

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Caracterização Química, Avaliação Térmica e Atividade
Larvicida Frente ao *Aedes aegypti* do Óleo Essencial da
Espécie Vegetal *Aniba duckei* Kostermans

TESE DE DOUTORADO

SAPIENTIA AEDIFICAT

Rogério de Mesquita Teles

João Pessoa – PB

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO TÉRMICA E
ATIVIDADE LARVICIDA FRENTE AO *Aedes aegypti* DO
ÓLEO ESSENCIAL DA *Aniba duckei* Kostermans

ROGÉRIO DE MESQUITA TELES

Tese de doutorado apresentada ao
Centro de Ciências Exatas e da
Natureza da Universidade Federal da
Paraíba como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em
Química Orgânica.

Orientadores: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho

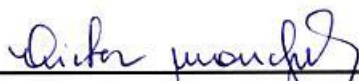
Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza

João Pessoa – PB

2009

**Caracterização Química, Avaliação Térmica e
Atividade Larvicida Frente ao *Aedes Aegypti* do
Óleo Essencial de Espécies Vegetal *Anila ducker
Kostermans*.**

Aprovada pela banca examinadora:



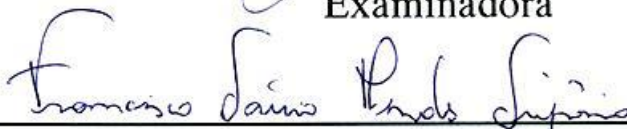
Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho
Orientador/Presidente



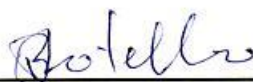
Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza
2º. Orientador



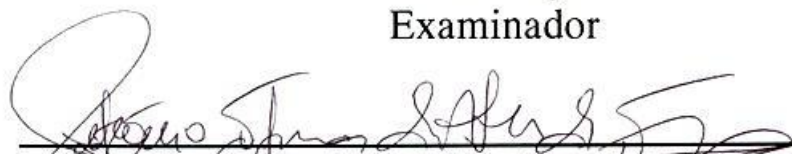
Profa. Dra. Maria Wilma Nupes Cordeiro Carvalho
Examinadora



Prof. Dr. Francisco Sávio Mendes Sinfrônio
Examinador



Prof. Dr. José Regis Botelho
Examinador



Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho
Examinador

T269c Teles, Rogério de Mesquita.

Caracterização química, avaliação térmica e atividade larvicida frente ao *aedes aegypti* do óleo essencial da aniba *duckei* Kostermans/ Rogério de Mesquita Teles. – João Pessoa, 2009. 97p.:il

Orientadores: Victor Elias Mouchrek Filho e Antonio Gouveia de Souza.

Tese (doutorado) – UFPb / CCEN.

1. Química Orgânica – Farmacologia.
2. Óleo essencial – Pau rosa – Linalol
3. *Aedes aegypti*.

UFPb/BC

CDU: 547: 615(043)

DEDICO ESTE TRABALHO

Ao meu pai, **Raimundo Teles Sobrinho**, pelo seu exemplo de vida que sempre me serve de estímulo em tudo que faço (*in memoriam*).

À minha mãe, **Cassiopa**, minha primeira e eterna professora, orientadora e, sobretudo incentivadora.

À minha tia, **Caciuda Mesquita**, que sempre me apoiou e estará eternamente presente em minha vida, sobretudo nos momentos de sucesso (*in memoriam*).

Aos meus irmãos, em especial **Aupicio Teles** e sua esposa **Terezinha**, pelos ensinamentos de pais, ajuda e estímulo que sempre me dedicaram.

À minha querida **Lara Rubia**,
pelo amor e pelos lindos
filhos **Felipe Rogério**, **Tiago
Rogério** e **Melissa Lara**. Vocês
são a verdadeira justificativa
deste trabalho.

Aos Profs. Drs. **Victor Elias Mouchrek Filho e Antonio Gouveia de Souza**, pela segura orientação deste trabalho, pela sincera amizade, pela compreensão e pelos ensinamentos transmitidos, que certamente serão para sempre.

"A procura da verdade é difícil e é fácil, já que ninguém poderá desvendá-la por completo ou ignorá-la inteiramente. Contudo, cada um de nós poderá acrescentar um pouco de nosso conhecimento sobre a natureza e, disto, uma certa grandeza emergirá."

Aristóteles, 350 a.C.

AGRADECIMENTOS

Deus,

Por direcionar meu caminho e está sempre me amparando.

Natureza,

Por permitir o meu crescimento pessoal e profissional através do contato direto com plantas medicinais.

Profs. Drs. Victor e Gouveia, pais científicos,

Pela orientação em todos os momentos, pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento, e pela compreensão.

São Benedito do Rio Preto – MA,

Berço querido, Terra que Deus escolheu para derramar as bênçãos.

Profs. Drs. João Mouchrek e Adenilde,

Pela amizade e incentivo.

A todos os colegas de doutorado, em especial aos Amigos Odair, Vasco, Joelson, Manassés, Antônio e Silvio,

Pelo constante incentivo, por compartilhar dificuldades e comemorar conquistas.

CEFET-MA, em especial aos amigos do DAQ,

Pela compreensão ao longo deste doutoramento e pela amizade.

UFPB

Pela oportunidade do doutorado nesta Universidade.

Prof. Dr. Jamal Chaar,

Pela amizade, pelo apoio e pela receptividade em seu LAPEC.

Amigos do GEOALPHA,

*Pela presença constante na minha vida, sempre torcendo,
vibrando e me ajudando a caminhar, dividindo e somando
crescimento.*

Marlúcia,

Pela colaboração indispensável.

*Amigos da UFPB, Manoel, Raul, Lúcia,
Marta, Geuza e Marcos Pequeno,*

*Importantes colaboradores. Não apenas no
desenvolvimento deste trabalho, mas do próprio
doutoramento.*

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
Capítulo 1	
INTRODUÇÃO.....	1
Capítulo 2	
OBJETIVOS.....	2
Capítulo 3	
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	3
3.1 A Dengue.....	3
3.2 Considerações sobre o Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	5
3.2.1 O ciclo de vida.....	7
3.2.1.1 O Ovo.....	7
3.2.1.2 A larva.....	8
3.2.1.3 A Pupa.....	9
3.2.1.4 O adulto.....	9
3.3 O uso de Plantas Medicinais.....	10
3.4 Plantas e Suas Atividades Larvicidas.....	12
3.5 Metabolismo Vegetal Secundário.....	14
3.6 Óleos Essenciais.....	15
3.6.1 Definições e Características.....	15
3.6.2 Processos de extração.....	16
3.6.2.1 Arraste por vapor d'água.....	16
3.6.3 Funções Biológicas e Dados Farmacológicos.....	16
3.7 A Reserva Ducke.....	17
3.8 A Espécie <i>Aniba duckei</i> Kostermans.....	18

3.9	Óleo essencial da espécie <i>Aniba duckei</i> Kostermans	21
3.10	Técnicas Analíticas.....	23
3.11	Análise Térmica.....	24
3.11.1	Conceito	24
3.11.2	Técnicas Termoanalíticas.....	25
3.11.2.1	Termogravimetria (TG)	25
3.11.2.2	Termogravimetria Derivada (DTG).....	26
3.11.2.3	Análise Térmica Diferencial (DTA).....	27
3.11.2.4	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	27

Capítulo 4

METODOLOGIA EXPERIMENTAL	29
4.1 Materiais e Equipamentos.....	29
4.1.1 Moinho elétrico	29
4.1.2 Refratômetro	29
4.1.3 Extrator de Clevenger	30
4.1.4 Espectrômetro Ultravioleta	30
4.1.5 Espectrômetro Infravermelho com Transformada de Fourier (Interferômetro)	31
4.1.6 Cromatógrafo a gás acoplado a Espectrômetro de Massas	31
4.1.7 Estudo térmico	31
4.2 Metodologia experimental.....	32
4.2.1 Origem, Coleta Preparação e Armazenamento da Amostral Vegetal.....	32
4.2.2 Extração do óleo essencial.....	32
4.2.2.1 Determinação do tempo de extração	33
4.2.3 Padrões	33
4.2.4 Características Físicas do Óleo Essencial.....	33
4.2.4.1 Densidade	33
4.2.4.2 Solubilidade em Etanol (70%)	34
4.2.4.3 Índice de Refração.....	34
4.2.4.4 Rendimento do Óleo Essencial	34
4.2.4.5 Cor.....	34
4.2.4.5 Aparência	35
4.2.5 Análises Espectroscópicas	35

4.2.5.1 Análise Espectroscópicas na Região do Ultravioleta-Visível	35
4.2.5.2 Análise Espectroscópicas na Região do Infravermelho	35
4.2.5.3 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas.....	35
4.2.6 Quantificação de Linalol por Cromatografia Gasosa	36
4.2.7 Estudo Térmico	36
4.2.8 Obtenção e Cultivo das Larvas.....	36
4.2.9 Teste de Toxidade	37
4.2.10 Análise Estatística	38
Capítulo 5	
RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Estudo do tempo de extração do óleo essencial.....	40
5.2 Características físicas do óleo essencial	41
5.3 Análises espectroscópicas e cromatográficas do óleo essencial dos frutos da espécie <i>Aniba duckei</i> K.	43
5.3.1 Análise espectroscópica na região do Ultravioleta	43
5.3.2 Análise espectroscópica na região do Infravermelho	44
5.3.3 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas.....	47
5.3.4 Quantificação por Cromatografia Gasosa	56
5.4 Análise térmica do óleo essencial	58
5.4.1 Calorimetria exploratória diferencial	58
5.4.2 Análise Termogravimétrica	64
5.5 Atividade Larvicida do óleo Essencial	69
Capítulo 6	
CONCLUSÃO	81
Capítulo 7	
PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	83
Capítulo 8	
REFERÊNCIAS.....	84

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°GL	Grau Gay-Lussac
μ g	Micrograma
CG	Cromatografia Gasosa
CL ₅₀	Concentração letal 50%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
d.C.	Depois de Cristo
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Termogravimetria Derivada
EM	Espectrometria de Massas
eV	Elétron-Volt
F.M.	Fórmula Molecular
FHD	Febre de Dengue Hemorrágica
FNS	Fundação Nacional de Saúde
FT	Transformada de Fourier
FUNASA	Fundação Nacional da Saúde
ICTA	International Confederation of Thermal Analysis and Calorimetry
IE	Impacto de elétrons
INPA	Instituto Nacional para o Progresso da Amazônia
ISO	International Standard Organization
IV	Infra-Vermelho
LACOM	Laboratório de Combustíveis e Materiais
LAPEC	Laboratório de Pesquisas e Ensaio de Combustíveis
LPQA	Laboratório de Pesquisa em Química Analítica
m/z	Relação carga-massa
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
PIB	Produto Interno Bruto

ppm	Partes por Milhão
SUDAM	Superintendência de Desenvolvimento da Amazônia
SVS	Secretaria de Vigilância
TG	Termogravimetria
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UV	Ultra-Violeta

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	7
Figura 3.2. Ovos do <i>Aedes aegypti</i>	8
Figura 3.3. Larvas do <i>Aedes aegypti</i> em terceiro estágio.....	9
Figura 3.4. Mosquito <i>Aedes aegypti</i> na fase adulta.....	10
Figura 3.5. Reserva Florestal Adolfo Ducke (Reserva Ducke).....	18
Figura 3.6. Árvores plantadas em área de cultivo do Pau Rosa na Reserva Florestal Ducke – Manaus / AM.....	20
Figura 3.7. Fórmulas do linalol: estrutural e Molecular.	22
Figura 3.8. Estruturas enantioméricas do linalol.....	23
Figura 5.1. Sistema Extrator de Clevenger Adaptado.....	30
Figura 4.2. Armadilha para obtenção dos ovos do <i>Aedes aegypti</i>	37
Figura 4.1. Variação do rendimento de óleo essencial em função do tempo de extração.	41
Figura 5.2. Espectros de absorção no UV: (A) mistura de etanol/água a 60 %. (B) padrão de linalol e (C) óleo essencial extraído de galhos.	43
Figura 5.3. Espectro na região do Infravermelho: (A) padrão de linalol e (B) óleo essencial extraído dos galhos da espécie <i>Aniba duckei</i> Kostermans.	45
Figura 5.4 cromatograma do óleo essencial extraído dos galhos da espécie <i>Aniba duckei</i> Kostermans.....	47
Figura 5.5. Espectros de massas: (A) Composto do pico 5 do cromatograma da Figura 11; (B) Padrão de linalol.....	49
Figura 5.6. Espectro de massas correspondente ao pico 1 do cromatograma da Figura 5.4., limoneno.	50

Figura 5.7. Espectro de massas correspondente ao pico 2 do cromatograma da Figura 5.4., Cineol.....	51
Figura 5.8. Espectro de massas correspondente ao pico 3 do cromatograma da Figura 5.4, cis-óxido de linalol.....	52
Figura 5.9. Espectro de massas correspondente ao pico 4 do cromatograma da Figura 5.4, trans-óxido de linalol.	53
Figura 5.10. Espectro de massas correspondente ao pico 6 do cromatograma da Figura 5.4, α -terpineol.....	53
Figura 5.11. Espectro de massas correspondente ao pico 7 do cromatograma da Figura 5.4, Copaeno.....	54
Figura 5.12. Espectro de massas correspondente ao pico 8 do cromatograma da Figura 5.4, octehidro-tetrametilmetanoazuleno.	55
Figura 5.13. Espectro de massas correspondente ao pico 9 do cromatograma da Figura 5.4, cariofileno.....	56
Figura 5.14. Curva analítica obtida pelo método do Padrão Externo para determinação do Linalol no óleo essencial da espécie vegetal <i>Aniba duckei</i> Kostermans	57
Figura 5.15. Curva analítica obtida pelo método do Padrão Externo, com cromatogramas, para determinação do Linalol no óleo essencial da espécie vegetal <i>Aniba duckei</i> Kostermans	58
Figura 5.16. Curva DSC para padrão de linalol em atmosfera de ar e panela de alumínio sem furo, com razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	59
Figura 5.17. Curva DSC para o óleo essencial da <i>Aniba dukei</i> K em atmosfera de ar e panela de alumínio sem furo, com razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	60
Figura 5.18. Curva DSC para padrão de linalol em atmosfera de N ₂ e panela de alumínio sem furo, com razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	61

Figura 5.19. Curva DSC para o óleo essencial da <i>Aniba dukei</i> K em atmosfera de N ₂ e panela de alumínio sem furo, com razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	62
Figura 5.20. Curva DSC para o óleo essencial da <i>Aniba dukei</i> K em atmosfera de N ₂ e panela de alumínio com furo, com razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	63
Figura 5.21. Curvas TG-DTG para o padrão de linalol em atmosfera de atmosfera de ar	65
Figura 5.22. Curvas TG-DTG para o óleo essencial da espécie vegetal <i>Aniba duckei</i> K. em atmosfera de ar	65
Figura 5.23. Curvas TG-DTG para o padrão de linalol em atmosfera de N ₂	66
Figura 5.24. Curvas TG-DTG para o óleo essencial da espécie vegetal <i>Aniba duckei</i> K. em atmosfera de N ₂	67
Figura 5.25. Curvas TG do óleo essencial da espécie vegetal <i>Aniba duckei</i> K. e do padrão de linalol, em diferentes atmosferas.	68
Figura 5.26. Taxa de Mortalidade das larvas do <i>aedes aegypti</i> expostas a sete concentrações diferentes do óleo essencial de <i>Aniba duckei</i> Kostermans, após 24 horas.	70
Figura 5.27. Estimativa da LC50 do óleo essencial de <i>Aniba duckei</i> K pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas.	71
Figura 5.28. Taxa de Mortalidade das larvas do <i>aedes aegypti</i> expostas a sete concentrações diferentes do padrão de dl-linalol, após 24 horas.	73
Figura 5.29. Estimativa da LC50 do padrão de dl-linalol pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas.	74
Figura 5.30. Taxa de Mortalidade das larvas do <i>aedes aegypti</i> expostas a sete concentrações diferentes do padrão de l-linalol, após 24 horas.	76
Figura 5.31. Estimativa da LC50 do padrão de l-linalol pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Análises térmicas.	25
Tabela 5.1. Propriedades físicas do óleo essencial extraído de galhos da espécie <i>Aniba duckei</i> Kostermans.	42
Tabela 5.2. Principais bandas de absorção e modos vibracionais do padrão de linalol e do óleo essencial na região do infravermelho.	46
Tabela 5.3. Compostos identificados na amostra de óleo essencial de galhos da espécie <i>Aniba duckei</i> Kostermans.	48
Tabela 5.4. Mortalidade das larvas do <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição a várias concentrações do óleo essencial da espécie vegetal <i>Aniba duckei</i> Kostermans.	69
Tabela 5.5. Mortalidade das larvas do <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição a várias concentrações padrão de dl-linalol.	72
Tabela 5.6. Mortalidade das larvas do <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição a várias concentrações do padrão de l-linalol.	75

Título: Caracterização Química, Avaliação Térmica e Atividade Larvicida Frente ao *Aedes aegypti* do Óleo Essencial da Espécie Vegetal *Aniba duckei* Kostermans

Autor: Rogério de Mesquita Teles

Orientadores : Prof. Dr. Víctor Elias Mouchrek Filho

Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza

RESUMO

O *Aedes aegypti* é o vetor de quatro sorotipos do flavivírus causador da dengue clássica e da febre hemorrágica da dengue. Até o momento não existe vacina para a dengue, e a melhor forma de combater a doença é atacar o vetor, principalmente eliminando os locais onde ocorre a oviposição e o desenvolvimento de suas larvas. Atualmente esse controle é feito através aplicações de inseticidas organofosforados em doses cada vez maiores, o que tem selecionado populações resistentes do mosquito. Em todo o mundo diversas pesquisas são desenvolvidas no sentido de encontrar substância de origem vegetal, como alternativa para o controle da dengue. Este trabalho teve como objetivo identificar os componentes do óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans, pau-rosa amazônico, uma espécie nativa da região amazônica, da família das Lauráceas, com árvores de até 30 metros de altura e um metro de diâmetro. Seu óleo essencial é utilizado em perfumaria, devido ao seu alto teor de linalol. Nesta pesquisa, extraiu-se o óleo essencial dos galhos finos da *Aniba duckei* Kostermans por hidrodestilação. Foram determinadas propriedades físicas e químicas, além do rendimento, incluindo o estudo do tempo de extração. As técnicas de espectrometria no ultravioleta e visível (UV-Vis), infravermelho e de massas foram empregadas para a identificação de seus componentes. Usou-se a cromatografia gasosa para a quantificação, pelo método do padrão externo, do principal componente. Fez-se o estudo térmico do óleo. O rendimento médio foi de 1,93%. Os espectros na região do infravermelho e espectro de massas confirmaram a presença majoritária do linalol. A concentração deste foi de 89,34 % no óleo essencial. Também foi determinado o ponto de ebulição e a entalpia para o óleo essencial e o padrão de linalol por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Fez-se a aplicação do óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans e dos padrões de l-linalol e dl-linalol como agente larvicida do mosquito *Aedes aegypti*. As Concentrações letais 50%, concentração na qual metade das larvas morre, para o óleo essencial, para o l-linalol e para o dl-linalol foi de 250,61 ($\pm 2,20$) $\mu\text{g mL}^{-1}$, 279,89 ($\pm 2,12$) $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 346,73 ($\pm 2,14$) $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Palavras-chave: Óleo essencial; *Aniba duckei* Kostermans; Linalol; *Aedes aegypti*; larvicida.

Author: Rogério de Mesquita Teles
Advisers: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho
Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza

ABSTRACT

Aedes aegypti is the vector of four flavivirus serotypes causing the classical dengue and the dengue haemorrhagic fever. Up to now, there is no vaccine against dengue, and the best way to fight the disease is to attack the vector, mainly eliminating the places where occurs the oviposition and the development of its larvae. Nowadays this control is done through the application of organophosphorus insecticides at higher and higher doses, what has selected resistant populations of the insect. All over the world, several research activities are being developed aiming at finding out a substance of vegetable origin, as an alternative for the dengue control. The present work had as objective to identify the components of the essential oil from *Aniba duckei* Kostermans, a species native from the Amazonian region, from the Lauraceae family, with trees of up to 30m high and one meter diameter. Its essential oil is used in the perfume industry, due to its high linalol content. In the present work, the essential oil was extracted from fine branches of *Aniba duckei* Kostermans por hydrodistillation. The physical and chemical properties were determined, besides the yield, including the study of the extraction time. The techniques of UV/Vis spectrometry, infrared spectrometry and mass spectrometry were utilized for the identification of its components. The main component was quantified by gas chromatography, by the external standard method. A thermal study of the oil was carried out. The average yield was determined as 1.93%. The infrared and mass spectra confirmed the presence of linalol as the main component, reaching a content of 89.34 % in the essential oil. The boiling point and the enthalpy of the essential oil and the linalol standard were determined using the technique of Differential Scanning Calorimetry (DSC). The essential oil from the species *Aniba duckei* Kostermans and standards of l-linalol and dl-linalol were applied as larvicide agents for the *Aedes aegypti* mosquito. The 50% letal concentration, a concentration at which 50% of the larvae die, for the essential oil, for the l-linalol and for the dl-linalol were of 250. 61 (± 2.20) $\mu\text{g mL}^{-1}$, 279.89 (± 2.12) $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 346.73 (± 2.14) $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

Keywords: Essential oil; *Aniba duckei* Kostermans; Linalol; *Aedes aegypti*; larvicide.

1 - Introdução

1 INTRODUÇÃO

Em termos de morbidade e mortalidade, a dengue é considerada atualmente a mais importante doença viral humana transmitida por mosquitos, sendo um sério problema de saúde pública dos centros urbanos das áreas tropicais da América do Sul, América Central, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental (MS-FNS, 2002). Trata-se da arbovirose mais importante no mundo, com estimativa de 50 milhões de infecções por ano (COELHO, 2006).

Como não existem vacinas validadas para o uso contra a dengue, o melhor método de controle da doença é a prevenção, ou seja, atacando o vetor, o *Aedes aegypti*. O controle vetorial é feito eliminando os locais propícios à oviposição ou combatendo as larvas desse mosquito. Atualmente, esse combate é feito por meio de aplicações de inseticidas organofosforados. Porém, o uso frequente e em doses cada vez maiores desses produtos, tem desenvolvido resistência pelo mosquito aos pesticidas comumente utilizados, dificultando o trabalho. Verificou-se a existência de populações resistentes a inseticidas organofosforados (LIMA, *et al.*, 2003; BRAGA, *et al.*, 2004), requerendo, dessa forma, a necessidade de novas pesquisas em busca de compostos com essa atividade.

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

No sentido de contribuir com o combate a larvas do *Aedes aegypti*, no presente estudo extraiu-se o óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans, realizou-se o estudo de suas características físicas, de sua composição química e sua análise térmica, além de testá-lo como larvicida junto a larvas do mosquito *Aedes aegypti* em terceiro ou quarto estágio.

2 - Objetivos

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo geral caracterizar química termicamente o óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans e avaliar sua atividade como agente larvicida frente a larvas do *Aedes aegypti* no terceiro estágio.

Para tanto tornou-se necessário o cumprimento dos seguintes objetivos específicos:

i. Extrair o óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans coletado da Reserva Vegetal Adolfo Ducke (Reserva Ducke) em Manaus – AM;

ii. Caracterizar fisicamente o óleo essencial;

iii. Identificar analiticamente os componentes do óleo, usando cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas, espectroscopia no ultravioleta e infravermelho;

iv. Analisar termicamente o óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans pelas técnicas Termogravimetria (TG), Termogravimetria Derivada (DTG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC);

v. Testar a atividade larvicida óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans, e dos padrões de linalol, l-linalol e dl-linalol frente a larvas do *Aedes aegypti* entre os terceiro e quarto estágios.

3 - Fundamentação Teórica

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 A Dengue

A dengue é uma doença infecciosa de origem viral, transmitida para o homem por meio de fêmeas de mosquito *Aedes*. O principal vetor é o inseto *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera:Culidae), também vetor da febre amarela urbana, embora outras espécies de *Aedes* possam estar envolvidas nessa transmissão (HALSTEAD, 1997; COELHO, 2006). A dengue apresenta evolução benigna na forma clássica, a Dengue Clássica, e grave, na forma hemorrágica, a Febre Hemorrágica da Dengue, FHD (KUNO, 1995).

Trata-se de uma arbovirose, cujo vírus da família Flaviviridae e do gênero *Flavivirus* se apresenta em quatro sorotipos: *Dengue vírus 1*, *Dengue vírus 2*, *Dengue vírus 3* e *Dengue vírus 4*. Em termos de morbidade e mortalidade, a dengue é a mais importante doença viral humana transmitida por mosquitos e constitui sério problema de saúde pública dos centros urbanos das áreas tropicais da América do Sul, América Central, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental (MS-FNS, 2002).

A doença é conhecida clinicamente nas Américas desde o final do século 18, surto ocorrido na Filadélfia, Estados Unidos, em 1780, sendo que o isolamento do vírus nas Américas aconteceu pela primeira vez apenas em 1953 na Ilha de Trinidad (Caribe), com a identificação do *Dengue vírus 2*. Em 1963, o *Dengue vírus 3* foi identificado em epidemia de Dengue Clássica que afetou o Caribe e a Venezuela (OPAS, 1997).

No Brasil, várias epidemias de Dengue foram registradas em 1846-1848 no Rio de Janeiro, São Paulo, Salvador e outras cidades. Em 1851 e 1853, novas epidemias aconteceram na cidade de São Paulo, com reemergência em 1916. Em 1923 foi relatada uma epidemia de Dengue em Niterói/RJ (MS-FNS, 1996).

Capítulo 3 Fundamentação Teórica

O vetor foi declarado erradicado no território brasileiro por duas vezes. A primeira, em 1958, voltando em menos de uma década, em 1967, em Belém – PA, e em outros 23 municípios do Estado. Dois anos depois foi detectada a presença do *Aedes aegypti* em São Luís e São José do Ribamar, no Maranhão. Em 1973, com a eliminação do último foco de *Aedes aegypti* em Belém/PA, o vetor foi considerado erradicado do Brasil pela segunda vez. A reintrodução foi registrada em 1976 na cidade de Salvador – BA (MS-FNS, 2001).

Durante a década de 1980, a magnitude do problema da dengue nas Américas, caracterizada por uma importante dispersão geográfica da doença, aumentou consideravelmente. Em 1982, em Boa Vista/RR, ocorreu uma epidemia causada pelos sorotipos *Dengue vírus-1* e *Dengue vírus-4*, rapidamente controlada. Em 1986, o *Dengue vírus-1*, introduzido no Rio de Janeiro/RJ, Niterói/RJ e Maceió/AL – causou surtos epidêmicos importantes e desde então propaga-se pela maioria dos estados brasileiros. Em 1990, novas ocorrências da doença no país apresentaram-se em ondas epidêmicas com aumento de circulação do *Dengue vírus-1* e introdução do *Dengue vírus-2* no Rio de Janeiro/RJ, momento em que se registram os primeiros casos de FHD no Brasil, com 462 casos confirmados e oito óbitos (FIGUEIREDO *et al.*, 1990).

A situação epidemiológica torna-se grave em todo o país a partir de 1994. Nesse ano, 18 estados brasileiros reportam a ocorrência do *Aedes aegypti*. Em 1995, o vetor foi encontrado em 24 estados e no Distrito Federal, as exceções foram o Amazonas e o Amapá. A presença do vetor já é detectada em todos os estados em 1998 (MESSER *et al.*, 2003). Em 1999, há notificações de Dengue em 1.946 municípios distribuídos por 23 estados (MS, 2001). No ano seguinte ocorre uma epidemia no Estado do Rio de Janeiro, com a notificação de 4.281 casos de Dengue. Em 2001, registra-se o isolamento do *Dengue vírus-3* em paciente da região metropolitana do Rio de Janeiro. Esse novo vírus provocou uma epidemia sem precedentes, em 2002, no Estado do Rio de Janeiro, com a notificação de 254.862 casos. As vinte e sete unidades da federação notificaram 783.143 casos da doença. As notificações do Rio Grande do Sul e Santa Catarina são referentes a casos importados (MS/SVS, 2003).

