



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

TESE DE DOUTORADO

ESTUDO QUÍMICO, AVALIAÇÃO ELETROQUÍMICA E ATIVIDADE
LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DA
Pimenta dioica LINDL FRENTE *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

SILVIO CARVALHO MARINHO

João Pessoa - PB - Brasil

Maio/2010



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

TESE DE DOUTORADO

ESTUDO QUÍMICO, AVALIAÇÃO ELETROQUÍMICA E ATIVIDADE
LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DA
Pimenta dioica Lindl FRENTE *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

SILVIO CARVALHO MARINHO*

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Química da UFPB como parte
dos requisitos para obtenção do grau de
Doutor em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho
2º Orientador: Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza

*Bolsista (FAPEMA)

João Pessoa - PB - Brasil
Maio/2010

M338e Marinho, Silvio Carvalho.

Estudo químico, avaliação eletroquímica e atividade larvívica do óleo essencial das folhas da Pimenta dióica Lindl frente Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) / Silvio Carvalho Marinho.- João Pessoa, 2010.

125f. : il.

Orientador: Victor Elias Mouchrek Filho

Co-orientador: Antônio Gouveia de Souza

Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN

1. Óleo essencial. 2. Pimenta dióica. 3. Eugenol. 3.

Atividade larvívica – aedes aegypti.

UFPB/BC

CDU: 665-947.8(043)

Dedico este trabalho:

A Deus. Único Ser capaz de nos proteger a todo e qualquer instante, sempre nos dando forças nas horas mais difíceis e me presenteando com a FAMÍLIA que tanto amo:

Meu pai *Manoel Marinho Neto*, que não mediu esforços para a educação e bem-estar de seus filhos e que por isso, e tantas outras coisas, tornou este momento realidade...

Minha mãe *Maria da Graça Carvalho Marinho* que me amparou a vida inteira e continua a apoiar com todo o carinho, exemplificando que amor de mãe não tem limites.

Meus irmãos: *Samara, Sandro, Samarone* e *Samuel*... Pedacos representativos da minha vida; dos meus conhecimentos, das minhas emoções e das minhas lembranças... Onde quer que eu esteja ou vá...

"A vida é apenas uma gota na perspectiva da eternidade.

Viva cada minuto como um momento inesquecível.

Não deixe o medo ser seu mestre. O medo é um péssimo matemático.

Ele sempre aumenta e distorce a realidade..."

Augusto Jorge Cury

AGRADECIMENTOS

Primordialmente, a Deus, responsável pelo dom de viver e por este momento supremo em minha vida.

Aos meus pais, Manoel e Graça, por terem mérito maior pelo que hoje sou; por me compreenderem e me apoiarem em todas as circunstâncias.

Aos meus amados irmãos, irmãs, sobrinhos, primos, primas, tios, tias, avôs e avós (*in memoriam*)... À família que contribuiu e tanto contribui para a minha formação.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho, orientador que com total dedicação e competência transmitiu com maestria os ensinamentos e segurança, necessários para a realização desta Tese.

Ao Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza, pela firmeza e confiança que deposita em seus alunos.

À Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento pela amizade que nos une. Também, pela convivência descontraída, ensinamentos e ajuda prestada.

Ao Dr. João Mouchrek pela amizade, grande incentivo e pelo exemplo de competência, demonstrando que na vida, com simplicidade encontramos pessoas realmente essenciais.

Ao amigo Gustavo Monteiro pelo apoio decisivo na fase final de elaboração da tese: obrigado pelo grande companheirismo!

Aos amigos dos Laboratórios de Microbiologia e de Bromatologia do PCQA e a todos do Pavilhão Tecnológico da UFMA, especialmente à minha amiga Marlucy pelos cuidados e atenção dispensada.

Aos colegas e amigos do curso de Doutorado da UFPB, pelo incentivo e companheirismo, em particular a Odair, Rogério, Joelkson, Nestor, Manacés e Vera.

