DENGUE NO BRASIL. *Sociedade & Natureza*, Uberlândia, 21 (3): 257-269, 2009.

MORAIS S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(1B): 315-320, 2009.

Mosquito *Aedes aegypti*. Disponível em:
<http://www.dengue.org.br/mosquito_aedes.html>. Acessado em 15 de março de 2012.

MOUCHREK FILHO, V.E. *Estudos Analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie Pimenta dioica Lindl.* São Carlos/SP, Programa de Pós-Graduação em Química, USP – Universidade de São Paulo, 2000. Tese de doutorado, 124p.

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

OLIVEIRA, M. L.; MELO, G. L.; NIELLA, A. R. R.; SILVA, V. R. Black root rot caused by *Rosellinia pepo*, a new disease of the clove tree in Brazil. *Tropical plant pathology*, Vol. 33(2): 90-95, 2008.

OLIVEIRA, R. A.; OLIVEIRA, F. F.; SACRAMENTO, C. K. Óleos essenciais: perspectivas para o agronegócio de especiarias na Bahia. *Bahia Agrícola*, 8(1): 46-48, 2007.

OLIVEIRA, R. A.; REIS, T. V.; SACRAMENTO, C. K.; DUARTE, L. P.; OLIVEIRA, F. F. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. *Revista brasileira de farmacognosia*, 19(3): 771-775, 2009.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L.G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, Vol. 32, No. 3: 887-893, 2008.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, Vol. 25, Supl. 1: 45-61, 2002.

PITASAWAT, B.; CHAMPAKAEW, D.; CHOOCHOT, W.; JITPAKDI, A.; CHAITHONG, U.; KANJANAPOTHI, D.; RATTANACHANPICHAI, E.; TIPPAWANGKOSOL, P.; RIYONG, D.; TUETUN, B.; CHAIYASIT, D. Aromatic plant-derived essential oil: An alternative larvicide for mosquito control. *Fitoterapia*, 78: 205-210, 2007.

PIZZI, M. Sampling variation of the fifty percent end-point, determined by the Reed-Muench (Behrens) method. *Human Biology*, 22: 151-191, 1950.

PRAJAPATI, V.; TRIPATHI, A. K.; AGGARWAL, K.K.; KHANUJA, S.P.S. Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bioresource Technology*, Vol. 96: 1749-1757, 2005.

PREFEITURA UNICAMP. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*.

Disponível em:

<http://www.cecom.unicamp.br/dengue/index.php?option=com_content&view=article&id=47&Itemid=54>. Acessado em 10 set. 2011.

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

RABÊLO, W. F.; *Caracterização química, citotoxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo-da-índia (Syzygium aromaticum)*. São Luís, Programa de Pós-Graduação em Química, UFMA, 2010. Dissertação de Mestrado, 80p.

RAINA, V. K.; SRIVASTAVA, S. K.; AGGARWAL, K. K.; SYAMASUNDAR, K. V.; KUMAR, S. Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. *Flavour and fragrance journal*, Vol. 16: 334–336, 2001.

RASGON. J. L. Mosquitoes attacked from within. *Nature*, 476: 407-408, 2011.

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

REGNAULT-ROGER, C. The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Reviews*, 2: 25-34, 1997.

REIS, T. V. Potencialidade das folhas do Craveiro-da-Índia cultivados no Sul da Bahia para extração de óleos essenciais. In: XLVI Congresso Brasileiro De Química, Associação Brasileira De Química, Salvador, 25 a 29 de setembro de 2006.

REVISTA GLOBO RURAL. Disponível em:

<<http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC1693044-4529,00.html>>. Acessado em 15 set. 2011.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; MENDONÇA, L. Z.; SOARES, M. J. *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Experimental Parasitology*, 116: 283-290, 2007.

SANTOS, S. R. L.; MELO, M. A.; CARDOSO, A. V.; Roseli L.C. SANTOS, R. L. C.; SOUSA, D. P.; CAVALCANTI, S. C. H. Structure–activity

relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. *Chemosphere*, Vol. 84: 150–153, 2011.

SHAPIRO, R. Prevention of Vector Transmitted Diseases with Clove Oil Insect Repellent. *Journal of Pediatric Nursing*. Article in press. 4 p. 2011.

SILVA, W. J.; DÓRIA, G. A. A.; MAIA, R. T.; NUNES, R. S.; CARVALHO, G. A.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; MARÇAL, R. M.; CAVALCANTI, S. C. H. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresource Technology*, 99: 3251-3255, 2008.

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

SILVESTRI, J. D. F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *Revista Ceres, Viçosa*, Vol. 57, No 5: 589-594, 2010.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. C.; CONCEIÇÃO, S. R.; KUSTER, R. M.; OLIVEIRA FILHO, A. M.; LAGE, C. L. S. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quimica Nova*, Vol. 27, No 1: 46-49, 2004.

SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G; DE MELO, J.C.P; MENTZ, L.A; PETROVICK, P.R. (Orgs.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: UFRGS, 1999.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; L.A.; PETROVICK. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: UFRGS. 821p., 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (orgs.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. PortoAlegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC. p. 387-415, 1999.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FELIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; BARBOSA FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma Revisão da Bioatividade e Potenciais Benefícios nos Distúrbios da Ansiedade em Modelos Animais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(4): 642-654, 2008.

SULIEMAN, A. M. E.; EL BOSRA, I. M. O.; EL KHALIFA, E. A. A. Nutritive value of clove and detection of antimicrobial effect of its bud oil. *Research Journal of microbiology*, 2(3): 266-271, 2007.

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

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Caderno Saúde Pública*. Rio de Janeiro, 18(3): 867-871, 2002.

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

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

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura?. *Química Nova*, Vol. 28, No 3: 519-528, 2005.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, Vol. 26, No. 3, 390-400, 2003.

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

YOO, C. B.; HAN, K. T.; CHO, K. S.; HA, J.; PARK, H. J.; NAM, J. H.; KIL, U. H.; LEE, K. T. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Letters*, 225: 41-52, 2005.