Capítulo 3 Fundamentação Teórica

No ano de 2006, foram registrados 345.922 casos, sendo as regiões mais acometidas, o Sudeste (141.864) e o Nordeste (105.017 casos). Foram notificados 682 casos de Febre Hemorrágica da Dengue e 76 óbitos. A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde registrou no período de janeiro a julho de 2007, 438.949 casos de dengue clássica, 926 casos de Febre Hemorrágica da Dengue e a ocorrência de 98 óbitos, sendo que no Maranhão ocorreram 10.442 casos dos quais 81 foram de dengue hemorrágica, havendo 5 mortes (MS/SVS, 2007).

De acordo com o Levantamento Rápido de Índice de Infestação por *Aedes aegypti* (LIRAA), em 2008, dos 2.324 extratos avaliados (áreas de 9 mil a 12 mil imóveis com características semelhantes) 1.344 apresentaram índice de infestação abaixo de 1,0%, considerada uma faixa satisfatória de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS). A quantidade de locais com este perfil em 2008 correspondeu a 57,8% do total de extratos avaliados. Em 2007, o percentual foi de 53,8% de um grupo de 2.130. Quando os locais avaliados (estratos) apresentam menos de 1,0%, significa que há menos de uma casa com larvas do mosquito da dengue para cada grupo de 100, no momento da realização desse trabalho (MS/SVS, 2008).

Porém, de acordo com esses mesmos dados do Ministério da Saúde, pode-se perceber que na avaliação das capitais, 14 estão em estado de alerta, ou seja, os estratos apresentaram infestação entre 1 e 3,9%, dentre elas São Luís – MA.

O principal vetor da Dengue no Brasil é o *Aedes aegypti*, pertencente ao FILO Arthropoda, SUBFILO Mandibulata, CLASSE Insecta, SUBCLASSE Pterygota, ORDEM Diptera, SUBORDEM Nematocera, FAMÍLIA Culicidae, SUBFAMÍLIA Culicinae, GÊNERO *Aedes* (REY, 1992).

3.2 Considerações Sobre o Mosquito *Aedes Aegypti* Lineau, 1762

A distribuição do vetor da dengue, o *Aedes aegypti*, é cada vez mais abrangente. O rápido crescimento e urbanização das populações nas áreas tropicais, sem infra-estrutura básica de saneamento, ampliaram a faixa de ocorrência desta arbovirose, em razão da difusão do mosquito em áreas antes livres da doença. Esse mosquito é também vetor urbano da

febre amarela, aumentando o risco de urbanização dessa doença, mantida primariamente em área silvestre por mais de meio século. Entretanto, ao contrário da febre amarela, a dengue apresenta um único ciclo epidemiológico, o urbano. Os principais elementos desse ciclo são o homem (o hospedeiro) e o *Aedes aegypti* (o vetor) (GUBLER, 1989; REBÊLO *et al*, 1999; SILVA *et al.*, 2008).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) o vírus da dengue é o mais importante arbovírus para o homem e, uma vez que o mosquito *Aedes aegypti* é o hospedeiro natural desse vírus, ele também tem sido muito estudado. Muitas pessoas morrem no Brasil devido a dengue hemorrágica e muitas outras sofrem ao se contagiar (OMS).

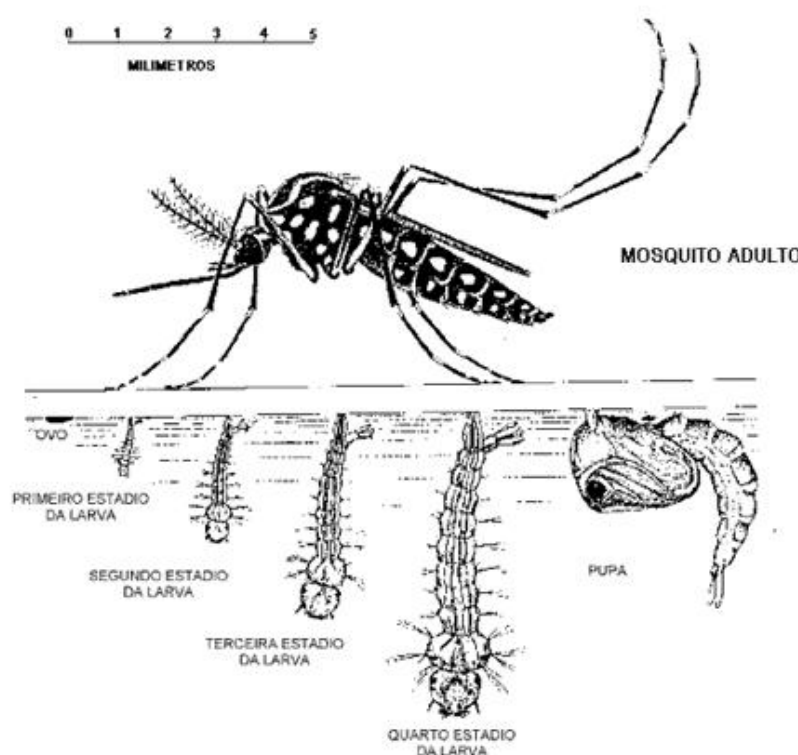
O *Aedes aegypti* é um vetor oriundo do continente africano, trazido juntamente com os escravos. Foi erradicado do Brasil pela primeira vez em 1958, mas, em 1967, reapareceu em São Luís e Belém, sendo em seguida eliminado. Em 1976, com origem em um foco em Salvador, inicia-se a recolonização no Brasil. Em 1977, foi encontrado no Rio de Janeiro e Santos; em 1979, em Natal, e em 1981, no Paraná (NEVES e SILVA, 1995). Durante esses anos, as medidas de controle eram esporádicas e isoladas (REBÊLO *et al*, 1999).

A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) registrou no período de janeiro a julho de 2007, 438.949 casos de dengue clássica, 926 casos de Febre Hemorrágica da Dengue e a ocorrência de 98 óbitos, um aumento de 136.488 casos de dengue no país. Outro aspecto epidemiológico relevante em 2007 relaciona-se a concentração de casos de Febre Hemorrágica da Dengue, sendo 68,0% das notificações nos estados do Ceará, Rio de Janeiro, Maranhão, Pernambuco, Mato Grosso do Sul, Amazonas e Piauí. A mesma característica é observada em relação aos óbitos, concentrando-se 50,0% nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Pará e Piauí (MS/FNS, 2007).

3.2.1 O Ciclo de Vida

Para o aprimoramento das formas de combate ao vetor *Aedes aegypti*, o conhecimento do ciclo de vida do mosquito contribui para melhoria das formas de combate a esse vetor. O *Aedes aegypti* é uma espécie doméstica, que se reproduz, preferencialmente, em água parada e limpa, acumulada em recipientes fabricados pelo homem, como latas, pneus, vasos etc, dentro ou perto das habitações.

Seu ciclo de vida compreende 4 estágios: OVO – LARVA – PUPA – ADULTO, conforme mostrado na Figura 3.1. Os três primeiros estágios são aquáticos



(Fonte: <http://dengue.blogspot.com/dengue/aedes-aegypti>)

Figura 3.1 Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*.

3.2.1.1 O Ovo

O ovo do *Aedes aegypti* (Figura 3.2), mede aproximadamente um milímetro de comprimento, com contorno alongado e fusiforme sendo depositado individualmente, nas paredes dos depósitos que servem como criadouros, próximos à lâmina da água; no momento da postura os ovos são

Capítulo 3 Fundamentação Teórica

brancos, mas nas primeiras vinte e quatro horas adquirem a cor negra; a formação do embrião se completa em 48 horas; são capazes de resistir a longos períodos de dessecação. De acordo com dados da FUNASA, ovos com até 450 dias, sofrem eclosão, quando colocados em contato com a água. A capacidade de resistência dos ovos é um sério obstáculo para sua erradicação. Esta condição permite que os ovos sejam transportados a grandes distâncias, em recipientes secos, tornando-se assim, o principal meio de dispersão do inseto (FUNASA, 2007).



Figura 3.2. Ovos do *Aedes aegypti* vistos em dois tamanhos ao microscópio óptico

3.2.1.2 A Larva

As larvas, Figura 3.3, alimentam-se de substâncias orgânicas, bactérias, fungos e protozoários existentes na água. A duração da fase larval, em condições favoráveis de temperatura (25 a 29 °C) e boa alimentação, pode chegar a 10 dias, podendo se prolongar por algumas semanas. Movimenta-se em forma de serpente, como um “S”. É sensível a movimentos bruscos na água, movimenta-se com rapidez e se refugia no fundo do recipiente.

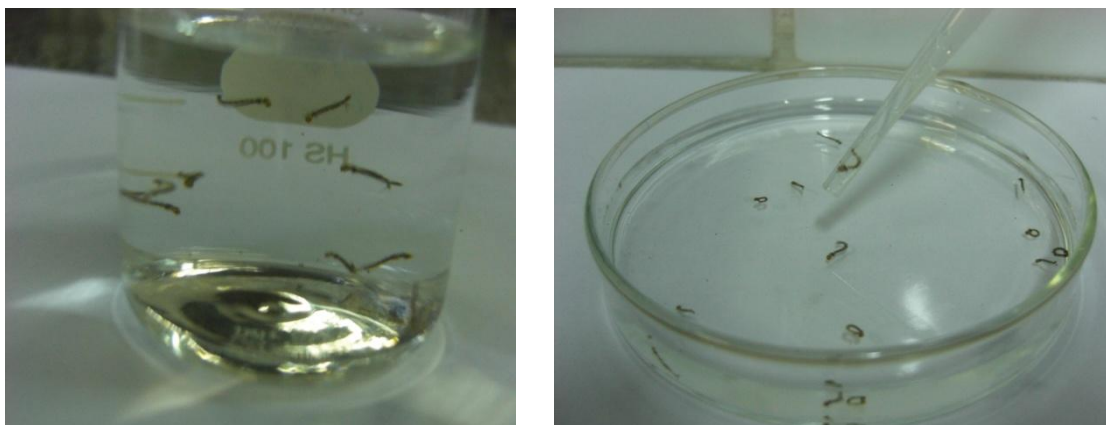


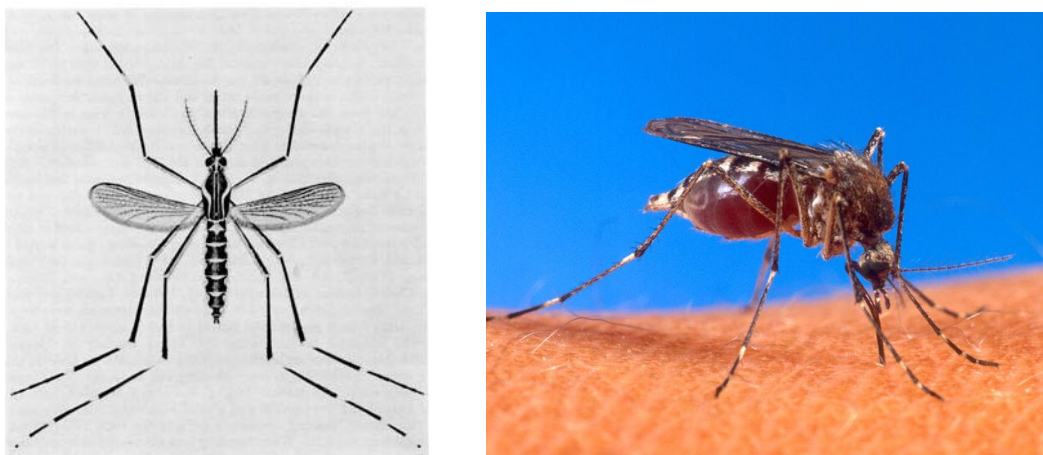
Figura 3.3. Larvas do *Aedes aegypti* em terceiro estágio.

3.2.1.3 A Pupa

A pupa não se alimenta, apenas respira e raramente é afetada pela ação de larvicidas. A duração da fase pupal, última fase do estágio aquático, em condições favoráveis de temperatura, é de aproximadamente dois dias. É nesta fase que ocorre a metamorfose do estágio larval para o adulto.

3.2.1.4 O Adulto

Na fase adulta, o mosquito, macho fêmea (Figura 3.4), já formados, alimentam-se de néctar e sucos vegetais até a fase de acasalamento (uma única inseminação é suficiente para fecundar todos os ovos que a fêmea venha a produzir durante sua vida). A partir daí, a fêmea necessita de sangue para a maturação dos ovos. A busca por esse alimento ocorre, geralmente, durante o dia - nas primeiras horas da manhã e ao anoitecer. Em regiões tropicais, como o Brasil, o fato de ocorrerem chuvas constantes aumenta significativamente o número de mosquitos.



Fonte: <http://dengue.blogspot.com/dengue/aedes-aegypti>

Figura 3.4. Mosquito *Aedes aegypti* na fase adulta.

3.3 O uso de plantas medicinais

Define-se planta medicinal, segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), como sendo qualquer planta que possua, em um de seus órgãos ou em toda planta, substâncias com propriedades terapêuticas ou que sejam ponto de partida na síntese de produtos químicos ou farmacêuticos (SILVA e CASALI, 2000).

Acredita-se que a utilização de plantas medicinais como terapia preventiva e curativa seja tão antiga quanto o próprio ser humano (MARTINS *et al.*, 1994). As primeiras citações de essências de cedro e detalhes de uma destilaria vêm do Egito e datam de 40 séculos antes de Cristo. O papiro de Ebers (2278 a.C.) e o de Smith (2263 a.C) ensinam o preparo e cultivo de drogas, como a dormideira. Na Índia, China e Pércia, a destilação de plantas é conhecida há milênios. A Bíblia menciona que os perfumes babilônicos valiam tanto quanto ouro, prata e armas (BUSTAMANTE, 2000).

As plantas medicinais devem ser consideradas não apenas como matéria-prima, ponto de partida para a descoberta de novas moléculas, mas também como um recurso natural potencialmente ativo na forma de fitoterápico padronizado e eficaz. O desenvolvimento desta área de

pesquisa deve-se a vários fatores, dos quais se destaca a participação de um número cada vez maior de profissionais. No entanto, resultados promissores dependem de uma maior inter-relação entre os diversos profissionais e disciplinas que compõem o estudo das plantas medicinais, pois a continuidade de tais estudos de forma isolada perpetuará a falta de recursos, impedindo conseqüentemente o desenvolvimento de novos medicamentos (MOUCHREK FILHO, 2000).

Nos últimos vinte anos no Brasil, país com a maior diversidade vegetal do mundo, o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente (SIANI, 2003). Isso reflete a necessidade de incentivos a pesquisas com plantas medicinais, visto que se trata de um país tão rico em biodiversidade, mas tão pobre em pesquisas nesta área. Afinal, essas pesquisas poderiam levar à reorganização das estruturas de uso dos recursos naturais (em vista da necessidade de sua extração estar associada aos planos de manejo) e a elevação do PIB, visto que há grande tendência mundial de aumento na utilização de fitoterápicos.

O mercado mundial de fitoterápicos é estimado em mais de US\$ 20 bilhões anuais e, somente na Europa, atinge cerca de US\$ 7 bilhões ao ano. Segundo estimativa feita pela *PhytoPharm Consulting* em Berlim, até o ano de 2007 a fitoterapia movimentou cerca de US\$ 47 bilhões anualmente. No Brasil, em 1998, os produtos naturais na saúde foram responsáveis pelo controle de 5,5% do mercado total de medicamentos, o que representa algo em torno de US\$ 566 milhões. Em 2000, foram negociados US\$ 700 milhões e a previsão é de um bilhão de reais nos próximos 10 anos (SIANI, 2003).

Muitas plantas possuem compostos economicamente importantes, tais como, óleos essenciais, alcalóides, resinas, taninos, ceras e outros (BALANDRIN *et al.*, 1985). No entanto, muitas espécies de plantas nunca foram observadas quanto a seus constituintes químicos e biologicamente ativos, e espera-se que novas fontes de materiais com potencial comercial sejam descobertas. Assim, diante da possibilidade da descoberta de novos compostos com atividade terapêutica ou da busca de

formulações mais simples, com menor custo e, portanto, mais acessíveis à maioria das populações, a OMS, em 1978, recomendou a seus países membros que desenvolvessem pesquisas visando o estudo da flora medicinal. Atendendo a esse apelo, o Ministério da Saúde, no Brasil, criou a Portaria nº. 212 (11/09/81), sobre “Diretrizes e Prioridades em Saúde”, em que se inclui o estudo multidisciplinar de plantas medicinais (MING, 1994).

Os óleos essenciais de algumas espécies de plantas aromáticas já são largamente usados na indústria para a produção de sabonetes, perfumes e outros produtos de higiene pessoal. Investigações sobre a avaliação das atividades inseticida (PARE, 1999; LIMA, 2006), bactericida (DORMAN e DEANS, 2000; AGNES, 2005) larvicida (FURTADO, *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2008; CHENG *et al.*, 2008) e fungicida (LEMOS, 1990) dos óleos essenciais de diversas espécies de plantas, nas mais diferentes regiões do planeta, têm mostrado resultados interessantes.

3.4 Plantas e suas atividades larvicidas

Desde o princípio das civilizações, os vegetais têm sido utilizados, não apenas como fonte alimentícia, mas também medicamentosa. As mais diversas enfermidades têm sido tratadas com chás, sucos, tinturas, banhos, cataplasmas e unguentos, preparados a partir de partes de plantas. Isso remonta, principalmente, aos antigos povos da China, Egito, Ásia e Roma, em que os eruditos classificavam um grande número de plantas com as respectivas indicações medicinais. Mais tarde os gregos, seguidos pelos clínicos da Europa Ocidental instituíram o emprego racional das plantas na prática médica (LIMA, 2001).

Por outro lado, com o surgimento de formas resistentes de mosquito aos inseticidas convencionais, tem crescido a procura por extratos vegetais e substâncias naturais que sejam efetivas no combate ao mosquito adulto e à larva de *Aedes aegypti* e que sejam isentas de toxicidade para o meio ambiente. Resistência a inseticidas convencionais é um dos principais obstáculos ao controle de insetos pestes de importância na agricultura e na

Capítulo 3 Fundamentação Teórica

medicina. A resistência resulta no aumento da frequência de aplicação de inseticida, dosagens crescentes, rendimentos diminuídos, danos ambientais e surgimento de doenças, quando os vetores não podem ser controlados. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o custo da resistência de insetos a inseticidas pode alcançar anualmente US\$ 1,4 bilhões nos Estados Unidos (SIMAS, 2004).

Plantas, como organismos que co-evoluem com insetos e outros microrganismos, são fontes naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas, já que as mesmas são produzidas pelo vegetal em resposta a um ataque patogênico. Inúmeras substâncias acumulam-se no vegetal para sua defesa contra microorganismos, algumas delas sendo denominadas de fitoalexinas. As plantas sintetizam e emitem inúmeros compostos voláteis (ácidos, aldeídos e terpenos) para atrair polinizadores e se defender de herbívoros. No que concerne à defesa contra herbívoros, as plantas desenvolveram dois tipos de defesa, a direta e a indireta. Na defesa direta estão envolvidas substâncias como sílica, metabólitos secundários, enzimas e proteínas, além de órgãos como tricomas e espinhos que afetam diretamente a performance do inseto. Na defesa indireta estão envolvidas substâncias emitidas pela planta, que atraem parasitas e predadores do inseto fitófago.

Terpenos e fenilpropanóides voláteis sintetizados por espécies vegetais podem ter, dependendo do inseto em análise, propriedades atrativas (alimentação, polinização) e/ou deterrentes (inibidores de oviposição) e inseticidas. Nos últimos anos, óleos essenciais obtidos de plantas têm sido considerados fontes em potencial de substâncias biologicamente ativas. Ênfase tem sido dada às propriedades antimicrobiana, antitumoral e inseticida de compostos voláteis, além de sua ação sobre o sistema nervoso central. Os óleos essenciais obtidos, por exemplo, de *Mentha pulegium* e *M. spicata* são muito eficazes como inseticidas. Pequenas quantidades já são suficientes para causar a morte de inúmeros insetos. Os monoterpenos pulegona, mentona e carvona, os principais constituintes do óleo de menta, foram considerados tóxicos para larvas de *Drosophila melanogaster* (SIMAS, 2004; KELSEY, 1984).

Neste trabalho foi testada ação larvicida do óleo essencial da espécie vegetal *aniba duckei* Kostermans frente a larvas do mosquito *aedes aegypti* em seu terceiro estágio

3.5 Metabolismo Vegetal Secundário

As plantas produzem um grande número de metabólitos secundários que funcionam numa variedade de contextos ecológicos. Muitos desses compostos são tóxicos e servem como agentes de defesa contra microorganismos patogênicos, insetos e animais herbívoros. Outros são compostos voláteis e servem para atrair polinizadores ou insetos que atacam plantas rivais ou ainda repelem organismos nocivos à planta (IJIJIMA et al., 2004).

Compostos secundários com função protetora são geralmente armazenados em células ou estruturas especializadas para proteger a planta de toxidade (GERSHENZON et al., 1989; PARE e TUMLINSON, 1999; DUKE et al., 2000; DUSSOURD e HOYLE, 2000). Um mecanismo comum de armazenamento tem sido a evulação de estruturas anatômicas, tricomes térmica glandular, na superfície da parte aérea das plantas. Tal estrutura contém, comumente, células glandes que sintetizam esses compostos e um saco cuticular cobrindo essas células nas quais os compostos sintetizados são secretados. Após a danificação dos tecidos ou mera pressão física, os sacos rompem-se liberando seu conteúdo. Como esses compostos secundários possuem altas pressões de vapor, são facilmente evaporados para atmosfera.

A família dos monoterpenos dos produtos naturais, por conseguinte, é derivada do plastidial, mevalonato – rota independente para o metabolismo de isoprenóide (McCONKEY et al., 2000), o qual produz isopentil-difosfato (e, por isomerização, dimetilalil difosfato) como precursor universal dos terpenóides (LICHTENTHALER et al., 1997; McCASKILL e CROTEAU, 1999).

Os monoterpenos divergem dos metabólitos primários por conversão do isopentil difosfato e dimetilalil difosfato, via de ação da

preniltransferase geranil difosfato sintase, para geranil difosfato (BURKE et al., 1999), o qual transforma, após subsequente ciclização, por limoneno sintase, em (4S)-(2)-limoneno (ALONSO et al., 1992).

3.6 Óleos essenciais

3.6.1 Definições e características

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.

Em água, os óleos essenciais apresentam solubilidade limitada, mas o suficiente para aromatizar suas soluções aquosas, que nesse caso são denominadas hidrolatos.

Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é um composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços) (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais diferem-se quimicamente dos óleos vegetais e dos minerais. Os primeiros são misturas de terpenos e oxigenados, juntos com outros tipos de compostos orgânicos. Já os óleos vegetais são ésteres da glicerina com ácidos graxos de longas cadeias, ao passo que os últimos

Capítulo 3 Fundamentação Teórica

óleos citados são parafinas líquidas misturados a outros hidrocarbonetos de peso molecular elevado (COSTA, 1994).

3.6.2 Processos de extração

Os métodos de extração dos óleos essenciais variam de acordo com a região da planta em que ele se encontra bem como com a proposta de utilização do mesmo (CRAVEIRO, 1981). Os mais comuns são: enfloração (enfleurage), arraste por vapor d'água, extração com solventes orgânicos, prensagem (ou expressão) e extração por CO₂ supercrítico (CHAAR, 2000).

3.6.2.1 Arraste por Vapor d'água

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 líquida contida numa caldeira; a segunda maneira de destilação é com água e vapor, onde uma rede colocada na parte inferior de uma caldeira mais alta separa a água da amostra e o terceiro tipo de destilação pelo vapor de água, onde a amostra é colocada em uma caldeira e o vapor de água ali injetado provém de um gerador próprio, independente (WILLIAMS, 1996; FUH et al., 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 (SIMÕES et al. 2007).

3.6.3 Funções Biológicas e Dados Farmacológicos

As substâncias odoríferas em plantas foram consideradas por muito tempo como “desperdício fisiológico” (SIMÕES et al., 2007), ou

mesmo produtos de desintoxicação (BELL et al., 1980). Atualmente, considera-se a existência de funções ecológicas, especialmente como inibidores da germinação, na produção de predadores, na atração de polinizadores, na proteção contra a perda de água e aumento de temperatura, entre outras (HARBONE, 1993).

É importante não confundir as atividades farmacológicas do extrato bruto de uma droga vegetal rica em óleos essenciais com as atividades farmacológicas do óleo essencial isolado da mesma. Também se deve levar em consideração que, se é possível estabelecer a atividade farmacológica de uma substância isolada, o mesmo não é tão fácil para um óleo volátil que, além de ser uma mistura complexa, pode ter sua composição química alterada por vários fatores, tais como: temperatura, umidade relativa, exposição ao sol, ventos, estocagem etc. Entretanto, algumas propriedades farmacológicas estão relativamente bem estabelecidas, por exemplo: ação carminativa (contra gases intestinais); ação antiespasmódica; ação estimulante; ação cardiovascular; ação sobre o Sistema Nervoso Central; ação anestésica tópica; ação antiinflamatória; além da ação anti-séptica, uma vez que alguns óleos voláteis inibem crescimento de vários tipos de bactérias, fungos e insetos, devido à presença de compostos fenólicos, aldeídos e alcoóis (SIMÕES, 2007).

3.7 Reserva Ducke

A Reserva Florestal Adolfo Ducke (Reserva Ducke), Figura 3.5, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), localiza-se no km 26 da rodovia AM-010 (Manaus – Itacoatiara) e está compreendida entre as coordenadas geográficas de 03°00'02" e 03°08'00" de latitude sul e 59°58'00" de longitude oeste. O clima da área é do tipo Afi, de acordo com a classificação climatológica de Köppen. A temperatura média para o mês mais frio nunca é inferior a 18 °C, a precipitação média anual é de 2000 mm e ocorrem duas estações distintas: a chuvosa, estendendo-se de novembro a maio e a seca, de junho a outubro (SAMPAIO et al., 2005).



Figura 3.5. Reserva Florestal Adolfo Ducke (Reserva Ducke) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA): (A) Entrada principal da Reserva. (B) Floresta.

Na reserva Ducke, em latossolo de textura arenosa, existem cerca de 3 a 4 árvores por vinte e cinco hectares. Ocorrem, geralmente, em grupos de 5 a 8 árvores, com espaçamento de 50 a 100 metros entre grupos, embora, também ocorram árvores isoladas (SAMPAIO, 2000; SAMPAIO et al., 2003; SPIRONELLO et al., 2004).

Tradicionalmente, segundo ALENCAR e FERNANDES (1978), o pau-rosa propaga-se de suas sementes, que são, no entanto, severamente predadas na floresta, principalmente por pássaros das famílias Psitacídeos e Ranfastídeos, que atacam os frutos antes da maturação. Na Reserva Ducke, uma árvore adulta chega a produzir mais de 400 frutos, porém poucos chegam a ser coletados.

3.8 A Espécie *Aniba duckei* Kostermans

A espécie botânica *Aniba duckei* Kostermans, da família das Lauraceae, conhecida vulgarmente como pau-rosa, foi descoberta no Brasil em Juriti Velho, no estado do Pará em 1925 (CORREA et al., 1975; SIANI et al., 1999).

As Lauraceae apresentam-se amplamente distribuídas através das regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo formadas por 49 gêneros com número de espécies variando entre 2500 a 3000 (WERFF et al., 1996). Os primeiros registros relativos à utilização das espécies desta família datam de 2.800 a.C, sendo originários da Grécia antiga (BARROSO, 1978; COE-TEIXEIRA, 1980).