A todos do Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM) da UFPB, pela ajuda essencial durante o Doutorado, especialmente ao Dr. Marcos Antonio Feitosa de Souza.

Aos professores e funcionários da Pós-Graduação em Química da UFPB, carinhosamente pela presteza com que sempre realizaram os seus trabalhos, especialmente o grande Marcos Pequeno.

Aos amigos e colegas do SESI, SENAI, IEL e da Federação das Indústrias do Estado do Maranhão (FIEMA), pelo apoio constante e senso de amizade verdadeira.

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

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix

CAPÍTULO 1

1 - INTRODUÇÃO	2
----------------------	---

CAPÍTULO 2

2 - REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 - CONSIDERAÇÕES SOBRE ÓLEOS ESSENCIAIS.....	6
2.2 - <i>Pimenta dioica</i> Lindl	10
2.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	14
2.3.1 - Cromatografia Gasosa (CG).....	15
2.3.2 - Espectroscopia na Região do Ultravioleta (UV)	15
2.3.3 - Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV)	16
2.3.4 - Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (CG-EM).....	17
2.3.5 - Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN ¹³ C).....	18
2.3.6 - Voltametria Cíclica (VC)	19
2.4 - ANÁLISE TÉRMICA.....	20
2.4.1 - Termogravimetria (TG)	21
2.4.2 - Análise Térmica Diferencial (DTA)	22
2.5 - ASPECTOS SOBRE O <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	23
2.5.1 - Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	25

CAPÍTULO 3

3 - OBJETIVOS.....	29
3.1 - GERAL	29
3.2 - ESPECÍFICOS.....	29

CAPÍTULO 4

4 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	31
4.1 - OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	31
4.1.1 - Origem, Coleta e Preparo da Amostra Botânica.....	31
4.1.2 - Extração do óleo essencial	32
4.1.3 - Avaliação da Cinética de Extração do Óleo Essencial	32
4.2 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	33
4.2.1 - Densidade.....	33
4.2.2 - Solubilidade em etanol (70%)	33
4.2.3 - Índice de refração.....	34
4.2.4 - Cor e Aparência	34
4.3 - ANÁLISES QUÍMICAS.....	34
4.3.1 - Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	35
4.3.2 - Quantificação por Espectrofotometria no UV-Vis.....	35
4.3.3 - Análise Espectrométrica Vibracional na Região do Infravermelho.....	36
4.3.4 - Análise Espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C	36
4.3.5 - Determinações Voltamétricas	36
4.3.5.1 - Quantificação por Voltametria Cíclica	37
4.3.6 - Padrão.....	38
4.4 - ANÁLISE TÉRMICA.....	38
4.5 - OBTENÇÃO E CULTIVO DAS LARVAS	39
4.6 - TESTE DE TOXICIDADE	40
4.6.1 - Análise Estatística	41

CAPÍTULO 5

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 - EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	44
5.1.1 - Cinética	44
5.1.2 - Rendimento.....	45
5.2 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	46
5.3 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	47
5.3.1 - Análises espectrofotométricas do óleo essencial.....	47
5.3.1.1 - Análise Espectroeletrônica na Região do Ultravioleta.....	47
5.3.1.2 - Análise Espectrométrica Vibracional na Região do Infravermelho	49
5.3.1.3 - Análise por Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C.....	52
5.3.2 - Análise por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas	55
5.3.3 - Análise por Voltametria Cíclica.....	66
5.3.4 - Quantificação de eugenol	69
5.3.4.1 - Quantificação por Cromatografia Gasosa	69
5.3.4.2 - Quantificação por Espectrometria na Região UV	71
5.3.4.3 - Quantificação por Voltametria Cíclica	72
5.3.5 - Comparação entre os Métodos e Técnicas Utilizados para a Quantificação do Eugenol.....	73
5.4 - ANÁLISE TÉRMICA.....	74
5.5 - ATIVIDADE LARVICIDA	75