As espécies do gênero *Aniba* Aubl. destacam-se pelo alto valor econômico, devido à constituição do óleo essencial, encontrado em grande quantidade principalmente no lenho e na casca. O primeiro registro de que se tem conhecimento é de Aublet, em uma viagem de estudos à Guiana Francesa, no período de 1762 – 1764, que registrou a espécie com o nome de *Licaria guianensis* Aubl., devido à mesma ser conhecida pelo nome de “Licari”, pelos indígenas. Sua importância econômica teve início em 1875 quando Samarin, na França, obteve o óleo essencial por destilação. Em 1881, Morim, também na França, separou o óleo essencial de um álcool e o chamou de linalol. Sua primeira exportação para a Europa aparece registrada na Guiana Francesa em 1883. Anos mais tarde, Koeller sugeriu que a espécie fosse denominada *Ocotea caudata* Koeller. Posteriormente, Mez sugeriu o nome *Aniba parviflora* (Meiss.) Mez. Contudo, DUCKE em 1926 passou a chamá-la *A.rosaedora* DUCKE. O próprio autor, neste mesmo ano, verificou que havia diferenças entre as espécies da Amazônia e das Guianas, daí passou a chamá-la *A.rosaedora* var. *amazônica* Ducke. A última mudança foi feita em 1938, quando Kostermans propôs a alteração para *A. duckei* Kostermans (SUDAM, 1971).

A espécie *A. duckei* Kostermans (Figura 3.6), sinonímia de *Aniba roseadora* Ducke (DUCKE, 1938; SAMPAIO, 2000; MAIA, 2000). Recebe vários nomes comuns, tais como: pau-rosa, pau-rosa-do-amazônas e umbaúba (Brasil), rosewood (Inglês), bois de rose femelle (Guiana Francesa), enclit rosenhout (Suriname), cara-cara (Guiana) (MAIA, 2000) e palo de rosa (países amazônicos de língua castelhana) (CLAY, 1993).

No Brasil, ocorre ao oeste do Amapá, ao longo de ambos os lados do Rio Amazonas, tendo grandes concentrações em Curuá-Uma

Capítulo 3 Fundamentação Teórica

(perto de Santarém – PA) para a fronteira peruana, ao sul e do rio Trombetas para a Colômbia, ao norte. Também é encontrado ao redor de Belém e na Ilha de Marajó, ambos no estado do Pará (SUDAM, 1972).

Sua árvore, Figura 3.6, pode atingir até 30 metros de altura e seu tronco diâmetro de dois metros, tendo casca pardo-avermelhada, folhas semicoriáceas, lisas e inflorescência em panículas multifloras delicadas. As flores são ferrugíneas e o fruto é uma drupa, de 2 a 3 centímetro de comprimento, com cúpula bastante espessa. O tipo de vegetação onde ocorre é de floresta tropical úmida e terra firme (SAMPAIO, 2000). Seu óleo essencial é utilizado em perfumaria e é um dos três únicos produtos da flora amazônica regional que foram incluídos na pauta de exportação nos últimos oitenta anos.



Figura 3.6. Árvores plantadas em área de cultivo do Pau Rosa (Reserva Florestal Ducke – Manaus / AM).

A exploração do Pau Rosa para extração de seu óleo essencial tem sido executada desde 1911 (AZEREDO, 1958), desempenhando uma importante função econômica da região amazônica devido à alta concentração de linalol na constituição química do óleo, tendo sido considerado, naquele tempo, a principal fonte mundial desse componente. A exploração desenvolveu-se, entretanto, de forma rápida e desordenadamente a partir de 1920, a ponto de em 1927, das 200 toneladas produzidas 80 não encontrarem mercado consumidor. Na década de 40 esse produto ocupou o terceiro lugar na pauta de exportações da Amazônia, segundo a SUDAM, 1972. A exploração diminuiu a partir de 1952. Em 1955 a produção do óleo de Pau Rosa brasileiro atingiu quase quinhentas toneladas anuais. Em meados dos anos 60 a produção brasileira ficou em torno de algumas centenas de toneladas anuais. Até o ano de 1969 existiam 53 usinas de destilação conhecidas, sendo 3 no estado do Pará e 50 no Amazonas. Em 1971 apenas 20 usinas estavam em funcionamento, sendo 7 no Pará e 13 no Amazonas. Em 1995 a produção ficou em torno de 130 toneladas por ano, com exportação de um pouco mais de 29 toneladas (CUNHA, 2002). Essa exportação chegou a apenas 22,8 toneladas, em 2002 e, pelo último levantamento do IBGE, em 2004 foram exportadas 29,5 toneladas de óleo do pau-rosa (HOMMA, 2005). Atualmente, menos de 15% do óleo de Pau Rosa é industrializado no Brasil e o restante é exportado para os Estados Unidos, Japão, França, Holanda, Inglaterra e Suíça.

3.9 O óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans

O óleo essencial de pau-rosa amazônico, como é conhecida popularmente a *Aniba duckei* Kostermans, caracteriza-se por seu forte odor, incoloração e densidade inferior à da água, solubilidade em solventes orgânicos usuais e álcool 70° GL (SUDAM,1972; CHAAR, 2000; TELES, 2003).

Capítulo 3 Fundamentação Teórica

O linalol, cujo nome científico é 3,7-dimetil-oct-1,6-dien-3-ol e suas fórmulas, estrutural e molecular, encontram-se na Figura 3.7 (A e B), é o constituinte majoritário do óleo da *Aniba duckei* Kostermans. Outros componentes minoritários fazem parte da composição do óleo essencial (TELES, 2003).

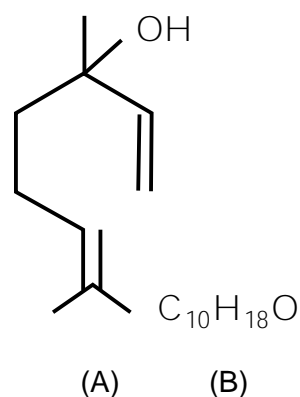


Figura 3.7. Fórmulas do linalol: estrutural (A) e molecular (B).

O linalol, é um monoterpene alcoólico terciário de cadeia aberta, é uma das substâncias mais importantes na indústria de aromas, sendo um dos substitutos para o óleo de lavanda francesa ou da bergamota, pois sua forma levorrotatória possui odor similar a estes óleos. O linalol ocorre naturalmente em forma de dois estereoisômeros, o 3R-(-)-linalol (Figura 3.8, A) e o 3S-(+)-linalol (Figura 3.8, B), que possuem odores distintos. O isômero levorrotatório (lincareol) possui um aroma de lavanda e flores frescas, com notas de lírio-do-vale, enquanto o dextrorrotatório (coriandrol) possui um cheiro herbáceo, com tom de folhas envelhecidas, frequentemente descritas como uma nota cítrica (KOPPENHOEFER et al., 1994; SIANI, et al., 2002; SIANI, et al., 2005).

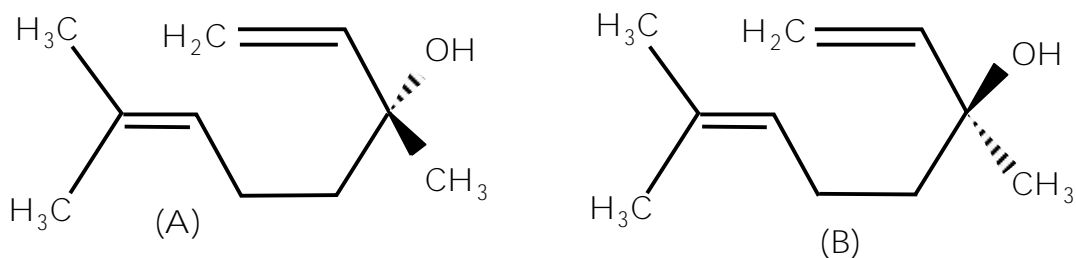


Figura 3.8. Estruturas enantioméricas do linalol: (A) 3R-(-)-linalol ou lincareol; (B) 3S-(+)-linalol ou coriandrol.

3.10 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 a Espectrometria de Massas (CG-EM), Espectrometria Vibracional de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e Espectrometria Eletrônica de Ultravioleta (UV) (MOUCHREK FILHO, 2000). Neste trabalho faz-se apenas uma breve abordagem de cada uma dessas técnicas. Informações mais detalhadas podem ser obtidas nas literaturas especializadas (WHITE, 1990; SKOOG, et al., 2002; SILVERSTEIN et al., 2007).

Uma separação adequada de mistura natural multicomponente, como é o caso dos óleos essenciais, por cromatografia gasosa baseia-se na diferença das interações físicas entre os componentes da mistura e a fase estacionária da coluna. Assim, a escolha da coluna é parte importante do processo de separação.

A espectrometria de massas acoplada à cromatografia a gás (CG-EM) é um importante método na análise de substâncias orgânicas. As moléculas eluídas na coluna analítica sofrem uma fragmentação num campo de alta energia. A análise desses fragmentos dá informações sobre a provável estrutura da substância.

O espectro infravermelho dá informações sobre grupos funcionais bem como a vizinhança dos mesmos e até a geometria de duplas ligações, quando estas são presentes. A espectrometria IV baseia-se na vibração de átomos, contidos numa molécula, excitados por raios eletromagnéticos de infravermelho, na faixa de comprimento de ondas entre 2,5 e 25 μm ou número de ondas 4000 e 400 cm^{-1} . O processo é quantizado e assim o espectro vibracional apresenta-se em bandas. Cada mudança de nível de energia vibracional apresenta uma série de energia rotacional e, como consequência, as linhas do espectro rotacional se sobrepõem dando as bandas observadas.

A absorção molecular na região do Ultravioleta e do Visível depende da estrutura eletrônica da molécula. A absorção de energia é quantizada e conduz à passagem dos elétrons de orbitais do estado fundamental para orbitais de maior energia em estado excitado. Para muitas estruturas eletrônicas esta absorção ocorre em uma porção acessível do UV. Na prática, a espectrofotometria no ultravioleta é limitada, na maior parte, aos sistemas conjugados.

3.11 Análise Térmica

3.11.1 Conceito

De acordo com Mackenzie (1984), a Análise Térmica é “um conjunto de técnicas, nas quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é medida, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura”. O desenvolvimento da análise térmica deu-se progressivamente em função de trabalhos de pesquisadores isolados e teve no surgimento da International Confederation of Thermal Analysis and Calorimetry (ICTAC) e no grande avanço em equipamentos comerciais a tornaram um campo extremamente ativo com aplicações em diversos ramos da pesquisa científica bem como na indústria.

3.11.2 Técnicas Termoanalíticas

Uma técnica é considerada termoanalítica quando ela obedece aos seguintes critérios: mede a variação de uma propriedade física quando a amostra é aquecida ou resfriada; expressa a medida, direta ou indiretamente, em função da temperatura; realiza a medida sob controle de temperatura (WENDLANTD, 1986). A Tabela 3.1 mostra algumas dessas técnicas acompanhadas das respectivas propriedades físicas correspondentes:

Tabela 3.1. Análise térmica

Propriedade	Técnica	Sigla
Massa	Termogravimetria	TG
	Termogravimetria Derivada	DTG
Temperatura	Análise Térmica Diferencial	DTA
Entalpia	Calorimetria Exploratória	
	Diferencial	DSC

A análise térmica de óleos essenciais é pouca explorada, porém Cavalheiro *et al.* (2004) trabalharam com DSC para determinar pontos de ebulição e suas mudanças de entalpia de alguns óleos essenciais, enquanto que Novak *et al.* (2004) concluíram que para análise de óleos essenciais seria mais apropriada a aplicação de técnicas termoanalíticas combinadas (TG-FT-IR, TG-MS). A seguir algumas dessas técnicas serão apresentadas.

3.11.2.1 Termogravimetria

A Termogravimetria é uma técnica na qual a variação de massa que ocorre na amostra é acompanhada em função do tempo (sob

temperatura constante) ou em função da temperatura (SANTOS et al., 2000).

A medida é realizada utilizando-se um equipamento denominado microbalança, que consiste na combinação de uma microbalança eletrônica acoplada a um forno e um programador linear de temperatura, permitindo a pesagem contínua de uma amostra em função da temperatura, à medida que a amostra é aquecida ou resfriada (SANTOS, 2004).

Existem fornos que podem operar até 2400 °C. As temperaturas do forno e da amostra são determinadas com o auxílio de um par termoeletrico e o sensor deve ser localizado a cerca de 1-2 mm da amostra. A escolha do porta-amostras deverá ser feita de acordo com a amostra e a temperatura a que será aquecido o forno (SANTOS, 2001).

A atmosfera que circunda a amostra pode ser controlada, podendo ser estática ou dinâmica; à pressão ambiente ou sob pressão ou a vácuo; atmosfera inerte (nitrogênio ou argônio) ou oxidante (gás oxigênio ou ar sintético) (GALIM *et al.*, 2002).

O registro dos experimentos termogravimétricos são curvas em que se observam variações de massa em decorrência da saída de produtos voláteis (IONASHIRO e GIOLITO, 1980).

3.11.2.2 Termogravimetria Derivada (DTG)

A Termogravimetria Derivada (DTG) é a primeira derivada da curva termogravimétrica, ou seja, a derivada da variação de massa em função do tempo ou da temperatura. A curva DTG apresenta informações de uma mais clara, sendo a área ditamente proporcional à variação de massa, o que leva à determinação da temperatura de pico e indicando as temperaturas inicial e final do processo que está sendo investigado (GONÇALVES *et al.*, 2003).

A curva DTG torna-se interessante para resolver os seguintes problemas: separação de reações sobrepostas; identificação de uma determinada substância; cálculo da variação de massa em reações sobrepostas; análise quantitativa por medida da altura de pico e distinção de eventos térmicos quando comparados com a curva DTA.

3.11.2.3 Análise Térmica Diferencial (DTA)

A Análise Térmica Diferencial (DTA) é uma técnica na qual a temperatura da amostra, comparada com a temperatura de um material de referência, termicamente inerte, é registrada quando a amostra é aquecida ou resfriada a uma razão uniforme, permitindo o reconhecimento de efeitos térmicos (WENDLANDT, 1996).

As variações de temperatura da amostra são causadas por transições entálpicas endotérmicas ou exotérmicas, registrando-se a diferença de temperatura entre a amostra e a referência em função da variação de temperatura. Por isso o termo diferencial.

3.11.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Nesta técnica, Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), mede-se a diferença de energia liberada ou absorvida pela amostra, em relação a um material de referência, termicamente inerte, em função da temperatura, enquanto a amostra e a referência são submetidas a uma programação de temperatura (BERNAL *et al.*, 2002).

Quando um material sofre algum tipo de mudança de estado físico ou reação química, ocorre uma quantidade de calor envolvido, liberado ou absorvido. A DSC mede as variações de energia térmica para manter em equilíbrio as temperaturas da amostra e do material de referência, durante o evento térmico. Regra geral considera-se que transição de fase, desidratação, redução, e algumas reações de

decomposição produzem efeitos endotérmicos, ao passo que cristalização, oxidação e algumas reações de decomposição produzem efeitos exotérmicos. Isto é válido tanto para DSC quanto para DTA (DANTAS, 2006).

Em algumas técnicas instrumentais, inclusive a análise térmica, um grande número de fatores pode afetar a natureza, precisão e exatidão dos resultados experimentais. Os fatores que podem influenciar o aspecto das curvas TG são classificados em duas categorias (GIOLITO, 1988):

Fatores Instrumentais, dentre os quais se pode citar: atmosfera do forno; composição do porta-amostra; razão do fluxo do gás de arraste; razão de aquecimento do forno; geometria do porta-amostra e do forno; velocidade do registrador; sensibilidade do mecanismo de detecção;

Fatores característicos da amostra, dentre os quais se pode citar: natureza da amostra; granulometria da amostra; quantidade da amostra; calor de reação; compactação da amostra; solubilidade dos gases liberados; condutividade térmica da amostra.

O conhecimento detalhado da ação destes fatores é muito importante, pois permite que o operador obtenha o máximo proveito das curvas termogravimétricas, evitando que os erros mascarem os resultados. Para se ter uma boa reprodutibilidade nas medidas, é importante que se tenha amostra e condições experimentais com as mesmas características. Muitos fatores citados ainda continuam sendo estudados porque, apesar de boa parte deles ser constante para uma dada termobalança (geometria do porta-amostra, velocidade do registrador, sensibilidade do mecanismo de detecção), muitos outros fatores são variáveis e difíceis de serem controlados (solubilidade dos gases liberados, perturbações eletrostáticas e compactação da amostra).

4 - Metodologia Experimental

4 METODOLOGIA

A metodologia adotada envolveu atividades usuais em um tratamento analítico de plantas aromáticas, bem como a análise térmica por DSC, além do teste da atividade larvicida do óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans

4.1 Materiais e Equipamentos

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM) na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) em parceria com o Laboratório de Pesquisa em Química Analítica (LPQA), Central Analítica e Laboratório de Físico-Química, Microbiologia do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Laboratório de Pesquisas e Ensaio de Combustíveis – LAPEC da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e Instituto de Química de São Carlos da USP.

4.1.1 Moinho Elétrico

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

4.1.2 Refratômetro

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

4.1.3 Extrator de Clevenger

Foi utilizado um extrator de Clevenger de vidro, acoplado a um balão de fundo redondo de 1000mL, para extração do óleo essencial (Figura 4.1) e uma manta foi usada como fonte de calor.

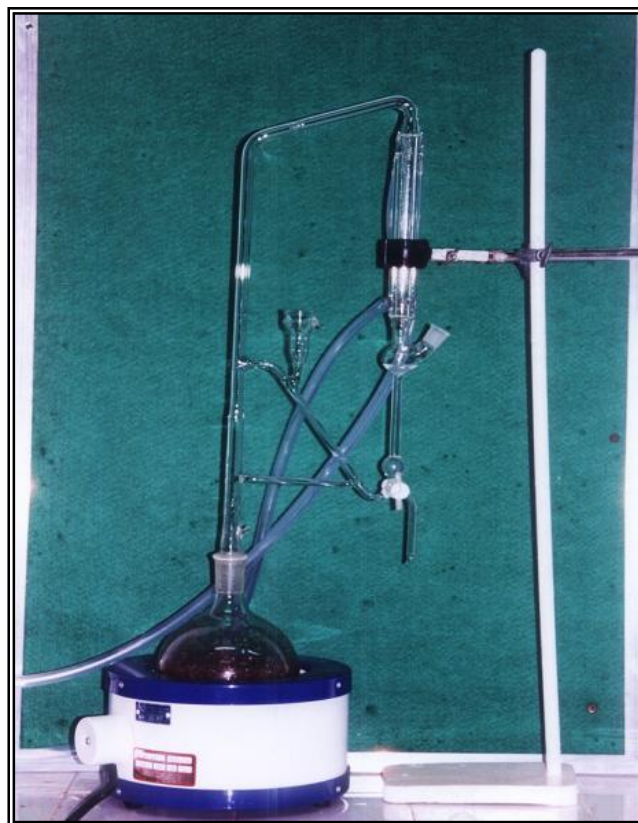


Figura 4.1 – Sistema Extrator de Clevenger Adaptado

4.1.4 Espectrômetro Ultravioleta

Utilizou-se um espectrofotômetro UV – Vis. marca HP, modelo 8452A, equipado com monitor e impressora HP.

4.1.5 Espectrômetro Infravermelho com Transformada de Fourier (Interferômetro)

Utilizou-se um espectrofotômetro FTIR marca BOMEM, modelo MB – 102, usando pastilhas de brometo de potássio (KBr), na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.1.6 Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massas

O óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans foi analisada por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas por impacto de elétrons e analisador íon trap (CG-EM-IE-Ion trap), utilizando-se o equipamento da marca Varian, modelo 3900 (equipado com Software Saturno 2100 T GC/MS) acoplado a um Espectrômetro de Massas Íon Trap 2000, por impacto de elétrons (70 eV). Usou-se uma Coluna VF-5ms LB com 30 m x 25 mm x 0,25 μm , fase estacionária 1% fenil-dimetil polisiloxano e a fase móvel usada foi o gás Hélio; Software de busca com bibliotecas NIST e WILEY com aproximadamente 500.000 espectros massas.

4.1.7 Estudo Térmico

A análise térmica é de pouco uso na análise de óleos essenciais. Porém, são possíveis estudos da perda de massas da amostra pela ação térmica. Além disso, os pontos de congelamento, fusão e ebulição são propriedades físicas que têm todas as condições para serem determinadas por análise térmica, especialmente pela técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG).

As curvas termogravimétricas e calorimétricas foram obtidas em Analisador Térmico da marca TA INSTRUMENTS, modelo SDT 2920 através do método não isotérmico de análise, na razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

E intervalo de temperatura de 25-350 °C, visando verificar o perfil da decomposição térmica.

4.2 Metodologia Experimental

A seguir descrevem-se os procedimentos efetuados experimentalmente para a realização dessa pesquisa:

4.2.1 Origem, Coleta, Preparação e Armazenamento da Amostra Vegetal

Amostras, folhas e galhos finos, foram coletadas de três árvores da espécie *Aniba duckei* Kostermans cultivadas na Reserva Florestal Ducke, rodovia AM – 010, km 26, Manaus, Amazonas, Brasil (03°00'02" e 03°08'00" de latitude sul e 59°58' 00" de longitude oeste).

Essas coletas foram realizadas em março de 2006. Em seguida, as amostras foram secas por sete dias sob ventilação natural, trituradas e armazenadas em frascos de polipropileno para posterior extração dos óleos essenciais.

4.2.2 Extração do Óleo Essencial

O óleo essencial foi extraído de 30 gramas de galhos finos da espécie *Aniba duckei* Kostermans com 300 mL de água destilada, por hidrodestilação, em um sistema de Clevenger (Figura 2.1) mantendo-se a temperatura de 100 °C. Posteriormente, o óleo foi seco por meio da percolação em Na₂SO₄ anidro. Essas operações foram realizadas em triplicatas e as amostras foram armazenadas em frascos de vidro sob refrigeração, para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis. Em seguida, esses óleos foram submetidos às análises.

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

4.2.2.1 Determinação do Tempo de Extração

O melhor tempo de extração foi determinado em função do rendimento do óleo essencial. Seis extrações foram realizadas nos tempos 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 horas. Exceto o tempo, todos os outros parâmetros foram mantidos como descritos anteriormente.

4.2.3 Padrões

Como padrões foram utilizados o linalol racêmico, \pm linalol da marca Aldrich (aldrich Chemical Co.) e R-(-)-linalol da marca Fluka (Fluka Chemie GmbH).

As soluções padrão de monoterpenos em etanol e em hexano foram preparadas por diluição em diferentes concentrações.

4.2.4 Características Físicas do Óleo Essencial

Na caracterização das propriedades físicas do óleo essencial de galhos da espécie *Aniba duckei* K. foram realizadas as análises de densidade, índice de refração, ponto de ebulição, solubilidade em etanol a 70%, cor e aparência.

4.2.4.1 Densidade

Para o cálculo da densidade, utilizou-se um balão volumétrico aferido de 1 mL, o qual foi escolhido devido ao pequeno volume de amostra de

óleo essencial disponível, previamente seco, tarado e aferido, onde adicionou-se a amostra de óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans a 25 °C, pesando-se em seguida.

4.2.4.2 Solubilidade em Etanol (70%)

Para a determinação da solubilidade, utilizou-se uma mistura de etanol em água a 70% (volume/volume).

A solubilidade foi feita mantendo-se constante o volume de óleo e adicionando-se proporcionalmente volumes crescentes da mistura alcoólica, até a sua completa solubilização.

4.2.4.3 Índice de Refração

Para a medida do índice de refração foram utilizados tubos capilares de vidro para adicionar as amostras de óleos diretamente sobre o prisma de Flint do refratômetro, a uma temperatura de 25 °C.

4.2.4.4 Rendimento do Óleo Essencial

Para o cálculo do rendimento da extração de óleo, mediu-se o volume do óleo obtido na extração, percolou-se em Sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro e pesou-se em balão volumétrico seco e tarado 25 °C, determinando-se a massa do óleo em relação a massa da amostra.

4.2.4.5 Cor

A técnica proposta é a visual, feita por comparação das cores das essências com as cores conhecidas.

4.2.4.6 Aparência

A técnica proposta também é a visual, onde se faz uma comparação das essências no que diz respeito a sua transparência ou limpidez.

4.2.5 Análises Espectrométricas

4.2.5.1 Análise Espectrométrica na Região do Ultravioleta – Visível

A análise espectrométrica na região do Ultravioleta-visível do óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans foi realizada em um espectrofotômetro da marca HP, modelo 8451A. Para tanto, as amostras foram diluídas em mistura de 60% de etanol/água.

4.2.5.2 Análise Espectrométrica na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (Interferômetro)

As amostras de óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans foram analisadas em um espectrofotômetro FTIR marca BOMEM, modelo MB – 102, usando pastilhas de brometo de potássio (KBr), na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.2.5.3 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

As análises do óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas por impacto de elétrons e analisador íon trap (CG-EM-IE-Ion trap), equipamento marca Varian, modelo 3900, foram realizadas utilizando hélio como gás de arraste com fluxo na coluna de 1 mL min^{-1} ; temperatura do Injetor:

Capítulo 4 Metodologia

270 °C, split 1:50; coluna capilar (30 m x 25 mm) com fase estacionária VF-1ms (100 % metilsiloxano 0,25 µm) e programação de temperatura do forno de 60 a 220 °C com taxa de aquecimento de 4 °C min⁻¹ e de 220 a 260 °C com razão de aquecimento de 1 °C min⁻¹, com o tempo de corrida ficando em 100 minutos. No Espectrômetro de Massas as temperaturas do manifold, ion trap e da linha de transferência foram de 50, 190 e 200 °C, respectivamente. Foram injetadas alíquotas de 1,0 µL (injetor automático CP-8410) das amostras diluídas na proporção de 20 µL em 1,5 mL de hexano.

4.2.6 Quantificação de Linalol por Cromatografia Gasosa

O linalol foi quantificado pelo método do padrão externo, considerando a sua alta concentração nas amostras. As amostras foram diluídas em etanol absoluto. As curvas analíticas foram construídas com padrões. Os cálculos das concentrações foram feitos pelas respectivas equações das retas obtidas nas curvas analíticas.

4.2.7 Estudo Térmico

As curvas calorimétricas foram obtidas em Analisador Térmico, marca TA INSTRUMENTS, modelo SDT 2920 através do método não isotérmico de análise, na razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹. E intervalo de temperatura de 25-350 °C, visando verificar o perfil da decomposição térmica.

4.2.8 Obtenção e Cultivo das Larvas

Como os ovos do *Aedes aegypti* não são postos diretamente na água, mas sim milímetros acima de sua superfície, principalmente em recipientes artificiais, foi preparada uma armadilha simples para coleta desses ovos. Para tanto, foram utilizados jarros de plástico para planta, de aproximadamente 500 mL, semi-preenchidos com água e um pedaço de

Capítulo 4 Metodologia

madeira de dimensões aproximadamente 20 cm x 5 cm com uma parte imersa e outra não, Figura 4.2. A fêmea do *Aedes aegypti*, deposita seus ovos na parte imediatamente superior à lâmina d'água, na parte do madeirite ainda úmida, mas fora da água do jarro.

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 ou 4º estágio do desenvolvimento, quando então foram utilizadas nos ensaios de atividade larvicida. São necessários de 4 a 5 dias para que as larvas atinjam o tamanho ideal para os ensaios.



Figura 4.2. Armadilhas para coleta dos ovos do *Aedes aegypti*.

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

4.2.9 Teste de Toxidade

Para realização do teste de toxidade, as larvas selecionadas, entre o terceiro e o quarto estágios, (10 por teste) foram transferidas para um

béquer contendo 20 mL de água mineral (26 – 28 °C). As larvas foram capturadas utilizando-se uma pipeta de Pasteur. Cada teste foi feito em quintuplicata para cada concentração testada. Os controles positivos foram realizados com o organofosforado temefós em larvas do *Aedes aegypti*, na concentração utilizada pela vigilância sanitária que é de 100 ppm. Os controles negativos foram realizados com 20 mL de água mineral (26 – 28 °C) contendo 0,04% de Tween. As larvas foram expostas às soluções por 24 horas e ao fim deste período registrou-se a mortalidade.

Para o preparo da solução teste, pesou-se 20 mg do óleo essencial, em um recipiente do tipo eppendorf, para cada mililitro da solução teste e, em seguida, foi adicionada uma gota de solvente, do tipo tween 80, sobre o óleo, fazendo-se então a homogeneização. A seguir, utilizando-se uma pipeta automática, foi adicionado um mililitro de água destilada fazendo-se nova homogeneização.

Esta solução foi então transferida para o béquer contendo as larvas separadas para o teste, de acordo com as concentrações pré-estabelecidas após testes iniciais.

4.2.10 Análise Estatística

Após os testes, montou-se uma tabela com os valores das sete concentrações, log das mesmas, o número de larvas mortas após 24 horas (média dos cinco pontos), número de larvas vivas após 24 horas (média dos cinco pontos), o acumulado de vivos (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 Reed-Muench, o qual parte do princípio de que, um animal que sobreviva a certa dose, também irá sobreviver em qualquer outra dose menor que aquela, conseqüentemente o animal que morrer com certa dose, também irá morrer em doses maiores que aquela. A partir de uma tabela contendo os dados de mortalidade para cada concentração testada, é construído um gráfico onde se observa uma curva para o acúmulo de animais mortos em cada concentração e outra curva para o acúmulo de sobreviventes. O ponto de

intercessão entre as curvas é a Concentração letal 50% (CL₅₀), pois nesse ponto o número de animais sobreviventes é igual ao número de animais mortos (COLEGATE & MOLYNEUX, 1993).

O intervalo de confiança foi calculado segundo o método de PIZZI (1950). Para tanto, constrói-se 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} .

5 - Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo do tempo de extração do óleo essencial

O tempo de extração do óleo essencial é um dos principais parâmetros físico-químicos da indústria de essências, porque, além de estar diretamente relacionado com a qualidade do óleo essencial, se reflete na natureza econômica do processo.

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

Neste trabalho, o estudo do tempo de extração ideal para o óleo essencial por hidrodestilação em galhos, de uma massa fixada em 30 g em 300 mL de água destilada, em função do rendimento percentual do óleo, que resultou na Figura 5.1, na qual pode se observar que o rendimento máximo do óleo extraído foi verificado no tempo de extração de 4,0 horas, obtendo-se um volume de óleo essencial igual a 0,65 mL. A este valor foi atribuído o percentual máximo de rendimento. A partir desse tempo a quantidade de óleo extraível permaneceu constante.

Dessa forma, de acordo com esses resultados, propõe-se que o tempo ideal seja de 4,0 horas, que corresponde a um rendimento de 100% de óleo essencial.

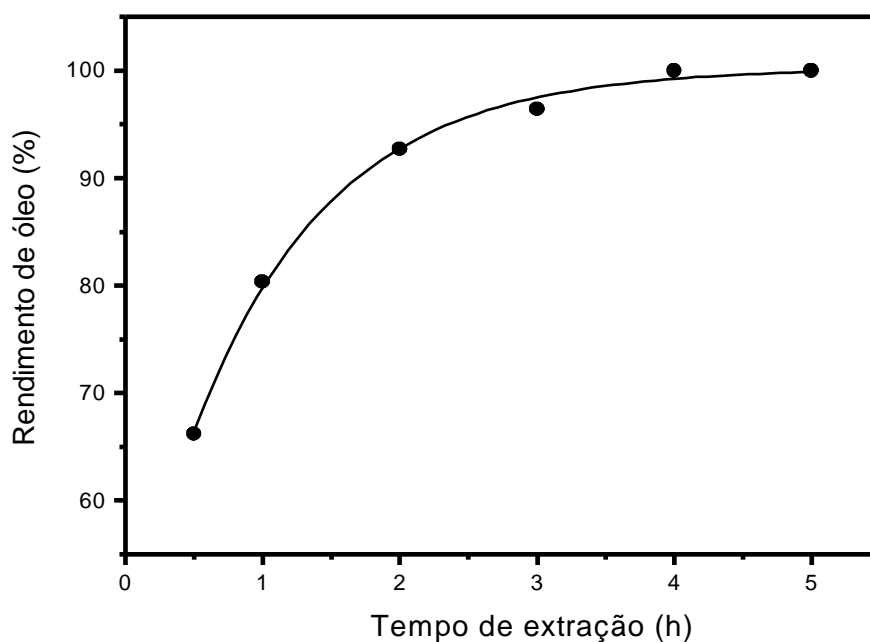


Figura 5.1 - Variação do rendimento de óleo essencial em função do tempo de extração.

5.2 Características Físicas do Óleo Essencial

As essências alteram-se com maior ou menor facilidade, dependendo da natureza química dos seus constituintes e consoante às circunstâncias do meio. Entre os fatores principais que as modificam estão 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, etc. Prejuízos análogos sofrem as indústrias farmacêuticas, quando se utiliza como corretivo do cheiro; sabor e a terapêutica, quer pela diminuição dos constituintes ativos, quer, por se tornarem agressivos quando usados externamente, causando irritações na pele (TELES, 2003).

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

Os parâmetros físicos dos óleos essenciais dos galhos são mostrados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Propriedades físico-químicas do óleo essencial extraído de galhos da espécie *Aniba duckei* Kostermans.

Propriedades físico-químicas	Óleo essencial ^(a)	Óleo essencial ^(b)	Óleo essencial ^(c)
Densidade (g mL ⁻¹)	0,86	0,87	0,89
Solubilidade em álcool a 70% (v/v)	1:2	1:2	1:2
Índice de refração (N _D ^{25°})	1,46	1,47	1,47
Cor	Amarelo	----	Amarelo
Aparência	Límpido	---	Límpido

(a)Esta pesquisa (coleta em março de 2008).

(b)RAOUL, 1953.

(c)CHAAR, 2000.

Comparando-se os valores para o óleo essencial dos galhos da espécie *Aniba duckei* Kostermans com os da literatura, pode-se observar que há uma similaridade entre eles, no que diz respeito à densidade, ao índice de refração, à solubilidade em etanol a 70%, à cor e à aparência.

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

5.3 Análises Espectroscópicas e Cromatográficas do Óleo Essencial da Espécie Vegetal *Aniba duckei* Kostermans

A análise espectroscópica dos óleos essenciais de galhos da *Aniba duckei* Kostermans, comparando com os dados do padrão de linalol e da literatura, proporcionou resultados similares.

5.3.1. Análise Espectroscópica na Região do Ultravioleta

Os espectros de absorção na região do ultravioleta, para mistura etanol/água a 60%, em volume (A), para o padrão de linalol (B), e para óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans (C) são apresentados na Figura 5.2.

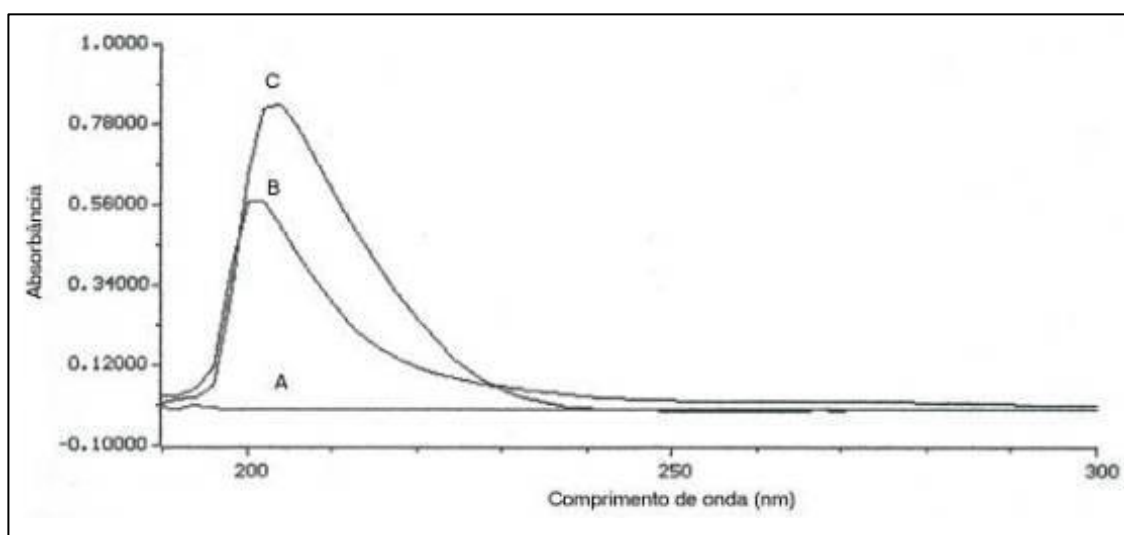


Figura 5.2 - Espectros de absorção no UV: (A) mistura etanol/água a 60 %. (B) padrão de linalol e (C) óleo essencial extraído de galhos.

Nessa análise espectroscópica, a mistura de etanol/água a 60% em volume foi escolhida após um estudo sobre a solubilidade do óleo essencial nesta mistura e sua absorbância.

A Figura 5.2 mostra que a mistura etanol/água não absorve na região do UV. Podemos observar também que o $\lambda_{\text{máx}}$ da amostra de óleo essencial extraído de galhos da espécie *Aniba duckei* Kostermans, Figura 5.2C, é muito próximo do $\lambda_{\text{máx}}$ da solução de padrão de linalol, Figura 5.2B, indicando que se trata do mesmo composto.

Na região do ultravioleta as absorções ocorrem por meio de transições eletrônicas. Uma banda próxima a 200 nm tem sido atribuída à elevação simultânea de dois elétrons π para orbitais π^* , estando a intensidade da absorção do alqueno essencialmente independente do solvente devido à própria natureza apolar da ligação carbono-carbono (SILVERSTEIN et al., 2007; BELAICHE, 2005). Para o linalol, considerando que é um composto insaturado com duas duplas ligações (Figura 5.2), espera-se uma transição desse tipo, pois quando duas ou mais ligações etilênicas ocorrem em uma mesma molécula e estão separadas por pelo menos um grupo metileno, a molécula absorve na mesma posição que um único cromóforo. A intensidade da absorção é proporcional ao número de grupos cromóforos isolados na molécula (SILVERSTEIN et al., 2007).

5.3.2 Análise Espectroscópica na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (Interferômetro)

A Figura 3.3 mostra os espectros obtidos na região do infravermelho para o padrão de linalol (A) e para o óleo essencial extraído dos galhos da espécie *Aniba duckei* Kostermans (B). Pela comparação entre o espectro A e o espectro B, da Figura 5.3, observa-se com facilidade que as bandas de absorção são praticamente coincidentes por suas frequências.

As bandas de absorção fortes na região de 3650 e 3100 cm^{-1} , quando associado a uma banda forte entre 1300-1000 cm^{-1} (estiramento da ligação C – O) e outra próxima de 1150 cm^{-1} são atribuídas à hidroxila de álcoois terciários. Nos espectros A e B da Figura 3.3 podemos observar essas bandas para o padrão de linalol e para o óleo essencial, respectivamente.

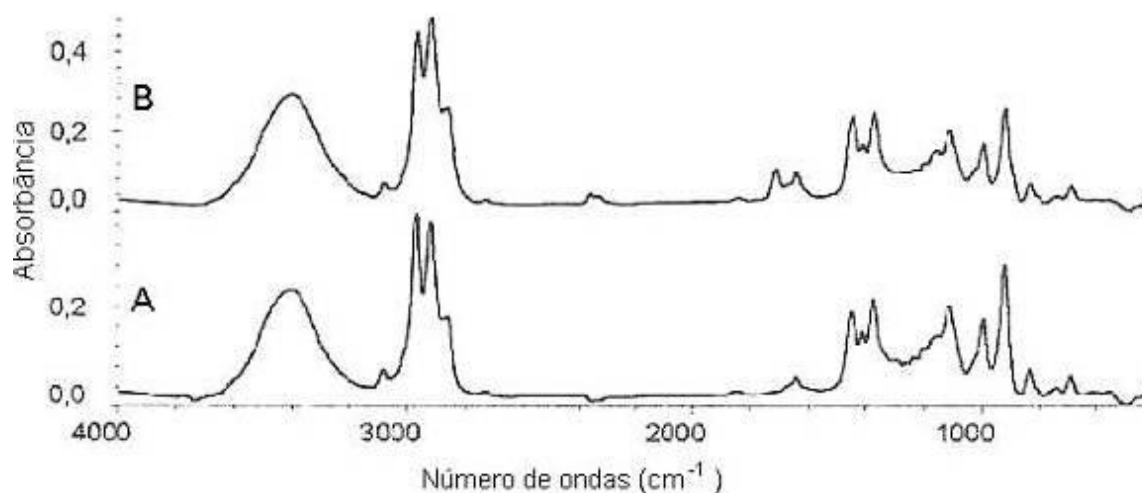


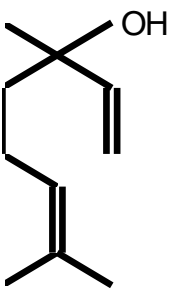
Figura 5.3 - Espectro na região do Infravermelho: (A) padrão de linalol e (B) óleo essencial extraído dos galhos da espécie *Aniba duckei* Kostermans

A banda de vibração verificada próximo de 3090 cm^{-1} (3086 cm^{-1} , para o padrão de linalol e 3099 cm^{-1} , para o óleo essencial) é proveniente da deformação axial da ligação $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$, referente à ligação química $=\text{C-H}$ do grupo vinila, que, de acordo com a literatura, deverá ter banda fraca observada entre 3100 e 3000 cm^{-1} . As bandas de absorção na região do infravermelho verificadas na região de 3000 a 2840 cm^{-1} constituem absorção proveniente do estiramento da ligação $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$, característica dos compostos alifáticos. No espectro da Figura 5.3, verifica-se essas bandas em números de ondas, respectivamente, 2972 e 2970 cm^{-1} para o padrão de linalol e para o óleo essencial. A banda fraca observada em 1625 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação dupla $\text{C}=\text{C}$ (grupo vinila) que, segundo a literatura deve apresentar bandas de $1680\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$. A banda que se verifica próximo a 1070 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação C-O de álcoois. As ligações $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$ sofrem deformações fora do plano que absorvem em regiões entre 1000 e 680 cm^{-1} e quando se trata de $=\text{CH}_2$ essa absorção é entre 910 e 905 . No espectro da Figura 3.3 essas ligações são verificadas, para o padrão de linalol e para o óleo, em 908 e 909 cm^{-1} . Estas observações estão de acordo com a literatura (SILVERSTEIN et al., 2007; LOPES e FACIO, 2004) e são suficientemente justificáveis, visto que o linalol é o componente majoritário do óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans, o Pau Rosa amazônico.

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

As principais bandas verificadas nos espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho para o padrão de linalol e para o óleo essencial analisado neste trabalho, bem como os seus modos vibracionais, encontram-se dispostos na Tabela 5.2.

TABELA 5.2. Principais bandas de absorção e modos vibracionais do padrão de linalol e do óleo essencial na região do infravermelho.

Composto (linalol)	Tipo de ligação	Grupo	Tipo de deformação	Absorção linalol (cm^{-1})	Absorção óleo (cm^{-1})
	O – H	Álcool	Axial	3406,4	3395,7
	C – H	Vinil	Axial	3086,2	3099,2
	C – H	Metil	Axial	2972,0	2970,7
	C = C	Vinil	Axial	1625,0	1625,0
	C – O	Álcool	Axial	1068,2	1072,6
	C – H	Vinil	Fora do plano	908,1	909,9

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

5.3.3 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas

O cromatograma do óleo essencial extraído dos galhos da espécie *Aniba duckei* Kostermans, obtido com o uso de uma coluna Capilar, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. HP-5MS, 5% difenil, 95% dimetil polisiloxano (Equivalente DB-5MS ou CP-Sil 8CB LB/MS), é apresentado na Figura 5.4.

As substâncias identificadas a partir do cromatograma da Figura 5.4, estão relacionadas na Tabela 3.3. Nessa tabela, constam o número do pico pela ordem de eluição, o tempo de retenção de cada substância na coluna (em minutos), o nome mais comum para cada substância identificada, a porcentagem de área normalizada a qual indica a distribuição relativa dos compostos na amostra e a “Qualidade”, a qual consiste no índice de pesquisa na base de dados que reflete a similaridade do espectro de massas obtido com os registros nas bibliotecas utilizadas. Adotam-se índices de qualidade maior que 70.

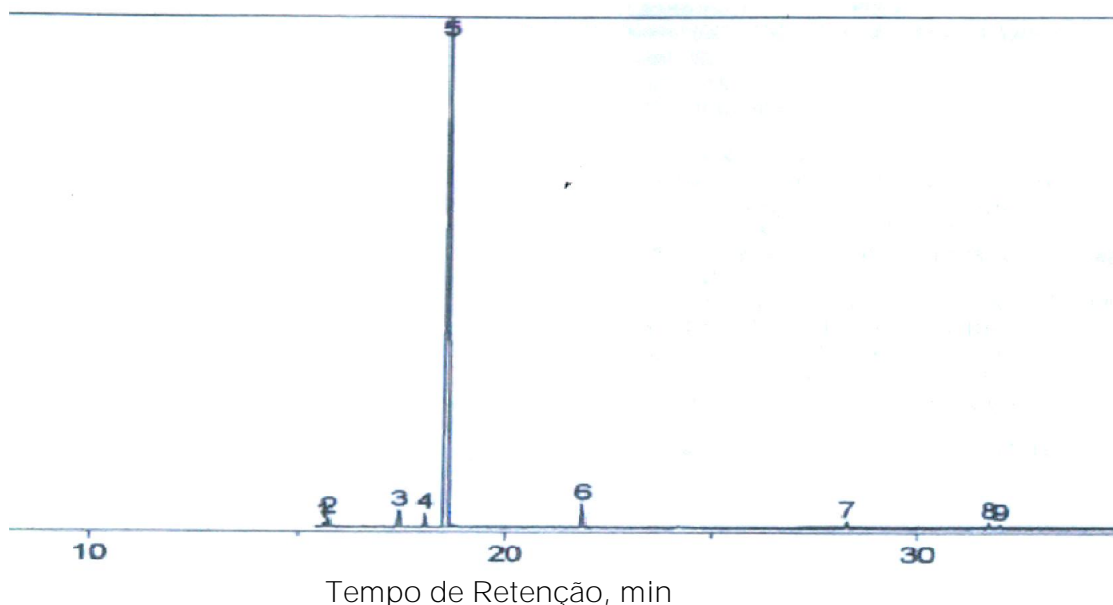


Figura 5.4 Cromatograma do óleo essencial extraído dos galhos da espécie *Aniba duckei* Kostermans

Para a identificação dos compostos separados e detectados na amostra do óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans, utilizou-se as bases de dados de espectros de massas das espectrotecas NIST105, NIST21 e WILEY139, e o programa AMSDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution Mass & Identification System), além de referências como o livro do Adams (ADAMS, 2001) e artigos que apresentaram análises com espectros semelhantes. Para o linalol, a confirmação também foi pela adição de padrão.

Tabela 5.3. Compostos identificados na amostra de óleo essencial de galhos da espécie *Aniba duckei* Kostermans

Pico	t _{RET} ^a	Nome do Composto	%A ^b
1	15,61	Limoneno	0,52
2	15,71	1,8-Cineol	1,07
3	17,43	Cis-óxido de linalol	1,94
4	18,06	trans-óxido de linalol	1,86
5	18,60	Linalol	89,34
6	21,88	á-Terpineol	3,06
7	28,26	á-copaeno	0,89
8	31,74	á-Patchuleno	0,77
9	32,02	Cariofileno	0,55

^aTempo de retenção do pico pela ordem de eluição da coluna.

^b%A = Porcentagem de area normalizada.

O pico cromatográfico de número 5, Figura 5.4, com tempo de retenção 18,60 min, corresponde ao componente majoritário do óleo do pau-

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

rosa, o linalol, $C_{10}H_{18}O$, massa molecular igual a 154 u. O espectro de massas referente a este pico, para o óleo essencial está representado na Figura 5.5.

A identificação do linalol por Espectroscopia de Massas foi confirmada pelo padrão de linalol, pelas espectroscotecas NIST105, NIST21 E WILWY139 e com dados constantes da literatura (ADAMS, 2001).

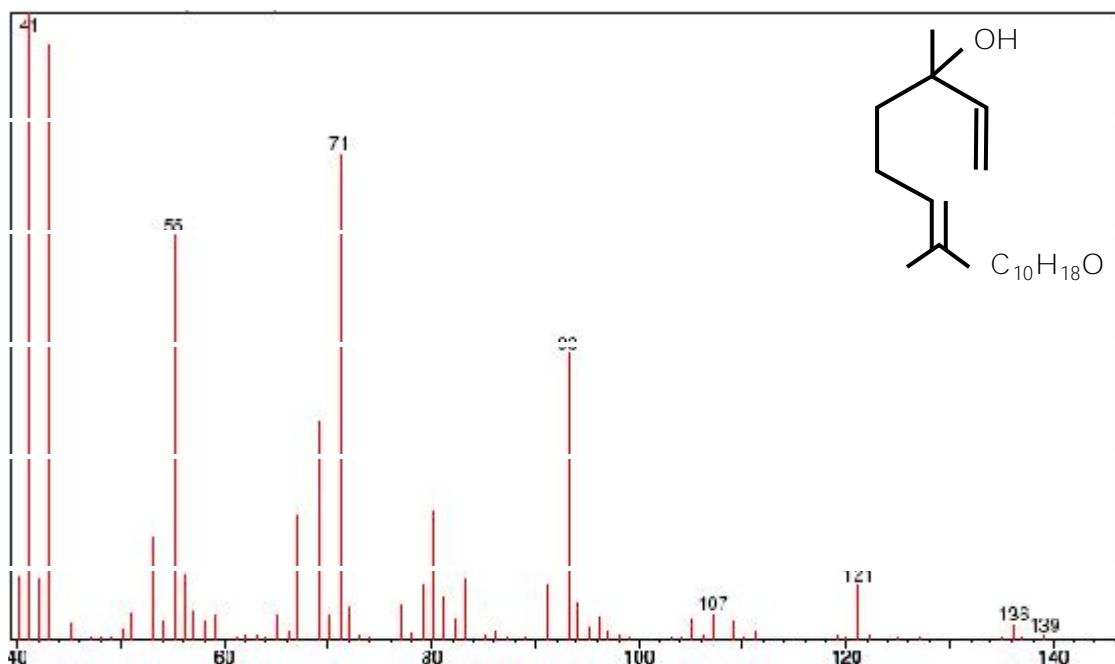


Figura 5.5 - Espectro de massas do composto do pico 5 do cromatograma da Figura 5.4. Este pico refere-se ao linalol.

Segundo a literatura, o pico do íon molecular é de muito difícil visualização no caso de alcoóis terciários, o que é o caso do linalol. Para o este composto, cuja fórmula molecular é $C_{10}H_{18}O$, o pico do íon molecular é $m/z = 154$ [M]. Na Figura 5.5, o pico 136 [M – 18], corresponde à perda de água, enquanto o pico $m/z = 121$ [M – 18 – 15] é correspondente à perda de água e grupo metila. O linalol é um álcool terciário, e para compostos dessa natureza é frequente a quebra de ligação carbono-carbono vizinha ao átomo de oxigênio, com eliminação do maior grupo, o que fica evidenciado no pico de $m/z=71$ ($H_2C=CH-COH^+-CH_3$) e pelo pico de $m/z=83$ [$(CH_3)_2C=CH-CH_2-CH_2$]. Sendo este último um alceno, ele pode ser identificado por um aglomerado de picos observados em intervalos de 14 unidades, correspondentes à perda de grupos metilenos. Para o pico $m/z = 121$, os picos derivados dessa forma seriam 107,

93, 79, 65 e 41, o que pode ser observado no espectro do linalol, Figura 5.5 (SILVERSTEIN et al., 2007).

O pico 1 da Figura 5.4, segundo o programa AMSDIS (Automated Spectral Deconvolution Mass & Identification System) e a literatura (ADAMS, 2001), corresponde ao limoneno, $C_{10}H_{18}$, de massa molecular igual a 136 e porcentagem relativa de área correspondente a 0,52%. A Figura 5.6 mostra o espectro de massas para esse composto, acompanhado de sua fórmula estrutural.

Observando o espectro da Figura 5.6, percebe-se que o íon molecular é o correspondente à relação m/z igual a 136. No valor de $m/z = 121$ [$M - 15$], tem-se uma perda de metila e $m/z = 107$ [$M - 15 - 14$] uma subsequente perda de metileno, seguida de outra perda de metileno que resulta em $m/z = 93$ [$M - 15 - 14 - 14$], o que é característico de hidrocarbonetos. O pico $m/z = 68$ [$C_5H_8^+$] deve ser em decorrência de um modo especial de quebra semelhante a uma retro-Diels-Alder (SILVERSTEIN et al., 2007).

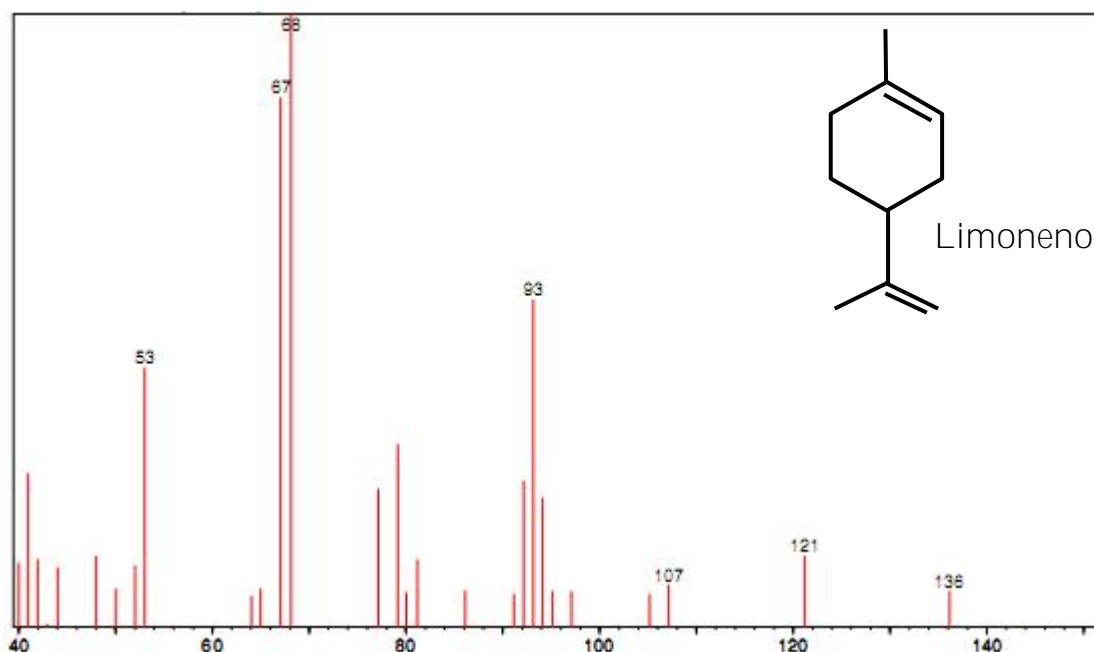


Figura 5.6. Espectro de massas correspondente ao pico 1 do cromatograma da Figura 5.4, limoneno.

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

O pico 2, tempo de retenção 15,71 minutos, mostrado no cromatograma da Figura 5.4, refere-se à substância 1,8-cineol, $C_{10}H_{18}O$, massa molecular igual a 154u, cuja porcentagem de área normalizada é igual a 1,07%. Isso pode ser observado pela análise do espectro de massa da Figura 5.7 e confirmado pelas espectroscotecas NIST105, NIST21 e WILWY139 e com dados constantes da literatura (ADAMS, 2001).