CAPÍTULO 6

6 - CONCLUSÃO	86
---------------------	----

CAPÍTULO 7

7 - PERSPECTIVAS FUTURAS.....	89
-------------------------------	----

CAPÍTULO 8

8 - REFERÊNCIAS.....	91
----------------------	----

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ε	Absortividade molar
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda (nm) de absorção máxima
δ	Deslocamento químico
Ag/AgCl	Eletrodo prata/Cloreto de prata
ASTM	American Society for Testing and Materials/ Sociedade Americana para Ensaio de Materiais
BR	Britton-Robinson
CG	Cromatografia Gasosa
CL ₅₀	Concentração Letal 50%
DSC	Differential Scanning Calorimetry/Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Diferential Thermal Analysis/Análise Térmica Diferencial
DTG	Differential Thermal Gravimetry/Termogravimetria Derivada
EM	Espectrometria de Massas
ESC	Eletrodo Saturado de Calomelano
eV	Elétron-Volt
FID	Detector de Ionização de Chamas
FUNASA	Fundação Nacional da Saúde
ICTA	International Confederation of Thermal Analysis and Calorimetry/ Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria
IE	Impacto de elétrons
I _{pa}	Corrente de pico anódico
I _{pc}	Corrente de pico catódico
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry/União Internacional de Química Pura e Aplicada
IV	Infravermelho
m/z	Relação carga-massa
M ⁺	Íon molecular

mV	milivolts
ND ^{25°}	Índice de Refração a 25°C
nm	nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
ppm	Partes por Milhão
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
SE	Erro padrão
TG/TGA	Termogravimetria
TMS	Tetrametil-silano
UV	Ultravioleta
v	Velocidade de Varredura do Potencial
V	Volts
VC	Voltametria Cíclica
µg	Micrograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. <i>Pimenta dioica</i> Lindl: árvore, frutos e folhas.....	11
Figura 2.2. Fórmula estrutural do eugenol.....	12
Figura 2.3. Mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	23
Figura 2.4. Distribuição do <i>Aedes aegypti</i> no mundo em 2009: países ou áreas de risco.....	24
Figura 2.5. Ovos do <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	26
Figura 2.6. Larvas do <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	26
Figura 2.7. Pupa do <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	27
Figura 4.8. Diagrama esquemático da célula eletroquímica.....	37
Figura 4.9. Armadilha utilizada para a coleta dos ovos do <i>Aedes aegypti</i>	39
Figura 4.10. Larvas do <i>Aedes aegypti</i> em terceiro estágio.....	41
Figura 5.11. Rendimento de extração do óleo essencial pela variação do tempo de extração, com massa de amostra de 30g e temperatura de 100°C.....	44
Figura 5.12. Espectros de absorção no UV: (A) Óleo essencial de <i>Pimenta dioica</i> Lindl (20µL/10mL) e (B) padrão de eugenol a $2,56 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹	48
Figura 5.13. Espectros na região do infravermelho: (A) Padrão de eugenol. (B) óleo essencial de <i>Pimenta dioica</i> Lindl.....	50
Figura 5.14. Espectros de RMN ¹³ C: (A) Padrão de eugenol. (B) Óleo essencial das folhas da <i>Pimenta dioica</i>	53
Figura 5.15. Cromatograma do óleo essencial das folhas da <i>Pimenta dioica</i> Lindl.	55