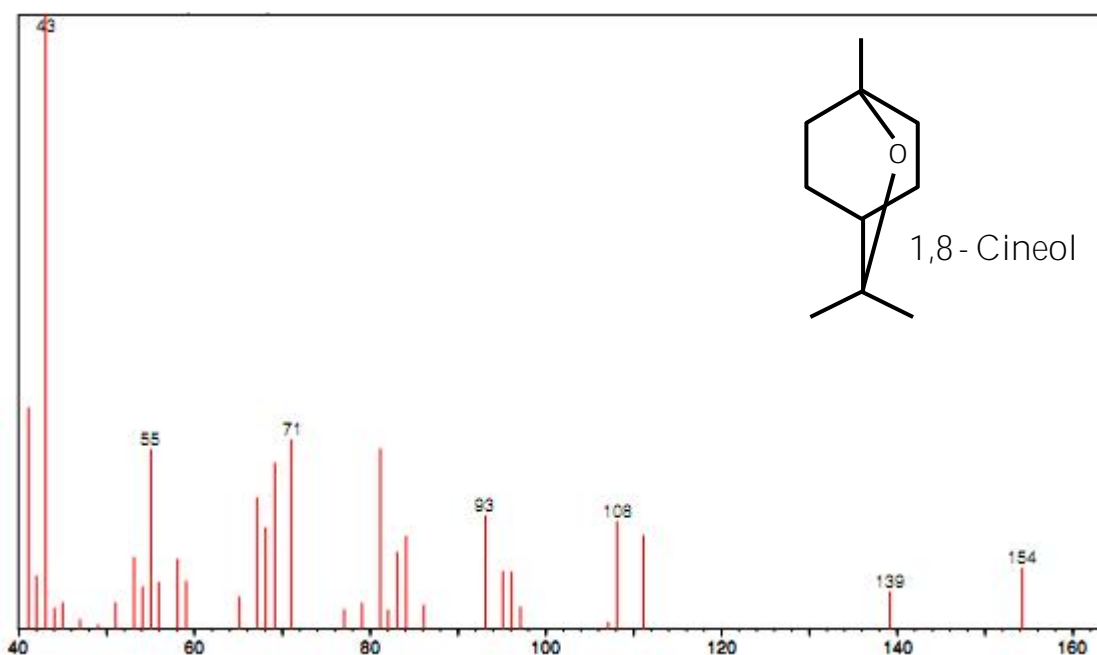


Figura 5.7. Espectro de massas correspondente ao pico 2 do cromatograma da Figura 5.4, 1,8-Cineol

O pico $m/z = 139$ refere-se a uma provável perda de grupo metila. Já o pico $m/z = 111 [M - 43]$ corresponde à perda do grupo propila ($[C_3H_7]$) ao passo que o pico $m/z = 93 [M - 43 - 18]$ é deduzido por posterior perda de água. Os picos de m/z iguais a 81 e 71 possivelmente referem-se a uma clivagem do ciclo.

Os picos 3 e 4 no cromatograma da Figura 5.4 correspondem, respectivamente, aos estereoisômeros cis e trans do óxido de linalol, $C_{10}H_{18}O$, massa molecular igual a 154, o que está de acordo com a literatura (ADAMS, 2001; MAIA, 2000; NAMARA et al., 2007). As porcentagens de área normalizada são iguais a 1,94 e 1,86%, respectivamente. Os espectros de

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

massas desses picos encontram-se nas Figuras 5.8 e 5.9. De acordo com a literatura (FERREIRA et al., 2001) os espectros de massas dos isômeros cis e trans são, normalmente, muito similares e eluem de acordo com seus pontos de ebulição sendo o isômero cis antes do trans. Isso pode ser percebido no cromatograma da Figura 5.4 e na Tabela 5.3, em que o isômero cis do óxido de linalol eluiu no tempo de 17,43 minutos ao passo que o isômero trans eluiu no tempo de 18,06 minutos.

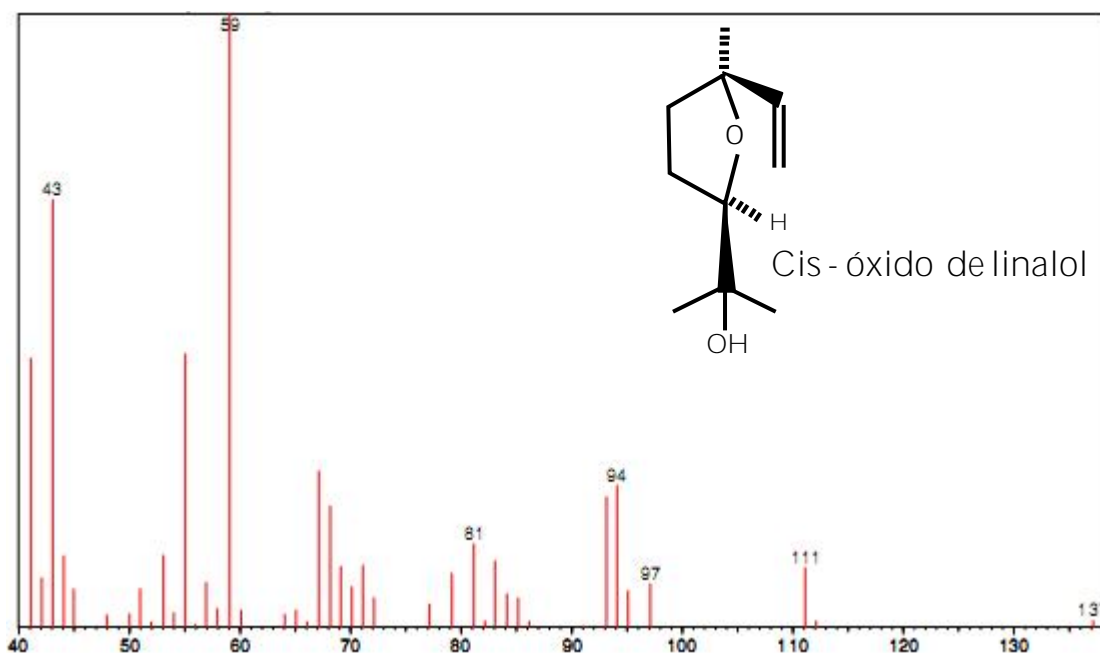


Figura 5.8. Espectro de massas correspondente ao pico 3 do cromatograma da Figura 5.4, cis-óxido de linalol.

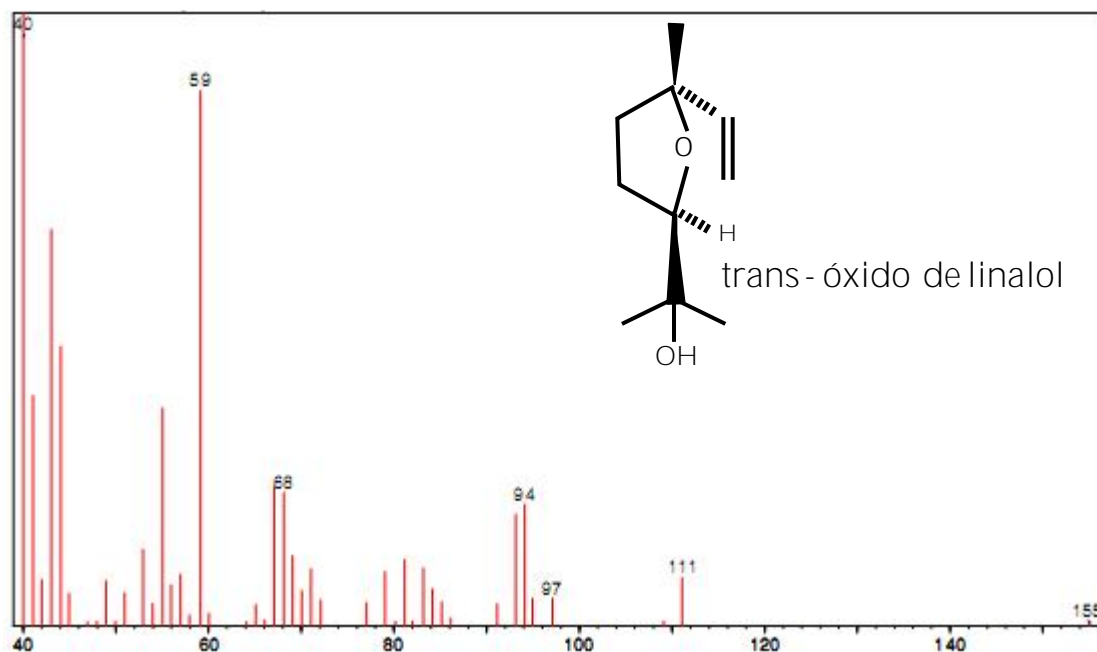


Figura 5.9. Espectro de massas correspondente ao pico 4 do cromatograma da Figura 5.4., trans-óxido de linalol.

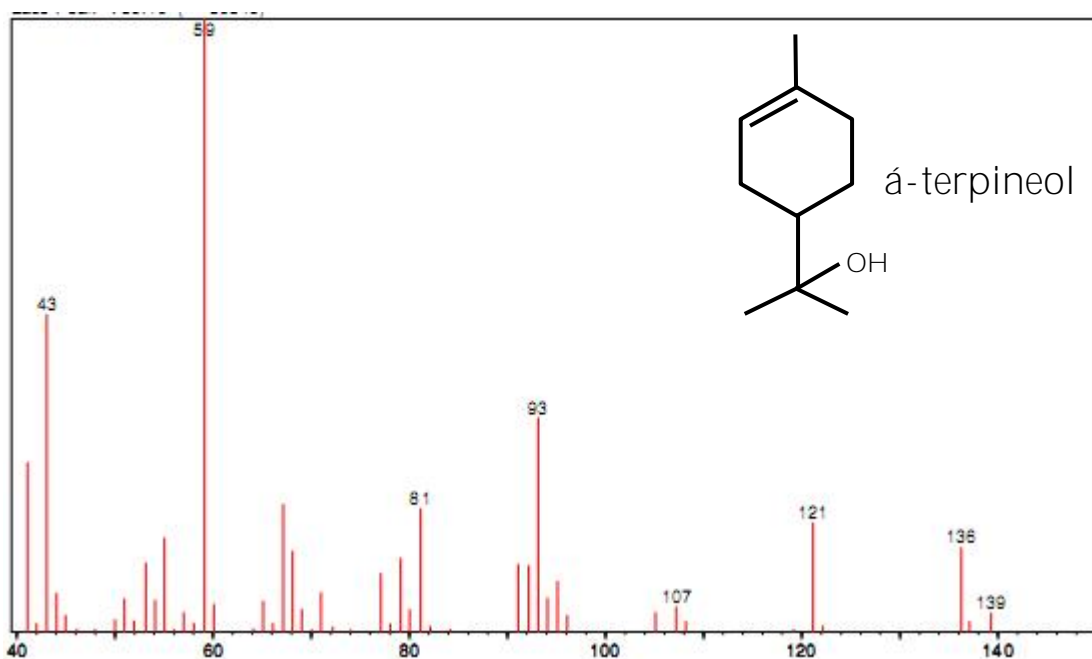


Figura 5.10. Espectro de massas correspondente ao pico 6 do cromatograma da Figura 5.4, á-terpineol.

No tempo de retenção de 21,88 minutos do cromatograma mostrado na Figura 5.4, aparece o pico 6, que após análise do espectro de massas,

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

pelas espectroscotecas NIST105, NIST21 e WILWY139 e com dados da literatura (ADAMS, 2001; NAMARA et al., 2007) conclui-se que se trata do composto α -terpineol, $C_{10}H_{18}O$, de massa molecular igual a 154 e porcentagem relativa de área correspondente a, cuja porcentagem de área foi de 3,06%.

Pelo espectro de massas da Figura 5.11, é possível notar que o íon-molecular, M, aparece em $m/z = 154$, muito discretamente e logo em seguida aparece o pico $m/z = 136$ [M – 18], representativo da perda de uma molécula de água do álcool. Em seguida aparecem os picos $m/z = 121$ [M – 18 - 15], representativo da perda de um grupo metila e o pico com $m/z = 107$ [M – 18 – 15 – 14] e 93 [M – 18 – 15 – 14 – 14], característicos de duas perdas consecutivas de grupos metilenos (CH_2), o que está em conformidade com a literatura (ADAMS, 2001; NAMARA et al., 2007).

No cromatograma da Figura 5.4, aparece em 28,26 minutos o pico de número 7, com abundância de 0,89%, o qual após ser analisado pelas espectroscotecas NIST105, NIST21 e WILWY139 e comparado com dados da literatura (ADAMS, 1995; NAMARA et al., 2007), conclui-se que refere-se à substância α -Copaeno, $C_{15}H_{24}$, de massa molecular igual a 154.

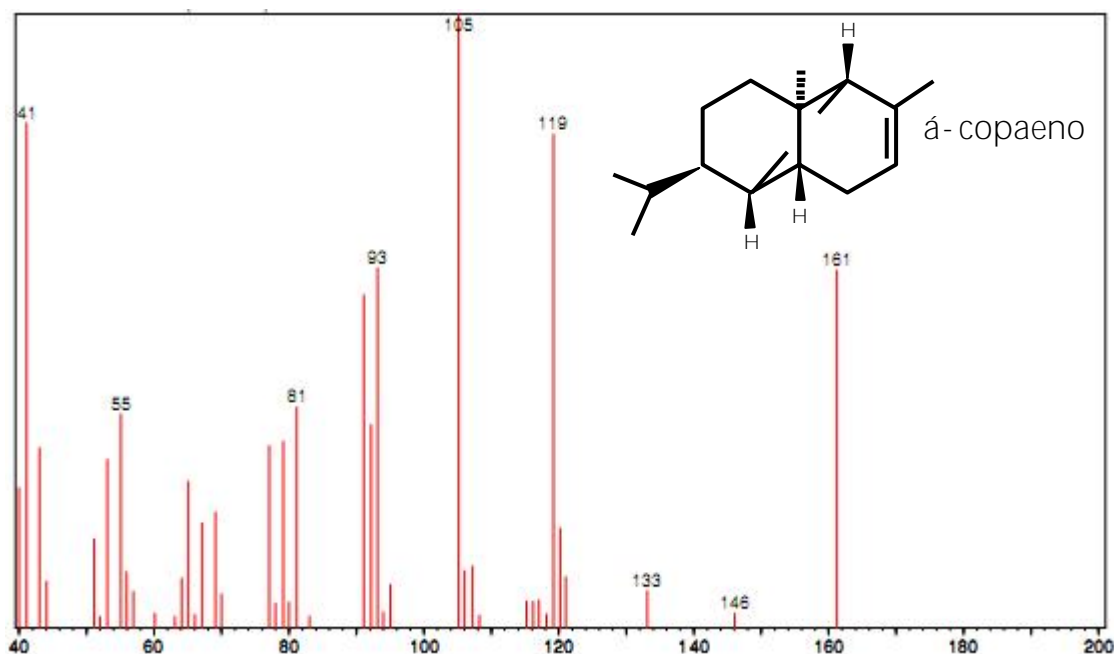


Figura 3.11. Espectro de massas correspondente ao pico 7 do cromatograma da Figura 5.4, α -copaeno.

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

Ao analisar o espectro de massas referente ao pico 7 do cromatograma da Figura 5.4, 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. Na seqüência, o pico com intensidade $m/z = 161$ [$M - 43$] indica a perda do grupo isopropila pela molécula α -copaeno.

O pico 8 da Figura 5.4, tempo de retenção 31,74 minutos, foi caracterizado como sendo o composto α -patchouleno, $C_{15}H_{24}$, com massa molecular igual a 204 e com porcentagem de área 0,77% de acordo com as espectroscotecas NIST105, NIST21 e WILWY139 e comparado com dados da literatura (ADAMS, 2001). Seu espectro de massas está representado na Figura 5.12.

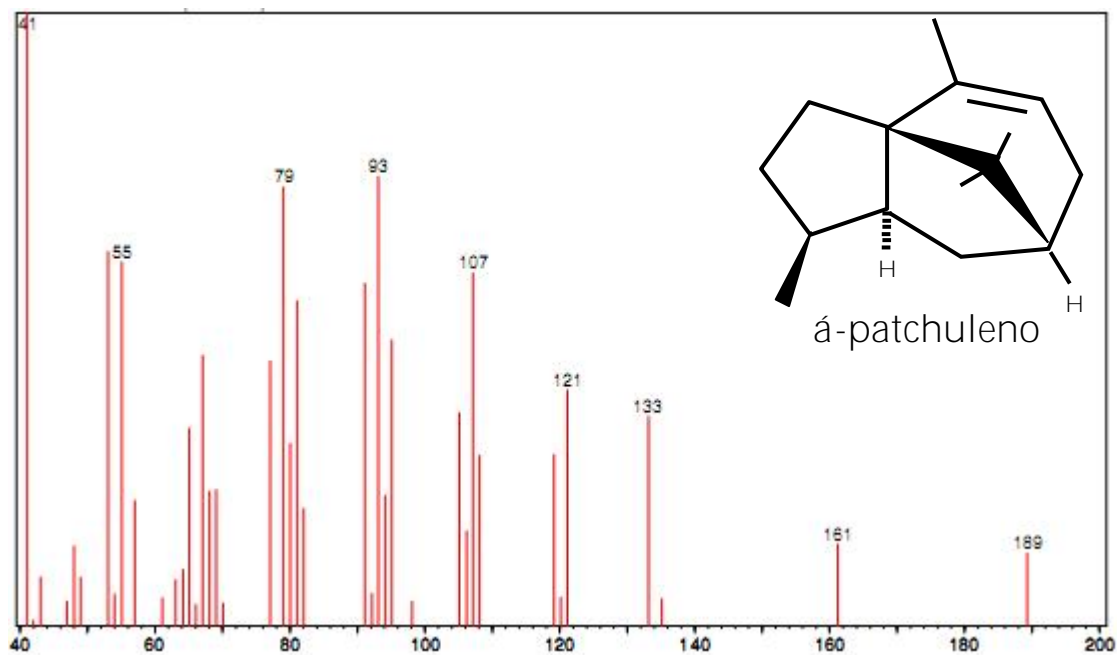


Figura 5.12. Espectro de massas correspondente ao pico 8 do cromatograma da Figura 5.4, α -patchuleno.

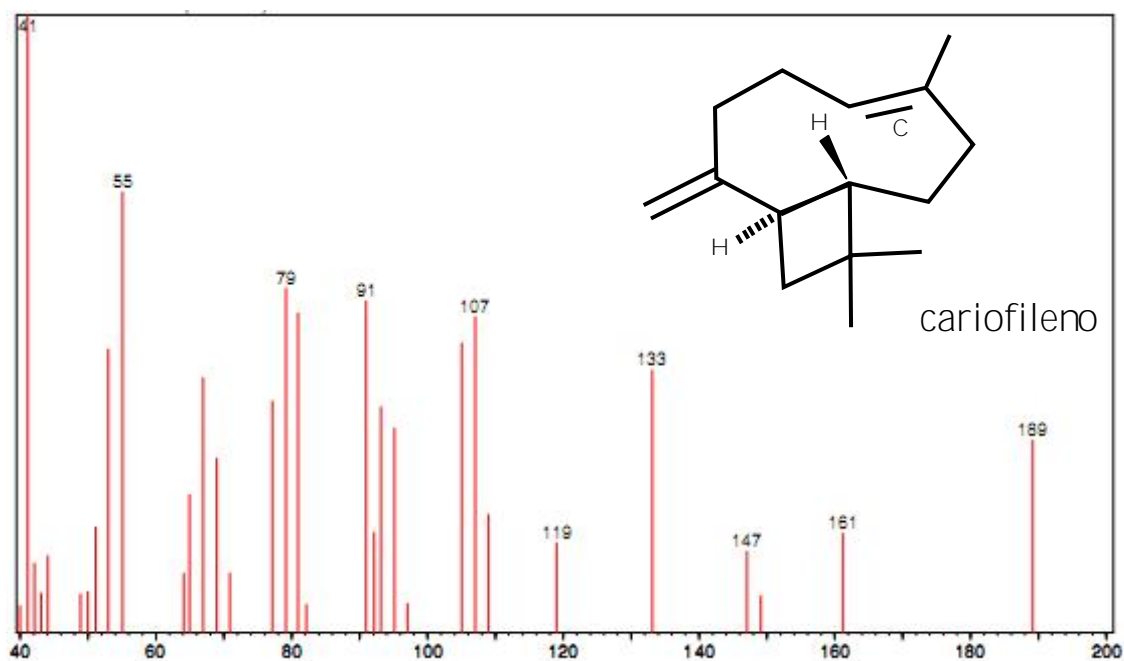


Figura 5.13. Espectro de massas correspondente ao pico 9 do cromatograma da Figura 5.4, Cariofileno.

No tempo de retenção de 32,02 minutos do cromatograma mostrado na Figura 5.4, aparece o pico de número 9, que após análise do espectro de massas, pelas espectroscotecas NIST105, NIST21 e WILWY139 e com dados da literatura (ADAMS, 2001; NAMARA et al., 2007) conclui-se que se trata do composto cariofileno de fórmula molecular C₁₅H₂₄ e massa molecular igual a 204, cuja porcentagem de área foi de 0,55%.

5.3.4 Quantificação por Cromatografia Gasosa

Construiu-se um gráfico para avaliar cromatograficamente a concentração proposta, registrando-se a concentração de linalol pelo valor médio (n = 5) das respectivas áreas e interpolando-se o valor da amostra.

As Figuras 5.14 e 5.15 apresentam a determinação quantitativa do linalol por CG, usando o método do padrão externo baseado no aumento da área do pico do cromatograma, em função do aumento da concentração de linalol da solução padrão. A curva analítica de padrão externo é caracterizada pelo coeficiente de correlação (r = 0,998820).

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

Neste método o linalol pode ser determinado com segurança devido sua elevada concentração no óleo essencial, não sendo afetado pelo efeito matriz das amostras.

Pela quantificação cromatográfica (Figura 5.15) pôde-se determinar que o teor de linalol contido no óleo essencial extraído dos galhos da espécie *Aniba duckei* K foi de 89,34%, o que está de acordo com a literatura (CHAAR, 2000; TELES, 2003).

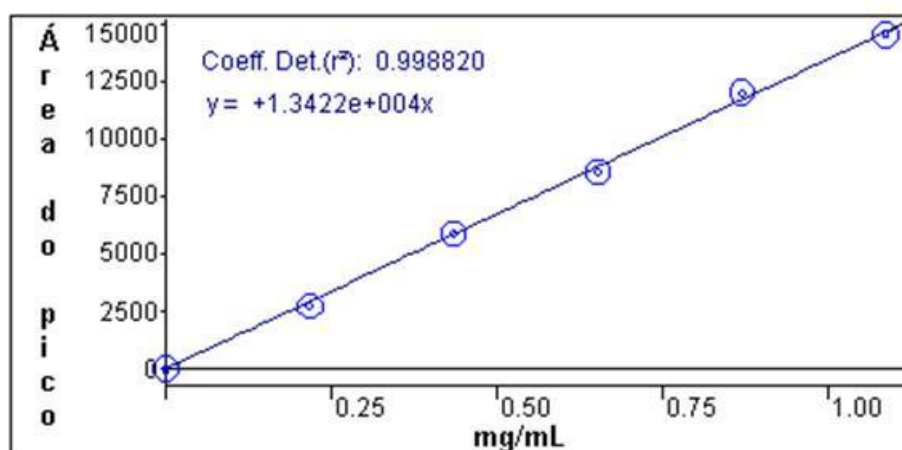


Figura 5.14. Curva analítica obtida pelo método do Padrão Externo para determinação do Linalol no óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans.

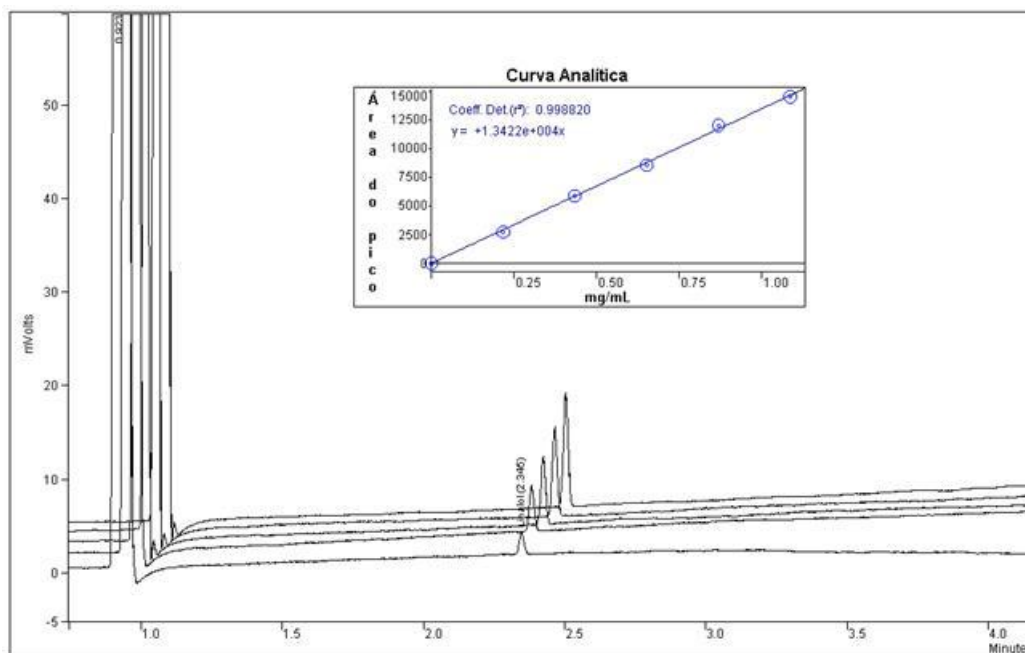


Figura 5.15. Curva analítica obtida pelo método do Padrão Externo, com cromatogramas, para determinação do Linalol no óleo essencial da espécie vegetal *Aniba dukei* Kostermans

5.4. Análise Térmica do Óleo Essencial

5.4.1. Calorimetria Exploratória Diferencial

As curvas DSC do óleo essencial da *Aniba dukei* Kostermans e do padrão de linalol acondicionadas em porta-amostra de alumínio (Al) fechados, com e sem furos, em atmosferas de ar e de gás nitrogênio (N_2), são mostradas a seguir.

A curva DSC obtida com razão de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ para 6,50 mg de amostra de linalol em atmosfera de ar em recipiente de alumínio, sem furo, apresentou um único pico endotérmico, com temperatura de pico de $204,11^\circ\text{C}$ e entalpia de $213,4\text{ J g}^{-1}$ atribuída à volatilização do linalol, o que pode ser verificado na Figura 5.16.

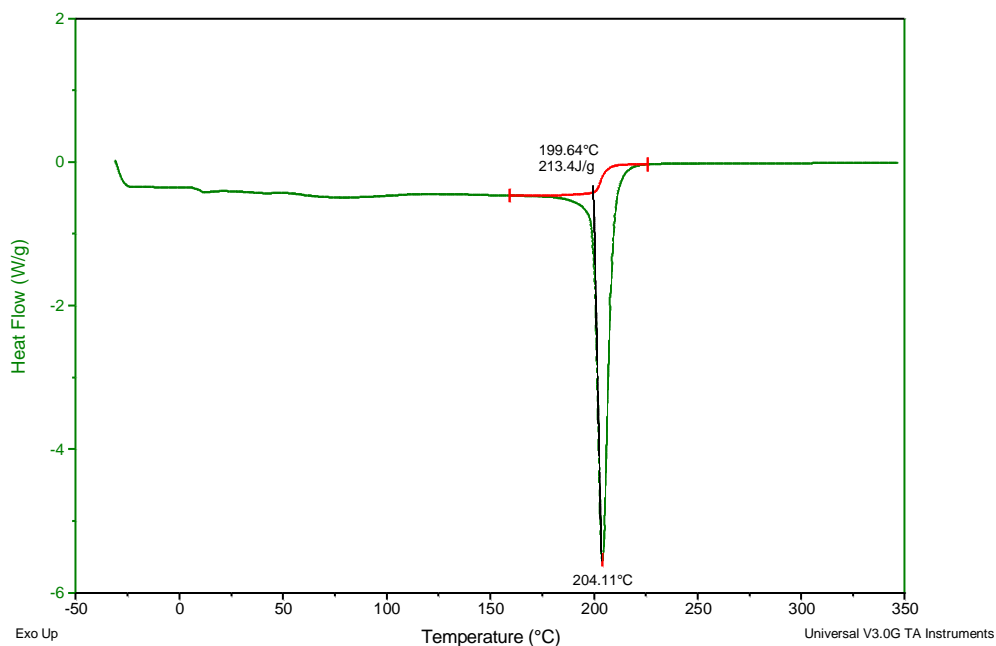


Figura 5.16. Curva DSC para padrão de linalol em atmosfera de ar e panela de alumínio sem furo, com razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

A Figura 5.17 traz a curva DSC obtida com razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e 10,30 mg de amostra para o óleo essencial da *Aniba dukei* Kostermans em cadinho de Al sem furo com atmosfera de ar apresentou duas transições endotérmicas, a primeira com temperatura de pico de $107,32\text{ }^{\circ}\text{C}$ e entalpia de $339,4\text{ J/g}$, e a segunda com temperatura de pico de $213,90\text{ }^{\circ}\text{C}$ e entalpia de $60,19\text{ J/g}$, atribuída à volatilização e/ou decomposição do óleo essencial.

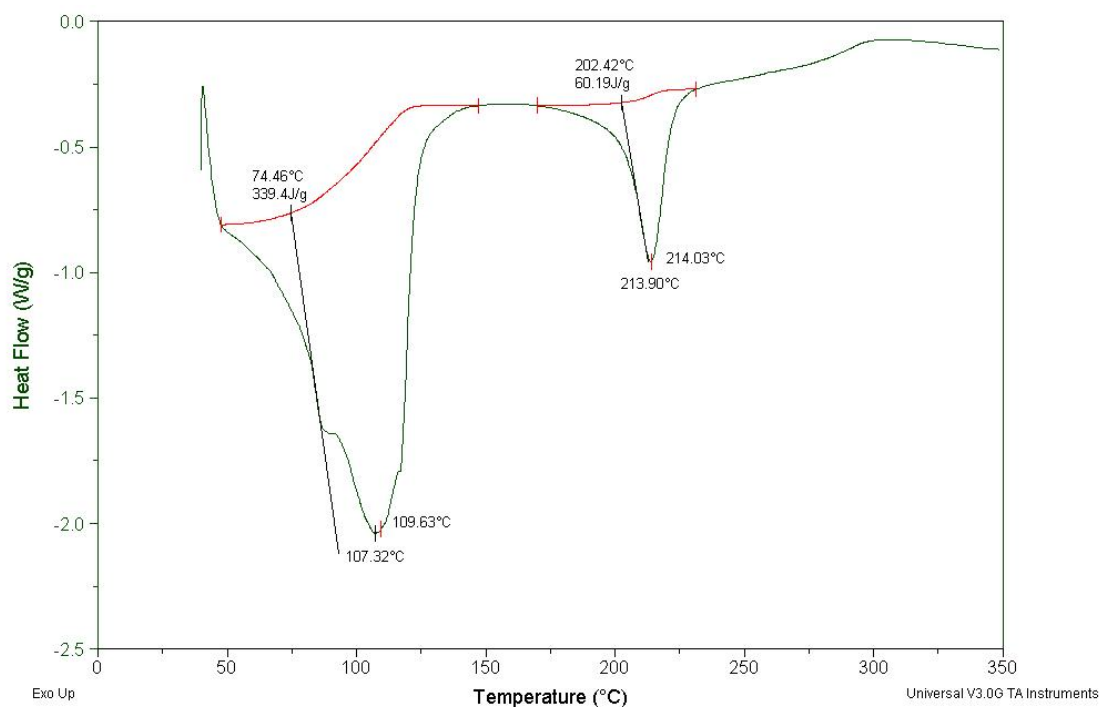


Figura 5.17. Curva DSC para o óleo essencial da *Aniba dukei* Kostermans em atmosfera de ar atmosférico e panela de alumínio sem furo, com razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

Pela Figura 5.18, referente à análise calorimétrica exploratória diferencial, DSC, com 5,55 mg do padrão de linalol em atmosfera de gás nitrogênio (N_2) e porta amostra de alumínio sem furo, percebe-se um único pico com temperatura de $206,24\text{ }^{\circ}\text{C}$ e entalpia de $253,6\text{ J g}^{-1}$ atribuída à volatilização do linalol.

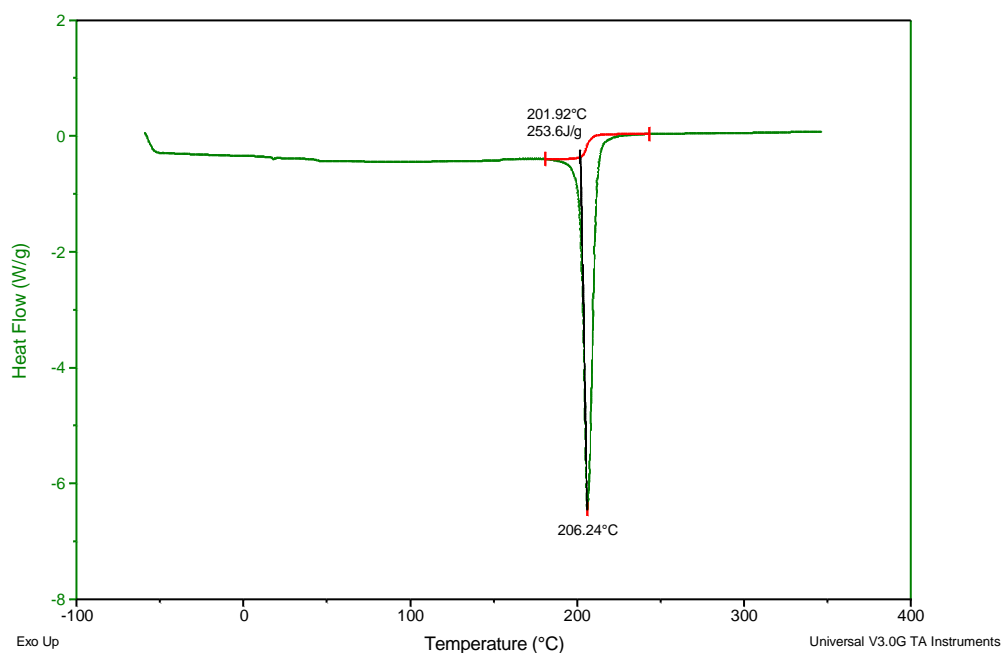


Figura 5.18 Curva DSC para padrão de linalol em atmosfera de N_2 e panela de alumínio sem furo, com razão de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

As curvas DSC para as determinações das temperaturas de ebulição do padrão de linalol acondicionadas em porta-amostra de alumínio (Al) fechado sem furos, em atmosfera de ar, Figura 5.16, e de gás nitrogênio (N_2), Figura 5.18 mostram uma variação pequena nas temperaturas de pico e nas entalpias de vaporização do linalol.

A Figura 5.19, mostra a curva DSC obtida com razão de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ e 10,00 mg de amostra para o óleo essencial da *Aniba dukei* Kostermans em cadinho de Al sem furo com atmosfera de gás nitrogênio (N_2) apresentou duas transições endotérmicas, a primeira com temperatura de pico de $106,12\text{ }^\circ\text{C}$ e entalpia de $360,5\text{ J g}^{-1}$, e a segunda com temperatura de pico de $209,90\text{ }^\circ\text{C}$ e entalpia de $62,88\text{ J g}^{-1}$, atribuída à volatilização do óleo essencial.

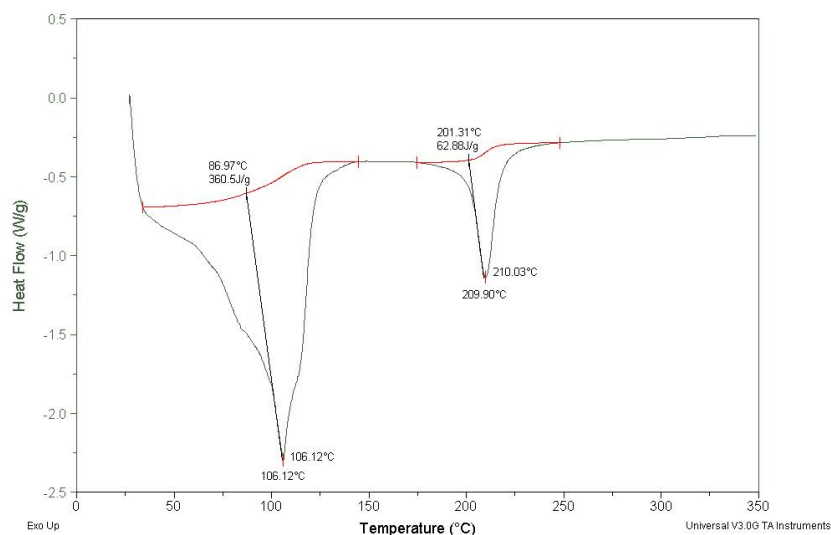


Figura 5.19. Curva DSC para o óleo essencial da *Aniba dukei* Kostermans em atmosfera de gás nitrogênio (N_2) e panela de alumínio sem furo, com razão de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

Uma comparação entre as Figuras 5.17 e 5.19, referentes às curvas de DSC das amostras de óleo essencial da *Aniba dukei* Kostermans em atmosfera de ar ($T_E = 107,32\text{ }^\circ\text{C}$ e $\Delta H = 339,4\text{ J g}^{-1}$ e $T_E = 213,9\text{ }^\circ\text{C}$ e $\Delta H = 60,19\text{ J g}^{-1}$) e de gás nitrogênio ($T_E = 106,12\text{ }^\circ\text{C}$ e $\Delta H = 360,5\text{ J g}^{-1}$ e $T_E = 209,9\text{ }^\circ\text{C}$ e $\Delta H = 62,88\text{ J g}^{-1}$), respectivamente, em panela de alumínio sem furo, com razão de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, mostrou que a variação nas temperaturas de pico e nas entalpias foi pequena. Certamente essa variação ocorreu por conta da presença dos componentes minoritários, sendo essa variação pequena pelo alto teor de linalol no óleo.

Para o padrão de linalol, Figuras 5.16 e 5.18, referentes às curvas de DSC, os valores de temperatura de ebulição e entalpias também sofreram apenas pequenas variações em atmosferas de ar ($T_E = 204,11\text{ }^\circ\text{C}$ e $\Delta H = 213,4\text{ J g}^{-1}$) e de gás nitrogênio ($T_E = 206,24\text{ }^\circ\text{C}$ e $\Delta H = 253,6\text{ J g}^{-1}$). Essas diferenças são a menor em atmosfera oxidante porque, possivelmente, ocorre reação do álcool formando substâncias menos polares.

As curvas DSC obtidas a partir do padrão de linalol, Figuras 5.16 e 5.18, demonstraram ainda que não há evidência de decomposição do linalol e

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

que também é clara a ausência de água de hidratação. Porém, as curvas DSC obtidas com o óleo essencial da espécie vegetal *Aniba dukei* Kostermans, Figuras 5.17 e 5.19, mostram uma transição endotérmica em torno de 100 °C, o que pode evidenciar que o óleo essencial apresenta água de hidratação.

A Figura 5.20 apresenta a curva DSC obtida com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e 5,27 mg de amostra do óleo essencial da *Aniba dukei* Kostermans em cadinho de Al com furo em atmosfera de gás nitrogênio (N₂). Percebem-se nessa figura, duas transições endotérmicas, a primeira com temperatura de pico de 99,36 °C e entalpia de 215,0 J g⁻¹, e a segunda com temperatura de pico de 167,08 °C e entalpia de 42,65 J g⁻¹, atribuída à volatilização e/ou decomposição do óleo essencial.

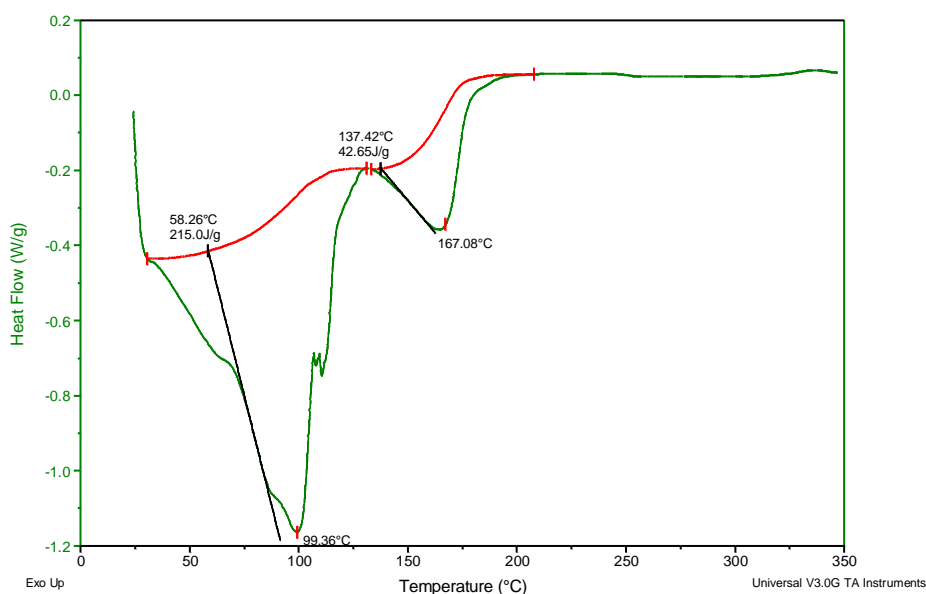


Figura 5.20. Curva DSC para o óleo essencial da *Aniba dukei* Kostermans em atmosfera de gás nitrogênio (N₂) e panela de alumínio com furo, com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

De acordo com os resultados mostrados e com a literatura, percebe-se que os melhores resultados foram aqueles onde as amostras foram acondicionadas em cadinhos de Al sem furos, mesmo levando-se em consideração que o número de transições foi o mesmo para o óleo essencial

da *Aniba duckei* K. A melhor definição das curvas de DSC usando-se o porta amostra de Al sem furo pode ser atribuída à alta volatilidade dos óleos essenciais em geral. Dessa forma, seria interessante que, para futuras análises, de acordo com os resultados aqui descritos, fosse utilizado esse tipo de porta amostra (MONTEIRO, 2008).

A grande semelhança entre os valores da temperatura do óleo essencial da *Aniba duckei* e do padrão de linalol pode ser explicada pelo fato de o linalol ser o componente majoritário no óleo, com 89,34%. Além disso, o valor de temperatura atribuída à temperatura de ebulição do linalol é semelhante ao encontrado na literatura (MERK, 1996; CAVALHEIROS, 2004).

As diferenças entre os pontos de ebulição e nas entalpias do padrão de linalol e do óleo essencial medidos neste trabalho justificam-se pela presença dos componentes minoritários bem como as possíveis interações entre eles e suas respectivas concentrações no óleo essencial. Deve se considerar que o fato de o óleo apresentar outras substâncias de diferentes polaridades, massas moleculares e forças intermoleculares deve influenciar nessas temperaturas de ebulição.

Por se tratar de uma técnica nova e eficiente para a determinação de temperaturas de ebulição de óleos essenciais, novos estudos deverão ser realizados no sentido de ampliar seu espectro de investigação científica de óleos essenciais. Essa técnica também poderá ser usada na certificação e na quantificação de óleos essenciais, tendo em vista que muitos óleos de alto valor econômico são freqüentemente adulterados.

5.4.2. Análise termogravimétrica

A Figura 5.21 mostra as curvas TG-DTG para 20,58 mg do padrão de linalol em atmosfera de ar, nas quais percebe-se uma única etapa de decomposição entre 48,08 e 169,92 °C com perda de 99,20% (19,85 mg) da massa, sendo a mesma devido ao processo de volatilização do linalol.

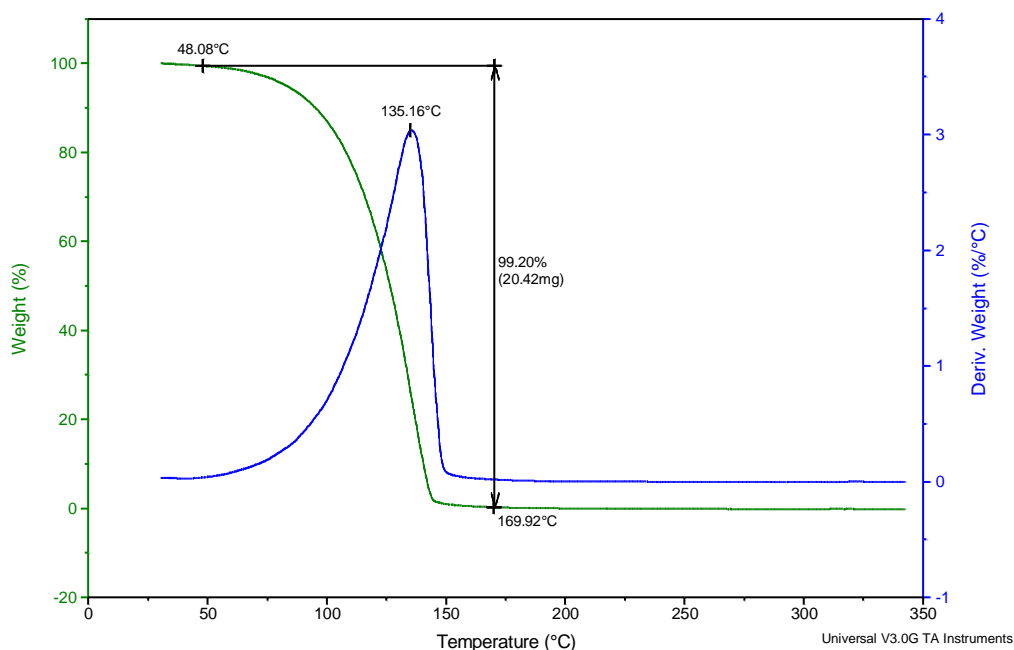


Figura 5.21. Curvas TG-DTG para o padrão de linalol em atmosfera de ar

O gráfico a seguir, Figura 5.22, mostra as curvas TG-DTG para 20,46 mg do óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans em atmosfera de ar atmosférico. De acordo com essas curvas torna-se possível a observação de uma única transição endotérmica, etapa de decomposição, que ocorre entre 41,02 e 188,91 °C com perda de 99,04% (20,27 mg) da massa, sendo a mesma devido ao possível processo de volatilização do óleo essencial.

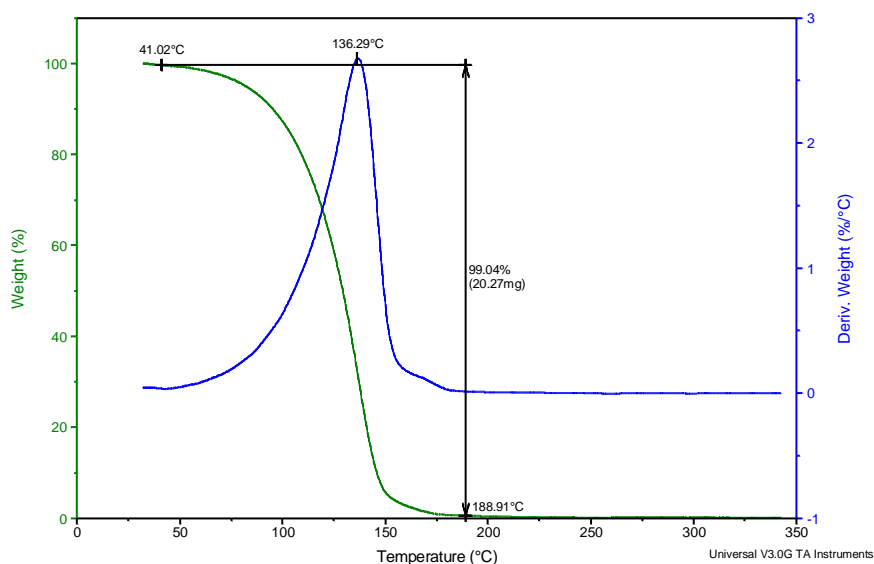


Figura 5.22. Curvas TG-DTG para o óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans em atmosfera de ar

Percebe-se pela análise das Figuras 5.21 e 5.22, que há uma ligeira diferença entre a evaporação do padrão de linalol para o óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans. O óleo começa a perder massa a uma temperatura inferior à do padrão e termina sua perda de massa a uma temperatura um pouco maior. Isso se deve, provavelmente, à presença dos componentes minoritários no óleo, dos quais alguns são mais voláteis que o linalol e outros são menos..

Investigando a Figura 5.23, que mostra as curvas TG-DTG para 20,58 mg do padrão de linalol em atmosfera de gás nitrogênio (N₂), percebe-se uma única etapa de decomposição entre 44,55 e 162,42 °C com perda de 98,58% (19,85 mg) da massa, sendo a mesma devido ao processo de volatilização do linalol.

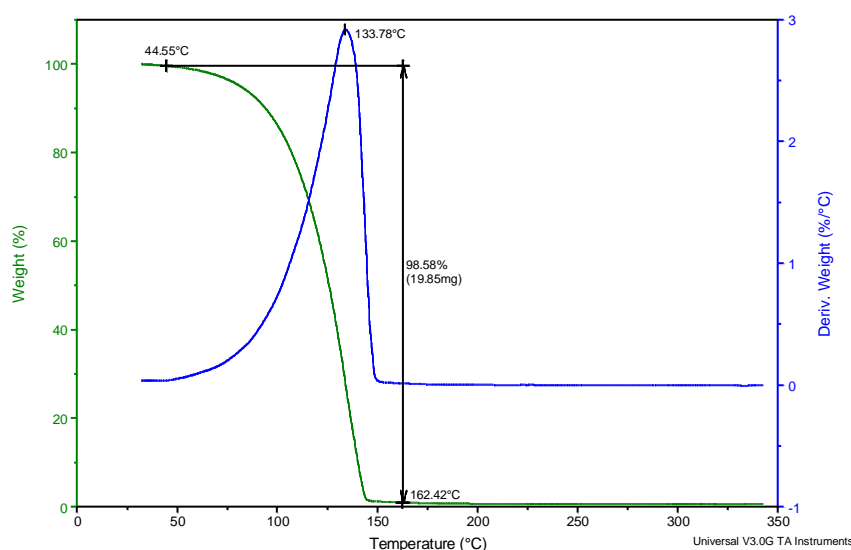


Figura 5.23. Curvas TG-DTG para o padrão de linalol em atmosfera de N₂.

A Figura 5.24, mostra as curvas TG-DTG para 19,07 mg do óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans em atmosfera de gás nitrogênio. Essas curvas revelam uma etapa de decomposição entre as temperaturas 41,46 e 181,84 °C com perda de 99,59% (18,99 mg) da massa, sendo a mesma devido ao processo de volatilização do óleo essencial.

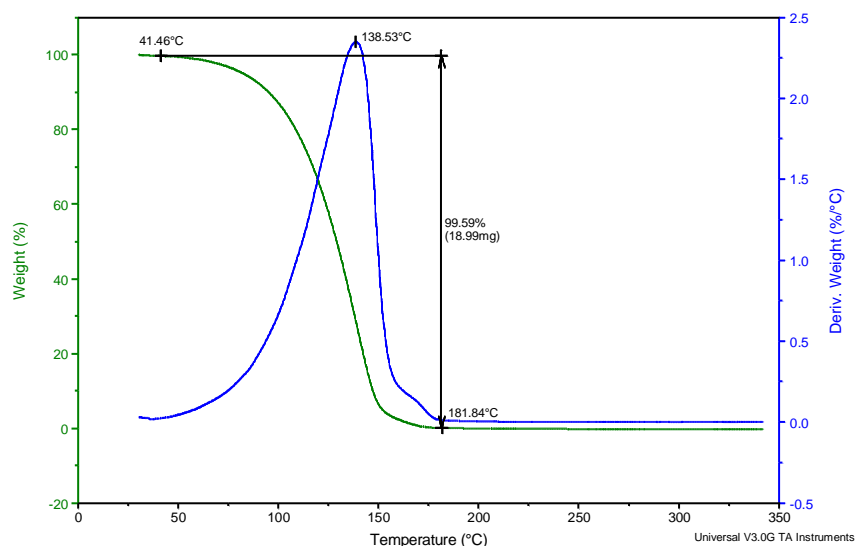


Figura 5.24 Curvas TG-DTG para o óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans em atmosfera de N₂.

A exemplo do que ocorreu em atmosfera de ar, percebe-se pela análise da Figura 5.23 e da Figura 5.24, que há uma sensível diferença entre a evaporação do padrão de linalol e a do óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans. Do mesmo modo que ocorreu em atmosfera de ar, o óleo começa perder massa a uma temperatura inferior à do padrão e termina sua perda de massa a uma temperatura levemente superior. Isso certamente se deve à presença dos diversos componentes minoritários no óleo, dentre os quais alguns deverão apresentar menores temperaturas de ebulição e outros maiores, bem como a interação entre esses componentes pode contribuir para essa diferença de temperatura de ebulição do óleo em relação ao padrão.

A Figura 5.25 é o resultado da sobreposição das curvas TG do óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans e do padrão de linalol, em diferentes atmosferas. O significado da legenda encontrada ao lado das curvas é o seguinte: Linpar = padrão de linalol em atmosfera de ar; Linpn2 = padrão de linalol em atmosfera de N₂; Olpar = óleo essencial em atmosfera de ar; Olpn2 = óleo essencial em atmosfera de N₂.

Pela Figura 5.25 torna-se mais fácil a observação de que a atmosfera, ar sintético (oxidante) ou gás nitrogênio (inerte), praticamente não

exerce influência no perfil termogravimétrico nem do óleo essencial nem do padrão de linalol, quando as amostras foram aquecidas em painéis de alumínio fechadas na razão de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

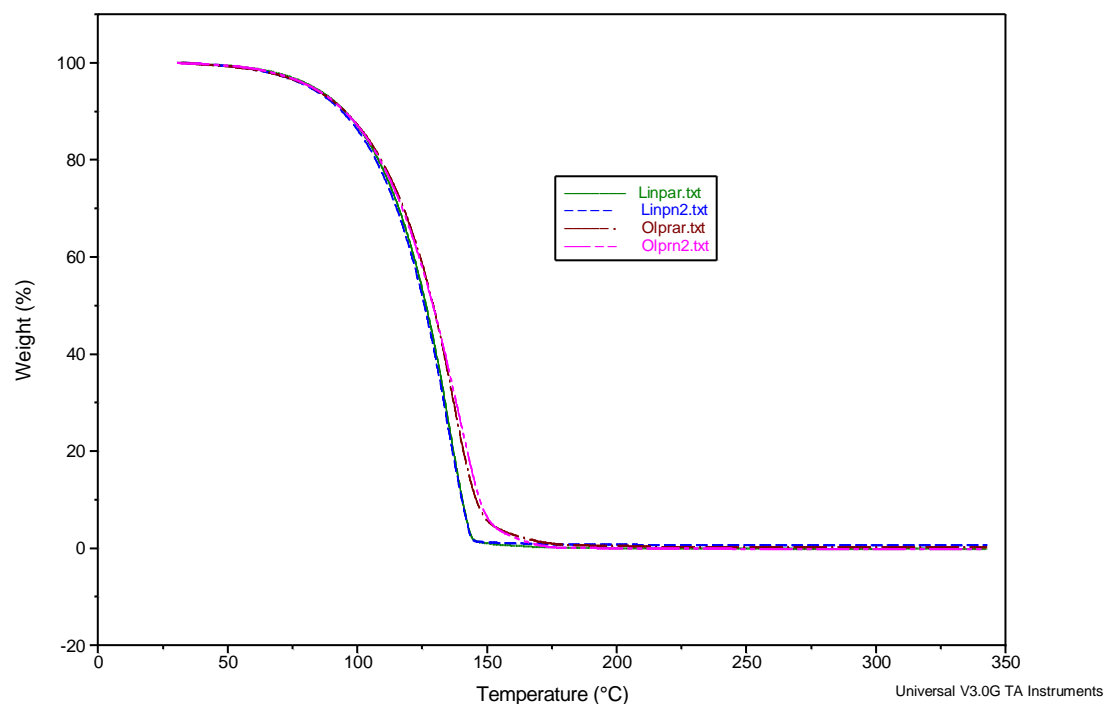


Figura 5.25. Curvas Termogravimétricas (TG) do óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans. e do padrão de linalol, em diferentes atmosferas.