Figura 5.16. (A) Espectro de massas do pico cromatográfico de eugenol do óleo essencial das folhas da <i>Pimenta dioica</i> Lindl. (B) Proposta de identificação pela espectroteca NIST02.	56
Figura 5.17. Fragmentação do eugenol e formação dos picos característicos.	57
Figura 5.18. Espectros de massas: (A) Composto do pico 2 do cromatograma da Figura 5.15. (B) Propostas de identificação através da espectroteca NIST02.	59
Figura 5.19. Espectros de massas: (A) Composto do pico 4 do cromatograma da Figura 5.15. (B) Propostas de identificação através da espectroteca NIST02.	60
Figura 5.20. Espectros de massas: (A) Composto do pico 5 do cromatograma da Figura 5.15. (B) Propostas de identificação através da espectroteca NIST02.	61
Figura 5.21. Fragmentação tipo reação <i>retro</i> -Diels-Alder do composto limoneno.	62
Figura 5.22. Espectros de massas: (A) Composto do pico 6 do cromatograma da Figura 5.15. (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.	63
Figura 5.23. Espectros de massas: (A) Composto do pico 9 do cromatograma da Figura 5.15. (B) Propostas de identificação através da espectroteca NIST02.	64
Figura 5.24. Espectros de massas: (A) Composto do pico 16 do cromatograma da Figura 5.15. (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.	65
Figura 5.25. (A) Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo recém polido. (B) Voltamograma cíclico do óleo essencial registrado em eletrólito suporte (etanol/tampão a 60 %), pH 3,3; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	66

- Figura 5.26. Dependência da corrente de pico da onda I/I' com a raiz quadrada da velocidade de varredura do potencial.....67
- Figura 5.27. (A) Voltamograma cíclico do eugenol em função do pH, alterado por adição de 1 mol L^{-1} de NaOH. A velocidade de varredura do potencial foi de 50 mV s^{-1} . (B) Dependência do potencial formal do eugenol em função do pH na faixa de 3 a 8.68
- Figura 5.28. Dependência da corrente de pico anódica em função do pH na faixa 3 a 8.....69
- Figura 5.29. (A) Curva analítica e (B) Picos cromatográficos para as soluções contendo concentrações de padrão de eugenol: (1) $0,6 \times 10^{-2}$; (2) $1,2 \times 10^{-2}$; (3) $1,8 \times 10^{-2}$ e (4) $2,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$70
- Figura 5.30. (A) Curva de adição padrão de solução contendo $20 \mu\text{L}$ de solução estoque preparada com $100 \mu\text{L}$ de amostra de óleo essencial, em 10 mL de solução etanol/água a 60%. (B) Espectros de absorção da amostra e das concentrações do padrão de eugenol.....71
- Figura 5.31. (A) Voltamogramas cíclicos. (B) Curvas analíticas do padrão de eugenol na faixa de concentração: $2,5 \times 10^{-4}$ a $20,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Registrados em eletrólito suporte (etanol/tampão a 60%), pH 3,3; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$72
- Figura 5.32. Curvas TG-DTA para o óleo essencial das folhas de *Pimenta dioica* Lindl em atmosfera de nitrogênio à taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$74
- Figura 5.33. Taxa de mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* – expostas a seis concentrações diferentes do óleo essencial de *Pimenta dioica* Lindl, após 24 horas – versus o logaritmo de cada dose aplicada.....76
- Figura 5.34. Estimativa da CL_{50} do óleo essencial de *Pimenta dioica* Lindl pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL_{50} é o ponto de intersecção das duas curvas.77

- Figura 5.35. Taxa de mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* expostas a seis concentrações diferentes do padrão de eugenol, após 24 horas.79
- Figura 5.36. Estimativa da CL_{50} do padrão de eugenol pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL_{50} é o ponto de interseção das duas curvas.80
- Figura 5.37. Comparação entre as taxas de mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* proporcionadas pelo óleo essencial da *Pimenta dioica* Lind e pelo padrão de eugenol.....81

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1. Propriedades físicas do óleo essencial extraído das folhas da espécie <i>Pimenta dioica</i> Lindl.	46
Tabela 5.2. Bandas de absorção e modos vibracionais do padrão de eugenol e do óleo essencial na região do Infravermelho.	51
Tabela 5.3. Deslocamentos químicos teóricos e experimentais de ¹³ C do eugenol e do óleo essencial (a partir do TMS) com suas respectivas multiplicidades.	54
Tabela 5.4. Composição química do óleo essencial das folhas da <i>Pimenta dioica</i> Lindl.	58
Tabela 5.5. Comparação entre as técnicas analíticas de cromatografia, espectrofotometria e voltametria para determinação quantitativa de eugenol no óleo essencial da <i>Pimenta dioica</i> Lindl.	73
Tabela 5.6. Mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição em várias concentrações do óleo essencial extraído das folhas da espécie vegetal <i>Pimenta dioica</i> Lindl.	75
Tabela 5.7. Mortalidade das larvas do <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição em várias concentrações padrão de eugenol.....	78