Pela Figura 5.25, sobreposição das curvas TG do óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans e do padrão de linalol, em diferentes atmosferas, torna-se mais fácil a observação de que a atmosfera, ar sintético (oxidante) ou gás nitrogênio (inerte), praticamente não exerce influência no perfil termogravimétrico nem do óleo essencial nem do padrão de linalol, quando as amostras foram aquecidas na razão de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

Da mesma forma, percebe-se, pela mesma Figura 5.25, que para as amostras de óleo essencial o perfil termogravimétrico desloca-se para temperaturas maiores que as verificadas para o linalol puro, tanto em ar quanto em N_2 . Entende-se que isso seja possível em decorrência da influência dos

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

outros componentes do óleo essencial, possivelmente pelo motivo de o óleo conter substâncias menos voláteis que o linalol, tais como hidrocarbonetos e éteres, bem como pelo fato de essas substâncias todas estarem juntas e, por conseguinte, interagindo-se entre elas.

5.5 Atividade Larvicida do Óleo Essencial

A atividade larvicida do óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans foi testada em sete concentrações diferentes, a saber: 100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 5.4). O n é o número de larvas do *Aedes aegypti* utilizadas no ensaio larvicida para cada concentração, num total de 10 larvas por ensaio. Os testes foram realizados em quintuplicata para cada concentração. Os dados sobre o número de larvas vivas e de larvas mortas foram encontrados através de uma média das cinco repetições para cada uma das sete concentrações testadas.

Tabela 5.4. Mortalidade das larvas do *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição a várias concentrações do óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans.

Dose, $\mu\text{g mL}^{-1}$	log dose	Mortos	Vivos	Acumul. mortos	Acumul. Vivos	Média	mortalidade, %
400	2,60	10	0,0	35,6	0,0	1,00	100
350	2,54	7,6	2,4	25,6	2,4	0,76	76
300	2,48	5,6	4,6	18,0	6,6	0,56	56
250	2,40	4,0	6,0	12,2	12,6	0,40	40
200	2,30	3,4	6,6	8,2	19,2	0,34	34
150	2,18	3,0	7,0	4,8	26,2	0,30	30
100	2,0	1,8	8,2	1,8	34,4	0,18	18

Número de larvas (n = 10).

Os testes foram realizados em quintuplicata e os valores dos números de indivíduos mortos e indivíduos vivos são resultados de médias aritméticas das cinco repetições.

A CL_{50} estimada foi de 250,61 ($\pm 2,20$) $\mu\text{g mL}^{-1}$

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

De acordo com a Tabela 5.4, a concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ do óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans apresentou a menor atividade larvicida, matando, em média, 1,80 larvas, o que corresponde a 18,0 % de mortalidade. A concentração de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ do óleo essencial testado apresentou a maior atividade larvicida, provocando a morte de 100% dos indivíduos testados, ou seja, 10 larvas. As concentrações intermediárias, 150, 200, 250, 300 e 350, mataram 3,00; 3,40; 4,00; 5,60 e 7,60 larvas, respectivamente, o que corresponde a uma de mortalidade de 30,0; 34,0; 40,0; 56,0 e 76,0%, respectivamente, conforme mostram a Tabela 5.4 e Figura 5.26.

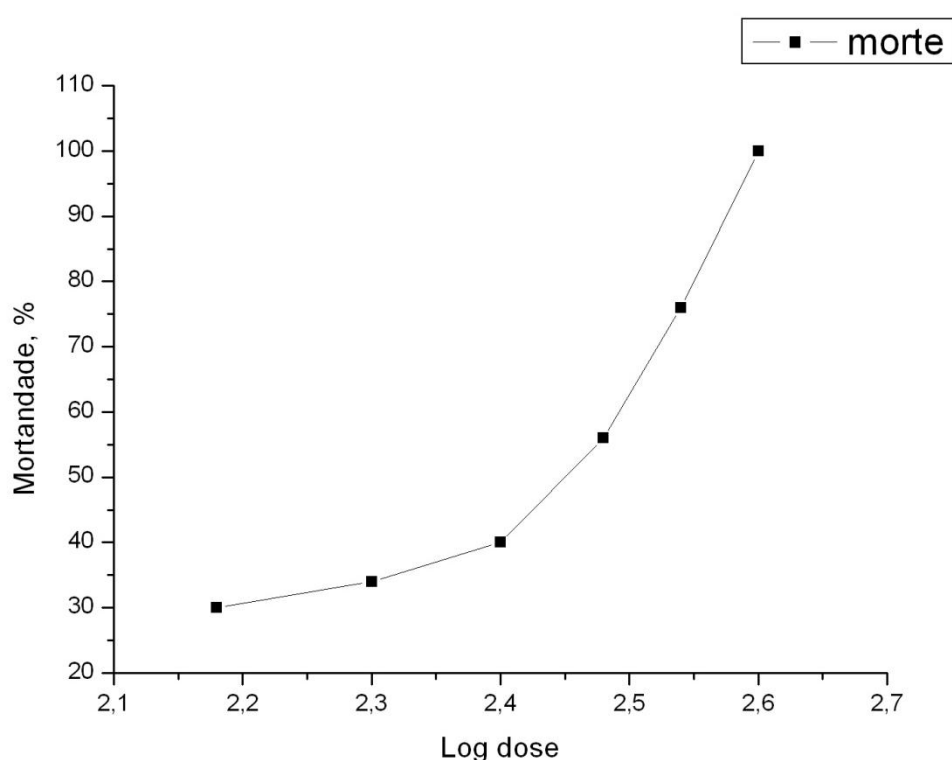


Figura 5.26. Taxa de Mortalidade das larvas do *aedes aegypti*, expostas a sete concentrações diferentes do óleo essencial de *Aniba duckei* Kostermans, após 24 horas, e o logaritmo de cada dose aplicada.

A Figura 5.27 mostra que a concentração letal 50% (LC_{50}), concentração na qual cinquenta por cento dos indivíduos testados morrem, foi encontrada no intervalo entre as concentrações de 250 e $300 \mu\text{g mL}^{-1}$. A dose letal 50% para o óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans foi calculada através da interseção das curvas de indivíduos acumulados mortos e indivíduos acumulados vivos da Figura 3.27, tendo como resultado a

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

concentração de $250,61 \mu\text{g mL}^{-1}$ com um intervalo de confiança de $2,20 \mu\text{g mL}^{-1}$ para mais ou para menos, $\text{LC}_{50} = 250,61 (\pm 2,20) \mu\text{g mL}^{-1}$.

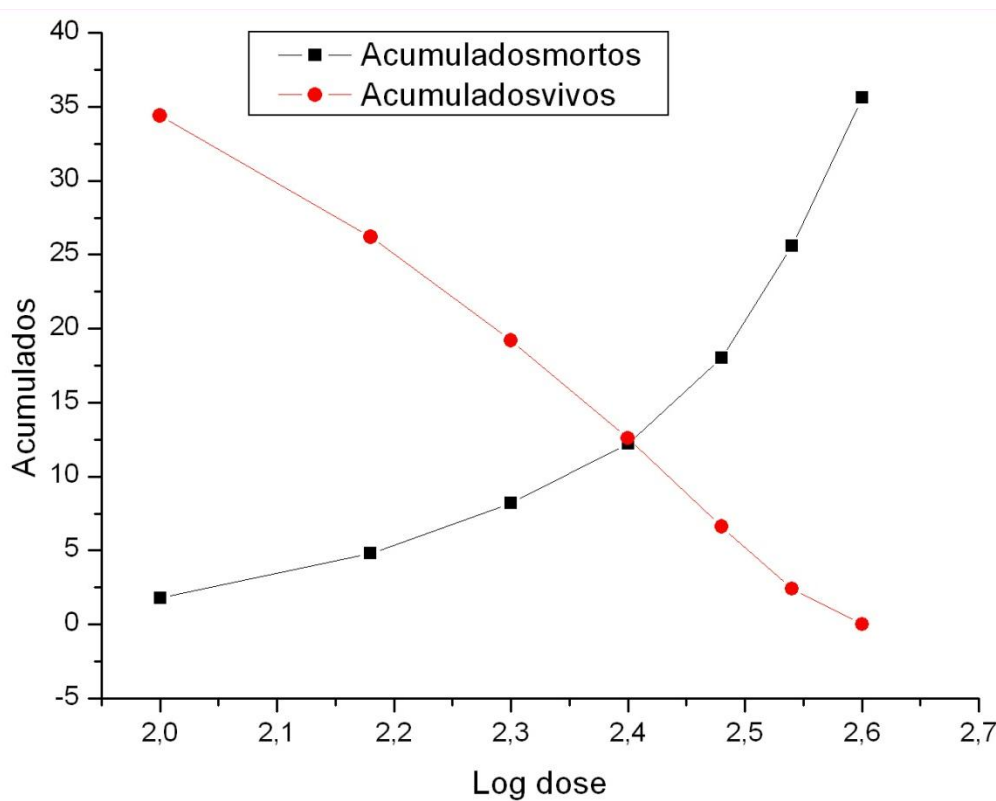


Figura 5.27. Estimativa da LC_{50} do óleo essencial de *Aniba duckei* Kostermans pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A LC_{50} é o ponto de interseção das duas curvas.

Para o padrão de linalol, componente majoritário do óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans, a atividade larvicida foi testada nas mesmas sete concentrações em que o óleo essencial foi testado, a saber: 100, 150, 200, 250, 300, 350 e $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 5.5). O n é o número de larvas do *Aedes aegypti* utilizadas no ensaio larvicida para cada concentração, num total de 10 larvas por ensaio. Os testes foram feitos em quintuplicata para cada concentração. Os dados sobre o número de larvas vivas e de larvas mortas foram encontrados através de uma média das cinco repetições para cada uma das sete concentrações testadas.

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

Tabela 5.5. Mortalidade das larvas do *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição a várias concentrações padrão de dl-linalol.

Dose, $\mu\text{g mL}^{-1}$	log dose	mortos	Vivos	Acumul. mortos	Acumul. vivos	média	mortalidade, %
400	2,60	6,6	3,40	15,40	3,4	0,633	66,0
350	2,54	3,8	6,20	8,80	9,6	0,367	38,7
300	2,48	2,8	7,20	5,0	16,8	0,267	28,0
250	2,40	1,6	8,40	2,20	25,2	0,133	16,0
200	2,30	0,6	9,40	0,60	34,6	0,067	6,0
150	2,18	0,0	10,00	0,0	44,6	0,000	0,0
100	2,00	0,0	10,00	0,0	54,6	0,000	0,0

Número de larvas (n = 10).

Os testes foram realizados em quintuplicata e os valores dos números de indivíduos mortos e indivíduos vivos são resultados de médias aritméticas das cinco repetições.

A CL_{50} estimada foi de $346,73 (\pm 2,14) \mu\text{g mL}^{-1}$

Para o padrão de dl-linalol, as concentrações de 100 e $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ não apresentaram atividade larvicida, ou seja, não mataram nenhuma larva, o que corresponde a 0 % de mortalidade. A concentração linalol $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou a maior atividade larvicida, provocando a morte de 66,0 % dos indivíduos testados, o que representa 6,60 larvas, em média. As concentrações intermediárias, 200, 250, 300 e $350 \mu\text{g mL}^{-1}$, mataram 0,60; 1,60; 2,80 e 3,80 larvas, respectivamente, o que corresponde a uma de mortalidade de 6,0; 16,0; 28,0; e 38,0%, respectivamente (Figura 5.28).

Usando esses valores foi possível calcular a concentração letal 50% para o padrão de linalol (LC_{50}) e o valor encontrado está no intervalo entre as concentrações de 300 e $350 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 5.29), tendo sido o resultado obtido o valor de concentração $346,73 \mu\text{g mL}^{-1}$, com intervalo de confiança de $2,14 \mu\text{g mL}^{-1}$, para mais ou para menos, $LC_{50} = 346,73 (\pm 2,14) \mu\text{g mL}^{-1}$.

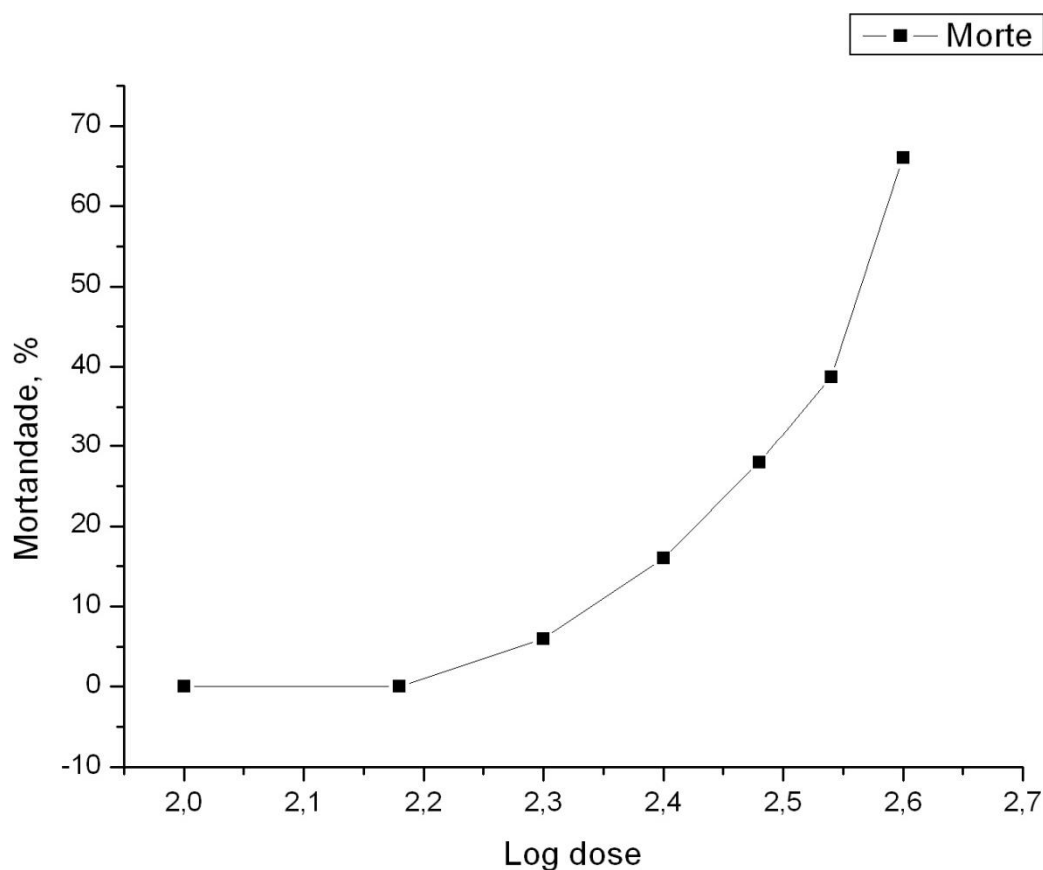


Figura 5.28. Taxa de Mortalidade das larvas do *aedes aegypti* expostas a sete concentrações diferentes do padrão de dl-linalol, após 24 horas.

A Figura 5.29 mostra a estimativa da LC_{50} do dl-linalol pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada, tendo sido a concentração letal 50%, LC_{50} , o ponto de interseção das duas curvas.

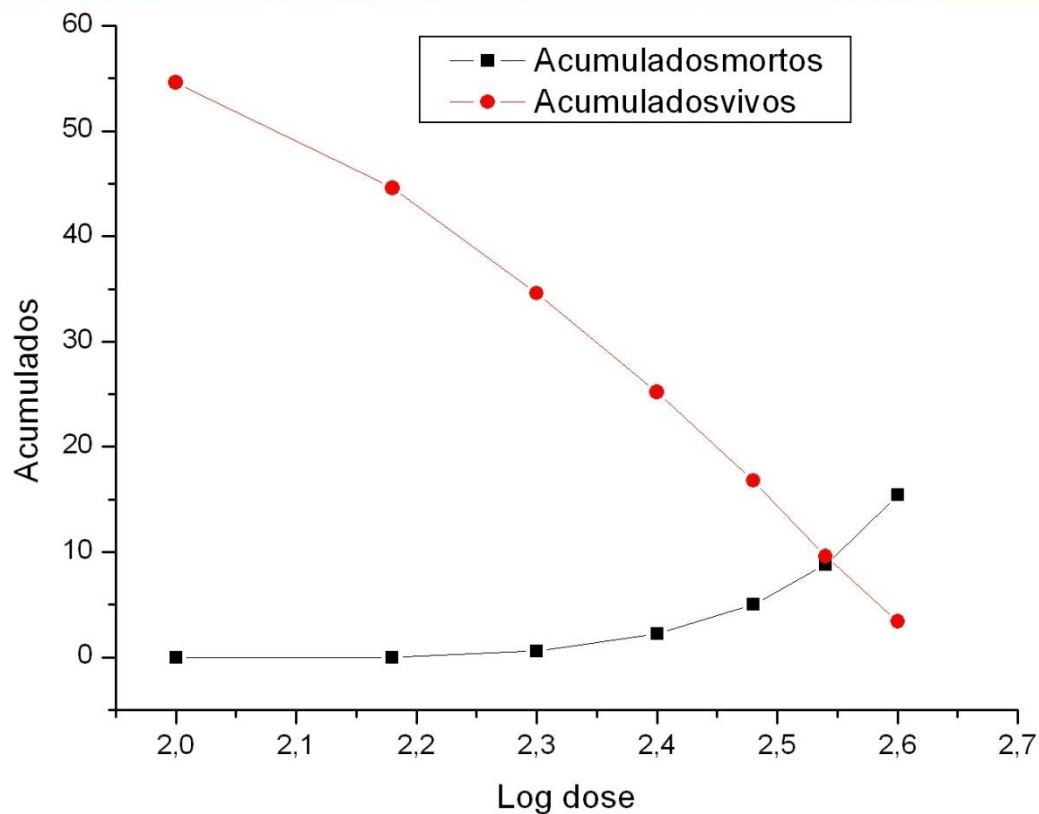


Figura 5.29. Estimativa da LC_{50} do dl-linalol pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A LC_{50} é o ponto de interseção das duas curvas.

A Tabela 5.6 destaca a estimativa do valor da concentração letal 50%, concentração na qual metade das larvas do *Aedes aegypti* morre, LC_{50} , pela ação do padrão de l-linalol, calculado através do método Reed-Muench a partir das concentrações de linalol e do acumulado de larvas mortas e vivas.

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

Tabela 5.6. Estimativa da LC₅₀ do padrão de l-linalol pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas.

Dose, µg mL ⁻¹	log dose	Mortos	Vivos	Acumul. Mortos	Acumul. vivos	média	mortalidade , %
400	2,60	10	0,0	30	0,0	1,00	100
350	2,54	10	0,0	20,0	0,0	1,00	100
300	2,48	4,4	5,6	10,0	5,6	0,44	44
250	2,40	3,4	6,6	5,60	12,2	0,34	34
200	2,30	1,8	8,2	2,20	20,4	0,18	18
150	2,18	0,4	9,6	0,40	30,0	0,04	4
100	2,00	0,0	10,0	0,0	40,0	0,00	0

Número de larvas (n = 10).

Os testes foram realizados em quintuplicata e os valores dos números de indivíduos mortos e indivíduos vivos são resultados de médias aritméticas das cinco repetições.

A CL₅₀ estimada foi de 279,89 (± 2,12) µg mL⁻¹

A Tabela 5.6 traz o teste da atividade larvicida do padrão de l-linalol, em sete concentrações diferentes, as mesmas das amostras anteriores (Tabela 3.5), 100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 µg mL⁻¹, também usando número de larvas do *Aedes aegypti* num total de 10 larvas por ensaio. Os testes também foram feitos em quintuplicata para cada concentração e os dados sobre o número de larvas vivas e de larvas mortas foram encontrados através de uma média das cinco repetições para cada uma das sete concentrações testadas.

Os resultados de logaritmo da concentração em função da porcentagem de larvas mortas para cada concentração mostrados nessa tabela também estão expostos no gráfico da Figura 5.30 a seguir.

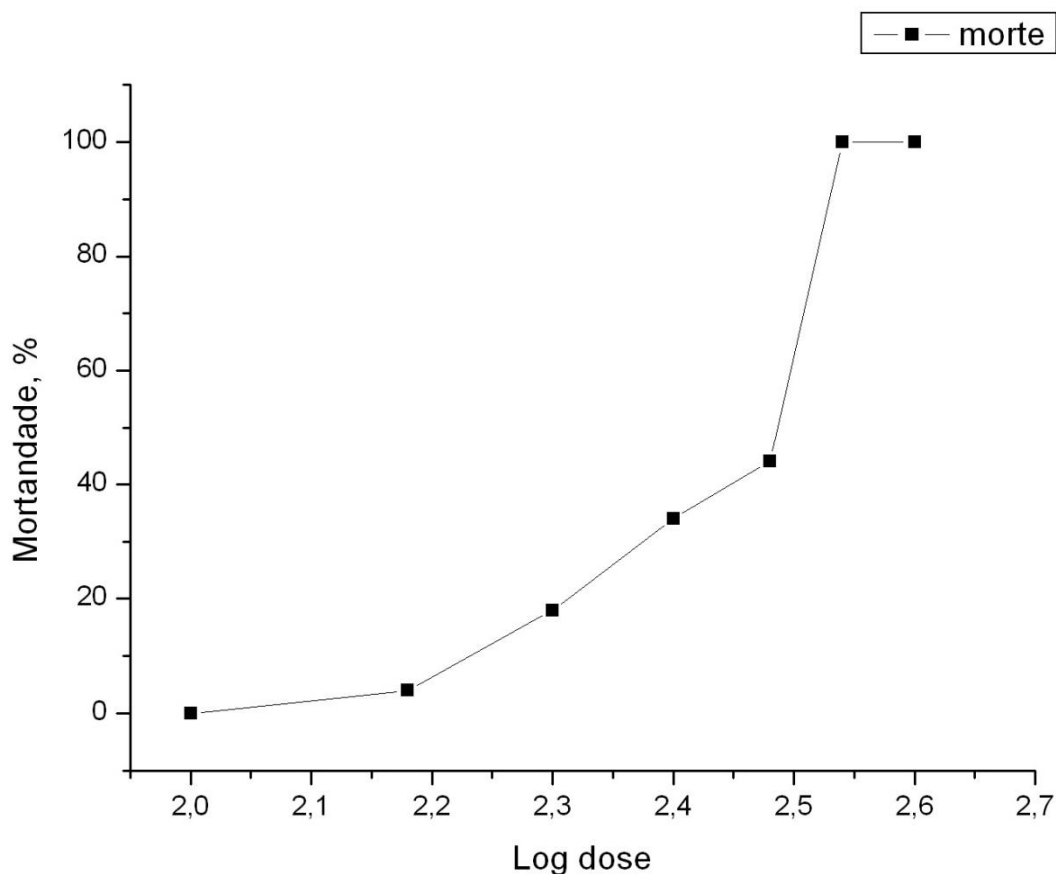


Figura 5.30. Taxa de Mortalidade das larvas do *aedes aegypti* expostas a sete concentrações diferentes do padrão de l-linalol, após 24 horas.

Para o padrão de l-linalol, apenas a concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ não apresentou atividade larvicida, pois não matou nenhuma das dez larvas testadas, o que corresponde a 0% de mortalidade. As concentrações do l-linalol de 350 e $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentaram-se como as de maiores atividades larvicidas, provocando a mortalidade de 100% dos indivíduos testados, ou seja, as dez larvas. Quanto às concentrações intermediárias, a saber: 150; 200; 250 e $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, estas provocaram a morte de 0,40; 1,80; 3,40 e 4,40 larvas, respectivamente, o que corresponde a uma mortalidade de 4; 18; 34 e 44%, respectivamente (Figura 5.30). A concentração letal 50% (LC_{50}) foi encontrada no intervalo entre os valores de concentrações para o padrão de l-linalol 250 e $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ da Figura 3.31, tendo sido essa concentração letal 50% para o l-linalol $279,89 \mu\text{g mL}^{-1}$, com intervalo de confiança de $2,12 \mu\text{g mL}^{-1}$, para mais ou para menos, $\text{LC}_{50} = 279,89 (\pm 2,12) \mu\text{g mL}^{-1}$.

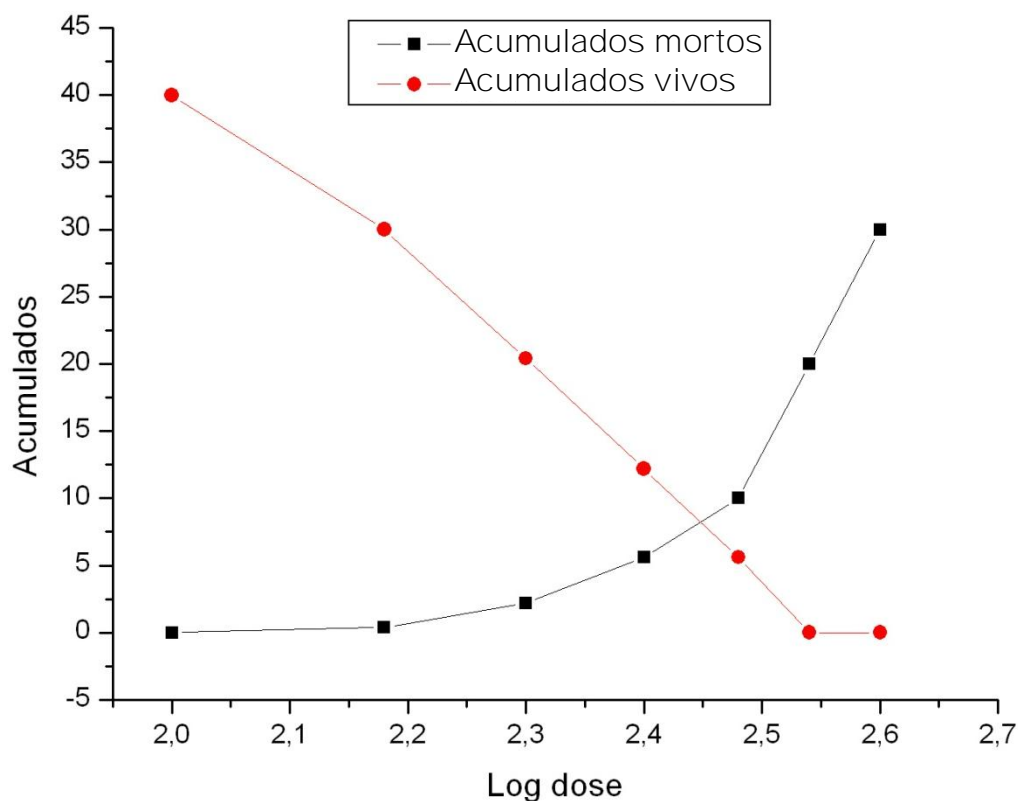


Figura 5.31. Estimativa da LC_{50} do l-linalol pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A LC_{50} é o ponto de interseção das duas curvas.

O óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans bem com os padrões de dl-linalol e l-linalol demonstraram possuir atividade larvicida contra o *Aedes aegypti*. Para qualificar o grau de atividade larvicida do óleo essencial e dos padrões de linalol, serão considerados alguns parâmetros.

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%, para o inseticida organofosforado temefós.

Partindo do princípio de que o óleo essencial é um produto natural e, por tanto, menos nocivo à saúde das pessoas e dos animais domésticos, pode se afirmar que o óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans

poderá ser futuramente usado como larvicida em possíveis locais de crescimento de larvas do *Aedes aegypti*.

Pela análise dos dados da atividade larvicida do óleo essencial e dos padrões de linalol, seu componente majoritário, o que se pode perceber foi que, de um modo geral, o óleo apresentou melhor atividade que os padrões, sobretudo em concentrações mais baixas. Porém o l-linalol matou 100% das larvas em menor concentração, a partir de $350 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que o óleo só atingiu o patamar de 100% em $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o dl-linalol não atingiu esse patamar na faixa de concentração analisada.

Por outro lado, ao se investigar a concentração letal 50% (LC_{50}), concentração na qual cinquenta por cento dos indivíduos testados morrem, percebe-se que quem apresentou melhor atividade larvicida também foi o óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans, $LC_{50} = 250,61 (\pm 2,20) \mu\text{g mL}^{-1}$, contra a LC_{50} de $279,89 (\pm 2,12) \mu\text{g mL}^{-1}$ do l-linalol e $LC_{50} = 346,73 (\pm 2,14) \mu\text{g mL}^{-1}$ para o dl-linalol. Dessa forma, conclui-se que o linalol responsável pela atividade larvicida deve ser o isômero levorrotatório (l-linalol).

Não foi encontrado na literatura informações sobre a atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* para o l-linalol, ao passo que para o dl-linalol, os resultados obtidos estão de acordo com a literatura encontrada, que não atribuem ao linalol um valor da atividade larvicida, mas sim o intervalo maior que $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ($> 100 \mu\text{g L}^{-1}$) (SIMAS et al., 2004).

Atualmente, muitos trabalhos sobre a atividade larvicida de óleos essenciais têm sido publicados, porém quase nenhum discute a relação entre essa atividade e a composição química dos óleos essenciais. Nesse contexto, se insere o trabalho de SIMAS e colaboradores (2004), no qual ficou evidente a importância da lipofilicidade de terpenos para a atividade larvicida em *Aedes aegypti*, quando se comparam monoterpenos e sesquiterpenos de estruturas correlatas. Também, foi observada que a inibição da enzima acetilcolinesterase pelos óleos essenciais tem a ver com a atividade larvicida desses óleos (SILVA, 2006).

A partir do que se expôs, verifica-se que a procura por larvicidas naturais para o *Aedes aegypti*, tem motivado pesquisadores do mundo inteiro a realizar diversos trabalhos e, por tanto, este trabalho é uma contribuição nesse sentido. Conclui-se que o óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans poderá ser futuramente usado como larvicida do *Aedes aegypti*.

Os produtos naturais com esta finalidade diminuem o impacto que atualmente os inseticidas sintéticos causam à saúde da população e ao ambiente. Além disso, a parte da planta para obtenção do óleo essencial usado nessa pesquisa foram galhos finos, e também podem ser usadas folhas, de plantas reflorestadas, o que garante a manutenção da espécie *Aniba duckei* Kostermans longe do risco de extinção.

Por outro lado, uso de produtos químicos, a exemplo do temefós, como base principal do Programa de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa), além de ineficaz, consome enormes recursos e ainda causam danos cujos custos ambientais e sociais não são internalizados nas análises de custo-benefício desses programas. Segundo o Ministério da Saúde, dentre todos os Programas do Ministério voltados para a saúde pública, o PEAa é o que mais gasta recursos. Desta forma, podemos concluir que o programa, além de perigoso é também perdulário (AUGUSTO et al, 1998). Outra importante observação é que o mesmo Programa tem aspectos diferenciados no consumo de Inseticidas, por exemplo, enquanto em Pernambuco são consumidos 87,5 g de inseticida por residência por aplicação, no sudeste o consumo é de 54,0 g e no sul 48,0 g (AUGUSTO e CAMARA NETO, 2007).

Atualmente, o custo de um litro de temefós é praticamente o mesmo valor de um litro de óleo essencial de pau-rosa nas destilarias da Floresta Amazônica, sendo que o temefós comercializado apresenta concentração apenas de um por cento, ao passo que o óleo é puro. Por tanto, no aspecto econômico o uso do óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans é considerado viável e pode se tornar ainda mais em caso de maior demanda.

Por oportuno, ressalta-se que o hidrolato puro do óleo essencial, inclusive das destilarias, poderá ser usado para fins larvicida contra o *Aedes aegypti*, o que daria para este produto uma finalidade, evitando, dessa forma, seu desperdício.

Outro fator a ser considerado é o aspecto social, pois um aumento na produção traria um número maior de empregos para os moradores da Floresta, que poderiam coletar folas e galhos finos de árvores nativas e reflorestadas, poderiam também plantar suas próprias árvores e vender o material vegetal, além de tornarem-se produtores do próprio óleo e vendê-lo diretamente ao Governo.

6 - Conclusão

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram empregadas técnicas que formam um conjunto imprescindível para o estudo analítico de óleos essenciais. Assim, as informações populares, a química de laboratório e a instrumentação analítica se somaram de maneira tornar possível a realização de um trabalho genuíno e original. Os resultados obtidos mostraram a eficiência das técnicas e dos métodos usados. Com as ferramentas disponíveis, foi possível caracterizar o óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans (Pau-rosa) cultivado na Reserva Florestal Adolfo Ducke, Reserva Ducke, do Instituto Nacional para o Progresso da Amazônia (INPA), localiza-se no km 26 da rodovia AM-010 (Manaus – Itacoatiara). Na identificação do componente majoritário e dos demais componentes, bem como suas quantificações, as técnicas foram precisas e os métodos eficientes, proporcionando um bom desempenho analítico nas determinações. Ficou evidenciado, também, que o óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans apresenta atividade larvicida frente ao *aedes aegypti*. Diante dos resultados obtidos conclui-se que:

1. As técnicas espectroscópicas foram eficientes para a confirmação e identificação do linalol como componente majoritário, com teor de 89,34%, e de componentes minoritários no óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans. A espectroscopia na região do infravermelho indicou a presença desses componentes, principalmente pelas vibrações moleculares de seus grupos funcionais contendo oxigênio. A espectrometria de massas mostrou as fragmentações, intensidades e vizinhanças dos picos característicos das moléculas de linalol e dos demais compostos;
2. A análise térmica do óleo essencial, pela técnica de Termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial, abriu um novo caminho para análises de óleos essenciais. Os resultados obtidos foram inéditos para

- o óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans, possibilitando sugerir inclusive a determinação quantitativa de linalol por DSC;
3. O estudo dos métodos de extração do óleo essencial possibilitou verificar os melhores parâmetros para o processo extrativo em função do melhor rendimento e da concentração de linalol;
 4. O presente estudo demonstrou que a espécie *Aniba duckei* Kostermans, forneceu um óleo essencial cujo rendimento foi de 1,93% (m/m), o qual foi considerado de bom valor em relação à extração de outros óleos essenciais de plantas aromáticas;
 5. Os estudos das constantes físicas do óleo essencial apresentaram valores semelhantes aos valores obtidos pela literatura e pelos padrões, usados para as suas comparações;
 6. Os resultados sugerem que o óleo essencial da *Aniba duckei* e do padrão do l-linalol apresentam atividade larvicida contra o *aedes aegypt* mais acentuada que o padrão do dl-linalol sendo que o óleo essencial apresentou melhor LC_{50} , com valor $250,61 (\pm 2,20) \mu\text{g mL}^{-1}$ que seus padrões de l-linalol e dl-linalol, os quais apresentaram valores de LC_{50} , respectivamente iguais a $279,89 (\pm 2,20) \mu\text{g mL}^{-1}$ e $346,73 (\pm 2,14) \mu\text{g mL}^{-1}$. Isso certamente se deve à presença dos componentes minoritários do óleo;
 7. O fato de a atividade larvicida do óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans ter sido melhor que seu componente majoritário, linalol, é atribuído à presença dos componentes minoritários, bem como ao sinergismo entre eles.

7 - Perspectivas Para Trabalhos Futuros

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Realizar a extração do óleo essencial da espécie vegetal *Aniba duckei* Kostermans com fluido supercrítico e verificar possíveis alterações na composição química, no rendimento e propriedades físicas;
2. Relacionar quantitativamente, por DSC, o teor de linalol no óleo essencial em função de sua temperatura de ebulição;
3. Estudar metodologias eletroquímicas para as determinações qualitativas e quantitativas dos outros componentes dos óleos essenciais;
4. Testar o óleo metilado e acetilado como larvicida do *Aedes aegypti* e de outros insetos de interesse.
5. Testar o hidrolato do óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans como larvicida do mosquito *Aedes aegypti*.

8 - Referências Bibliográficas

8 REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4. ed. Linois: Allured Publishing Corporation, 2001, p. 800.

AGNES, S. I. A. Isolamento, caracterização química e avaliação da propriedade inseticida do óleo essencial de *Piper amplum* Kunth. Blumenal, Universidade Regional de Blumenal, 2005. Dissertação de Mestrado, 88p.

ALENCAR, J. C.; FERNANDES. N. P. Desenvolvimento de árvores nativas em ensaios de espécies. Pau-rosa (*Aniba duckei* (Kostermans). *Acta Amazônica*, 8(4): 523-541, 1967.

ALONSO, W.R. RAJAONARIVONY, J. I. M.; GERSHENZON. J. CROTEAU, R. Purification of 4S-limonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha 3 piperita*) and spearmint (*M. spicata*). *J Biol Chem* 267: 7582–7587, 1992.

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

AUGUSTO, L. G. da S.; FREITAS, C. M. O Princípio da Precaução no uso de indicadores de riscos químicos ambientais em saúde do trabalhador. *Revista Ciência & Saúde Coletiva*, 3 (2): 85-95, 1998.

AZEREDO, O. B. Instituto de Óleos, Centro Nacional de Ensino e Pesquisas Agrônômicas, Ministério da Agricultura, *Boletim* 15: 137-208, 1958.

Capítulo 8 – Referências

BALANDRININ, M. F.; KLOCKER, J. A.; WURTTELES, E. S. Natural plant chemical-source of industrial and medicinal materials. *Science*, 228: 1154-1160, 1985.

BARROSO, G. M. Sistemática das angiospermas do brasil. São Paulo: EDUSP, 1978. 255p. v. 1

BELL, E. A. Et al. Secondary plant products. Berlin: Springer, 1980 p. 1-10.

BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T.; CAVALHEIRO, E. T. G. Influência de Alguns Parâmetros Experimentais nos Resultados de Análises Calorimétricas Diferenciais – DSC. *Química Nova*, 25(5): 849-855, 2002.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Programa Nacional de Controle da Dengue – PNCD. Brasília, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Programa Nacional de Controle da Dengue – PNCD. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.combatadengue.com.br/noticiasDetalhe.php?idnoticia=248> . Acesso em 20/11/2008.

BRASIL. MS-FNS (Ministério da Saúde-Fundação Nacional de Saúde), 2002. Programa Nacional de Controle do Dengue. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde.

BRASIL. MS-SVS (Ministério da Saúde-Secretaria de Vigilância em Saúde). Dengue-Boletim Eletrônico Epidemiológico 03/2003. Disponível na Internet: <dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/boletim_eletronico_epi/boletim_eletronico_epi_0303.pdf>.

BRASIL.Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Dengue - Manual de Normas Técnicas, Instrução para pessoal de combate ao vetor. Brasília, 2001. 83p.

BRASIL.MS-FNS (Ministério da Saúde-Fundação Nacional de Saúde). Manual de Dengue - Vigilância Epidemiológica e Atenção ao Doente. Brasília: Departamento de Operações - Coordenação de Controle de Doenças Transmitidas por Vetores, Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, 1996.

BURKE, C. C; WILUNG, M. R.; CROTEAU, R. Geranyl diphosphate synthase: cloning expression and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. Proc Natl Acad Sci USA 96: 13062– 13067, 1999.

BUSTAMANTE, M. F. L. Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y processado. 4. ed. Madri: Mundi-Pensa, 2000. 365 p.

CAVALHEIRO, É. T. G.; CHAAR, J. S.; MOUCHREK FILHO, V.E.; BREVIGLIERI, S. T.; CHIERICE, G. O. Boiling Temperature and enthalpy changes of essential oil using capillary glass sample holder. Journal of Thermal Analysis, 75: 437-443, 2004.

CHAAR, J da S. *Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie Aniba duckei kostermans*. São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, USP, 2000. Tese de Doutorado.

CHENG, S. S.; CHUA, M-T; CHANG, E.H.; HUANG, C-G; CHEN, W-J.; CHANG, S-T. Variations in insecticidal activity and chemical compositions of leaf essential oils from *Cryptomeria japonica* at different ages. Bioresour.Technol. (2008),doi:10.1016/j.biortech.2007.11.060.

CLAY, J. W.; CLEMENT, C.R. Selected species and strategies to enhance income generation from amazonian forest. Roma: FAO, 1993.

Capítulo 8 – Referências

COELHO, A. A. M. *Análise inseticida de extratos de plantas do bioma do cerrado sobre triatomíneas e larvas de Aedes aegypti*. Brasília-DF, UnB, 2006. Dissertação de Mestrado. 90p.

COE-TEIXEIRA, B. Lauráceas do gênero *Ocotea* do estado de São Paulo. *Rodriguésia*, 32 (52): 55-190, 1980.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination*. CRC Press. Boca Raton. Ann Arbor London, Tokyo. 1993. 528p.

CORREA, D. B; GOTTILIEB, O. R. DUCKEIN, N.A. Alkaloid from *Aniba duckei*. *Phytochemistry*, 14: 271-272, 1975.

COSTA, A. F. *Farmacognosia*. 5. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1994. V.1. 1031p.

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

CRAVEIRO, A. A. .; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J. de A.; ALENCAR, J.W. de e MACHADO, M.I.L.. Óleos essenciais de plantas do nordeste. Fortaleza: EUFC, 1981. 210p.

CUNHA, L. N. *Influência sazonal no teor de linalol contido no óleo essencial da espécie aniba duckei kostermans plantada em ambiente natural*. Manaus, UFAM, 2002. Dissertação de Mestrado. 132p.

DANTAS, M. B. *Obtenção, Caracterização e Estudo Termoanalítico de Biodiesel de Milho (Zea mays L.)*. João Pessoa, UFPB, 2006. Dissertação de Mestrado. 114 p.

DORMAN, H. J, D; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of pant voçatile oils. *Jornal of Applied Microbiology*, New York, 88: 308-316, 2000.

DUCKE, A. Lauráceas aromáticas do Amazonas. *Reunião Sul americana de Botânica*, 3:55-74, 1938.

DUCKE, S. O. ; CANEL, C.; RIMANDO, A.M.; TELLEZ, M.R.; DUCKE, M. V.; PAUL, R.N. Current and Potential Exploitation of Plant Glandular Trichome Productivity. *Academic Press, San Diego*, 31: 121–151, 2000.

DUSSOURD, D. E. HOYLE, A. M. Poisoned plusiines: toxicity of milkweed Terpene Biosynthesis in Basil Glandular Trichomes latex and cardenolides to some generalist caterpillars. *Chemoecology*, 10: 11–16, 2000.

FERREIRA, J. T. B.; CORRÊA, A.G.; VIEIRA, P.C. Produtos naturais no controle de insetos. São Carlos, Ed. UFSCar, 2001. V 3.

FIGUEIREDO, L. T. M., Cavalcante, S.M.B. & Simões, M.C.. A Dengue serologic survey of school children in Rio de Janeiro, Brazil, 1986 and 1987. *Bulletin of the Pan-American Health Organization*, 24:217-225, 1990.

FORATTINI, O. P. Identificação, biologia, epidemiologia. In: *Culicidologia Médica*. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, 2002. v. 2.

FUH, M. R.; PAN, W.H.; HSIEH, I.J.; CHUO, C.-M.. Preparative-scale supercritical-fluid extraction of essential oils from *Syzygium aromaticum* (Clove bud). *Int-Lab.*, p. 26, 1996.

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

GANLIM, C.D.; DUTTA, N.K.; ROY CHOUDHURY, N.; KEHOE, D. & MATISONS, J. Evaluation of Kinetic Parameters of Thermal Oxidative Decomposition of Base Oils by Conventional, Isothermal and Modulated TGA, and Pressure DSC. *Thermochimica Acta*, 392 (2002) 357-369.

GERSHENZOM, J.; MAFFEI, M; CROTEAU, R. Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*). *Plant Physiol* 89: 1351–1357, 1989;

GIOLITO, I. Algumas aplicações da Análise Térmica. *Revista de Química Industrial*, 12: 663-671, 1988.

GONÇALVES, M. L. A.; TEIXEIRA, A. M. R.; TEIXEIRA, M. A. G. Aplicabilidade de Técnicas Termogravimétricas a Estudos de Pirólise de Resíduos de Petróleos Nacionais. In: Anais do 2o Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás. Rio de Janeiro: 2003, CD.

GUBLER, D. J. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease-control in the 1990s – top down or bottom up. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40: 571-578, 1989.

HALSTEAD, S. B. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: GUBLER, D. J. E KUNO, G. (Ed.). *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York: CAB International, 1997.

HARBONE, J. B. *Ecological Biochemistry*. 4. ed. Londres: Academic, 1993.

HOMMA, A. K. O. O Extrativismo Do Óleo Essencial De Pau-Rosa Na Amazônia. Anais do XLIII Congresso da SOBER. Ribeirão Preto-São Paulo, 2005.

IJIMA, Y.; DAVIDOVICH-RIKANATI, R.; FRIDMAN, E.; GANG, D.R. Biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpene and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of basil. *Plant Physiology*, 136: 3724-3736, 2004.

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. Nomenclatura, Padrões e Apresentação ds Resultados em Análise Térmica. *Cerâmica*, 26(121): 17, 1980.

KELSEY, R. G.; REYNOLDS, G. W.; RODRIGUEZ, E. Em *biology and chemistry of plant trichomes*; Rodriguez, E.; Healey, P. L.; Mehta, I., eds.; Plenum Press: New York, 1984.

KNOBLOCK, K. O. LATTE, K.P. KIDERLEN. A. *Basic life science*, 66:575, 1999.

KOPPENHOEFER, B.; BEHNISH, R.; EPPERLEIN, U.; HOLZSCHUH, H.; BERNREUTHER, A. Enantiomeric odor differences and gas chromatographic properties of flavors and fragrances. *Perfumer and Flavorist*, 19: 1-14, 1994.

KUNO, G. Review of the Factors Modulating Dengue Transmission. *Epidemiology Reviews*, 17:321-335, 1995.

LE MOS, T. L. G.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; MATOS, F.J.; CLARCK, A.M.; MACCHESNEY, J.D. Antimicrobial ativity of essential oils of brasilian plants. *Phytotherapy Research.*, 4: 82-84, 1990.

LICHTENEHALER, H K.; SCHWENDER, J.; DISCH, A.; ROHMER, M. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* 400: 271–274, 1997.

LIMA, E. de O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In *Plantas Medicinais sob a ótica química da medicina moderna*. Org.: YUNES, R. A.; CALLIXTO, J. B. Ed. Argos, Chapecó-SC, 2001.

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

Capítulo 8 – Referências

LIMA, R. C. *Caracterização Química e Bioatividade do Óleo Essencial de Folhas de Goiabeira Sobre a Lagarta-do-Cartucho do Milho*. UFL, Lavras-MG, 2006. Dissertação de Mestrado. 57 p.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Quim. Nova*, 27(4): 670-673, 2004.

MACKENZIE, R.C.; Differential Thermal Analysis. *Thermochimica Acta*, 92:3, 1984

MAIA, J. G. S. *Plantas aromáticas na amazônia e seus óleos essenciais*. Belém-PA: Museu Paraense Emílio Goedi, 2000. 180p.

MARTINS, G. N. N.; SILVA, F.; SILVA, R. F.; PARK, K. J.; MAGALHÃES, P. M. Efeito pré-tratamento pré-germinativos em sementes de *Chenopodium ambrosoides* L. In: *Simposio de Plantas Medicinais do Brasil*, 18, 2004, Manaus. Resumos...Manaus, AM, p.294, 2004.

McCASKILL, D.; CROTEAU, R. Prospects for the bioengineering of isoprenoid biosynthesis. *Advances Biochem Engin Biotechnol* 55: 102–146, 1999

McCONKEY, M. E.; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R.B. Developmental Regulation of Monoterpene Biosynthesis in the Glandular Trichomes of Peppermint. *Plant Physiology*, 122: 215–223, 2000.

MERK, *The Merk Index*, S. Budavari (Ed.), 12th Ed., Merk and Co., Whitehouse Station, 1996.

MESSER, W. B.; Gubler, D. J. Emergence and Global Spread of Dengue Serotype 3 Subtype III. *Emerging infectious diseases*, 7:800-809, 2003.

MING, L.C. Estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia. *Horticultura Brasileira*, 12,p.3-9,1994.

MISTHER, L. A.; DRAKE, S.; GOLLAPUDI, S. K. *Journal of Natural Products*, 50: 1025, 1987.

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, IQSC-USP, 2000. Tese de Doutorado. 124p.

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

NAMARA, K. M.; HOWELL, J.; HUANG, Y.; ROBBAT Jr, A. J. Analysis of gin essential oil mixtures by multidimensional and one-dimensional gas chromatography/mass spectrometry with spectral deconvolution. *Chromatography A*, 1164: 281-290, 2007.

NEVES, D. P.; SILVA, J. E. da. *Entomologia Médica: comportamento, captura, montagem.* COOPEMED, 1995. 112p.

NOVÁK, C. FERNANDEZ, L. ÉHEN, Z. MOURA, T.F. e SZTATIZ. J. Characterization of *Lippia sidoides* oil extract- α -cyclodextrin complexes using combined thermoanalytical techniques. *Journal of Thermal Analysis*, 78: 557-573, 2004.

OPAS (Organización Panamericana de la Salud). *Dengue y Dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control.* Washington: Organización Panamericana de la Salud , 1995.

OPAS (Organización Panamericana de la Salud). *Resurgimiento del Dengue en las Américas*, *Boletín Epidemiológico*, 2:1-16, 1997

PARE, PW, TUMLINSON J.H. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol* 121: 325–332, (1999).

Capítulo 8 – Referências

PIZZI, M. Sampling variation of the fifty percent end-point, Determined by the Reed-Muench (Behrens) method. *Hum. Biol.* 22, 151–190, 1950.

RAOUL, D. *Estude biographique et critique*. Genebra: Skira, 1953.120p.

REBÊLO, J.M.M. et al. Distribuição de aedes aegypti e do Dengue no Estado do Maranhão, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, 15(3): 477-486, 1999.

REY, L. *Bases da parasitologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 349p.

SAMPAIO, P. T.; FERRAZ, I. D. K.; CAMARGO, J. L. C.; Pau-rosa: *Aniba roseadora* Ducke. In.: *Manual de Sementes da Amazônia*. Fascículo 3. INPA, Manaus-AM, 2003.

SAMPAIO, P. T. B. Pau-rosa (*Aniba roseadora* Ducke). PP 290-297 In Cay, J. W; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. R. (Eds.). *Biodiversidade Amazônica, exemplos e estratégias de utilização*. INPA-Sebrae. Manaus, 2000.

SAMPAIO, P. T. B.; BARBOSA, A; VIEIRA, G. Canopy sprouting biomass of rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) in an Amazonian terra firme forest. *Acta Amaz.*, 35(4): 491-494, 2005.

SANTOS, J. C. O. *Estudo Termoanalítico e Cinético da Degradação Térmica de Óleos Lubrificantes Automotivos*. João Pessoa: UFPB, 2004. Tese de Doutorado. 200p.

SANTOS, J. C. O. *Parâmetros Termoanalíticos, Cinéticos e Reológicos de Óleos Comestíveis Comercias*. João Pessoa: UFPB, 2001. Dissertação de Mestrado. 200p.

SANTOS, J. C. O.; SOUZA, A. G.; SANTOS, A. V. Thermal Analysis in Quality Control of the Olive Oil. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75 (13) 23-25, 2000.

SIANI, A. C. Desenvolvimento Tecnológico de Fitoterápicos – Plataforma metodológica. Rio de Janeiro: Scriptório, 2003, 97p.

SIANI, A. C. MONTEIRO, S. S. RAMOS, M. C. K. V. AQUINO-NETO, F. R. Variabilidade química do linalol no óleo essencial de *Aeollantus suaveolens* (Lamiaceae). *Fitos*, 1(2): 59-63, 2005.

SIANI, A. C. SAMPAIO, A. L. F. SOUZA, M. C. HENRIQUES, M. G. M. O. RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais, biotecnologia ciência e desenvolvimento, 1999. 38-42.

SIANI, A. C.; TAPPPIN, M. R. R.; RAMOS, M. F. S; RAMOS, M. C. K. V; AQUINO-NETO, F. R.; FRIGUETO, N. Linalool from *Lippia Alba*: Study of the reproducibility of the Essential Oil Profile and the Enantiomeric Purity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50: 3518-3521, 2003

SILVA, F.; CASALI, V. W. D. Plantas Medicinais e aromáticas: Pós colheita e óleos essenciais. Viçosa: artes e livros, 2000. 135p.

SILVA, W. J. *Atividade Larvicida de Óleos Essenciais de Plantas existentes no Estado de Sergipe contra Aedes aegypti*. São Cristóvão, UFSE, 2006. Dissertação de mestrado 69p.

SILVA, W. J.; DORIA, 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, Livros Técnicos e Científicos S.A., 2007. 490p.

Capítulo 8 – Referências

SIMAS, N. K.; LIMA, E. da C.; CONCEIÇÃO, S. da R. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilterpenóides. *Química Nova*, 27(1): 46-49, 2004.

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, 2007. 821p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Principles of instrumental analysis*. 5. ed. São Paulo, Freeman, 2002.

SPIRONELLO, W. R.; SAMPAIO, P. T.; RONCHI-TELES, B. Produção e predação de frutos em *Aniba rosaeodora* Ducke var. *amazonica* Ducke (Lauraceae) em sistema de plantio sob floresta de terra firme na Amazônia Central. *Acta bot. bras.* 18: 801-807, 2004.

SUDAM. O extrativismo do pau-Rosa (*Aniba duckei* Kosterm. – *Aniba roseadora* Duckei). Aspectos sócio-econômicos, a silvicultura da espécie. *SUDAM documenta*, Belém, v. 3, n. 1/4., p. 5-55, 1971.

SUDAM. O extrativismo do Pau-rosa, *SUDAM Documentos Amazônicos*, 1972, 5-55.

TELES, R. M, *Estudo Analítico do linalol contido no óleo essencial extraído de galhos da espécie Aniba duckei K e sua aplicação como agente bactericida*. São Luís, UFMA, 2003. Dissertação de Mestrado. 99p.

WENDLANT, W. W. *Thermal Analysis*. in: *Chemical Analysis*. 3. ed; Elwin, P.J. and WINIFORDNER, J.D.; Editors, New York: John Willey, 1986. V. 19

WERFF, H.; RICHTER, H. G. Toward and improved classification of Lauraceae. *Annals of Missouri Botanical garden*. 8: 419 – 432, 1996.

WHITE, R. Fourier transform infrared spectroscopy and its applications. New York: Marcel Dkker, 1990.

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

BELAICHE, J.; MEUWIS, M.A.; DESENY, D.; FILLET,M.; GEURTS, P.; WEHENKEL, L.; LOUIS, L.; MERVILLE, M.P. Proteomics Using Seldi-TOF-MS for the Diagnosis of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. Acta Enterologica Belgica. 8: D38, 2005.