Título: Estudo químico, avaliação eletroquímica e atividade larvicida do óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* Lindl frente *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

Autor: Silvio Carvalho Marinho

Orientadores: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho
Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza

RESUMO

Na procura pelo controle químico alternativo contra o mosquito *Aedes aegypti*, diversas pesquisas são desenvolvidas e estimuladas no intuito de se descobrirem novas substâncias inseticidas de origem vegetal. Neste trabalho a partir da extração e do estudo analítico do óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* Lindl, foi analisado o efeito larvicida do óleo contra larvas em terceiro estágio do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). Extraíu-se quantitativamente o óleo essencial das folhas por arraste à vapor. Determinaram-se as propriedades físico-químicas do óleo essencial (densidade, índice de refração, solubilidade, cor e aparência). Caracterizou-se analiticamente o óleo por espectroscopia de ultravioleta-visível, infravermelho, ressonância magnética nuclear de carbono 13, além de se determinar alguns de seus componentes por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. Quantificou-se o componente majoritário do óleo essencial por cromatografia gasosa, ultravioleta-visível e voltametria cíclica, comparando os métodos de quantificação. Determinou-se a perda de massa do óleo essencial através de análise termogravimétrica e análise térmica diferencial (TG-DTA). Calculou-se a CL₅₀ do óleo e do padrão de eugenol, além do limite de confiança a 95% de probabilidade, a partir dos métodos de Reed-Muench (1938) e Pizzi (1950), respectivamente. O rendimento do óleo foi de 2,9% m/v. Foram identificados dezesseis componentes no óleo, e a presença majoritária do eugenol foi confirmada pelas técnicas espectroscópicas. Na comparação entre a quantificação de eugenol sua concentração variou entre 74 a 79% no óleo essencial. O estudo térmico mostrou que a perda de massa foi de 97% em uma única etapa de decomposição entre 142 e 192°C. A atividade larvicida do óleo apresentou mortalidade de 60% na primeira hora a uma concentração de 120 µg mL⁻¹. O óleo essencial obteve CL₅₀ de 38,86 (±2,25) µg mL⁻¹ e o padrão de eugenol 79,75 (±2,10) µg mL⁻¹. Os resultados promissores indicam que o óleo essencial avaliado é composto por substâncias que juntamente com o componente majoritário eugenol propiciam maior efeito larvicida contra *Aedes aegypti*.

Palavras-Chave: Óleo essencial. Folhas. *Pimenta dioica*. Eugenol. Atividade larvicida. *Aedes aegypti*.

Title: Chemical study, electrochemical evaluation and larvicidal activity of essential oil from leaves of *Pimenta dioica* Lindl front of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

Author: Silvio Carvalho Marinho

Advisors: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho

Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza

ABSTRACT

In the finding for alternative chemical control against the mosquito *Aedes aegypti*, several studies are developed and encouraged in order to find new insecticidal substances of plant origin. In this work from the extraction and analytical study of the essential oil of leaves of *Pimenta dioica* Lindl study, the larvicidal effect of oil against larvae in third stage of the mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). Quantitatively was extracted essential oil from leaves by steam steam. Determined the physicochemical properties of oil essential (density, refractive index, solubility, color and appearance). Characterized analytically by the oil by ultraviolet spectroscopy visible, infrared, nuclear magnetic resonance of carbon 13, and to determine some of its components by gas chromatography coupled with mass spectrometer. The main component of the essential oil was quantified by gas chromatography, ultraviolet -visible and cyclic voltammetry, comparing the methods of quantification. It was determined the mass loss of essential oil by means of thermal analysis and thermal analysis differential. We calculated the LC₅₀ of the standard oil and eugenol, beyond the limit of the 95% probability, using the methods Reed-Muench (1938) and Pizzi (1950), respectively. The yield oil was 2.9% m/v. Sixteen components were identified in the oil, and the predominant presence of eugenol was confirmed by the techniques spectroscopy. Comparing the quantification of eugenol its concentration ranged between 74 to 79% in the essential oil. The thermal study showed that the weight loss was 97% in a single step decomposition between 142 and 192°C. The larvicidal activity of the oil showed mortality of 60% in the first hour at a concentration of 120 mg mL⁻¹. The essential oil obtained LC₅₀ of 38.86 (± 2.25) g mL⁻¹ and the pattern of eugenol 79.75 (± 2.10) g mL⁻¹. The promising results indicate that the oil essential evaluated consists of substances that together with the major component eugenol provide greater larvicidal effect against *Aedes aegypti*.

Key-words: Essential oil. Leaves. *Pimenta dioica*. Eugenol. Larvicidal activity. *Aedes aegypti*.

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é atualmente o mosquito que apresenta maior dispersão em áreas urbanas do planeta. Ele é um dos agentes (juntamente com *Aedes albopictus*) transmissores da dengue, doença considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um dos principais problemas de saúde pública no mundo, com grande incidência nas regiões tropicais do globo (WHO, 2010).

Trata-se de uma espécie de grande importância para a medicina, pois é o vetor de quatro sorotipos do flavivírus causador da dengue clássica e da febre hemorrágica da dengue. Portanto, é urgente que o controle da densidade populacional do *Aedes aegypti* ocorra para que a dengue não assuma proporções de uma epidemia, pois não existe vacina para a doença, e a melhor forma de combatê-la é atacar o vetor, principalmente, eliminando os locais onde ocorre a oviposição e o desenvolvimento das larvas do mosquito (BRASIL, 2009).

Atualmente, o controle é feito por meio de aplicações de inseticidas organofosforados e piretróides (BRASIL, 2009). Porém, o uso frequente e em doses cada vez maiores desses produtos tem evidenciado os principais problemas devido ao uso destes inseticidas: o aparecimento de populações resistentes de mosquitos a esses produtos e os danos ambientais provocados por seu uso intensivo (LUNA et al., 2004; CARVALHO e SILVA, 2000; POLANCZYK et al., 2003)

Por mais de 30 anos o organofosforado temephos foi o larvicida exclusivo usado no Brasil para o controle do *Aedes aegypti* (BARRETO, 2005). Contudo, está sendo paulatinamente substituído, e a razão é o desenvolvimento de grande resistência das larvas, que não mais estavam sendo adequadamente controladas por aquele produto químico.

Dessa maneira, tem crescido a busca por extratos vegetais e substâncias naturais que sejam efetivas no combate ao mosquito adulto e/ou à larva de *Aedes aegypti*, e que sejam isentas de toxicidade para o

meio ambiente. A resistência resulta no aumento da frequência de aplicação de inseticida, dosagens crescentes, rendimentos diminuídos, danos ambientais e surgimento de doenças, quando os vetores não podem ser controlados (SIMAS et al., 2004).

Produtos de origem vegetal são amplamente reconhecidos por sua diversidade química, como por sua considerável aplicação em diversas áreas, incluindo a farmacêutica (PENIDO et al. 2005). Logo, as plantas oferecem uma fonte alternativa de controle porque contêm uma série de bioativos químicos.

Considerável número de pesquisas tem ressaltado a busca e o desenvolvimento de substâncias derivadas de plantas para controle de mosquitos (LEYVA et al., 2009; CHENG et al. 2009; GERIS et al. 2008; MULLAI et al. 2008; PAVELA, 2008; PUSHPANATHAN et al. 2008; RAHUMAN et al. 2008; SILVA et al. 2008; CHAMPAKAEW et al. 2007; GLEISER e ZYGADLO 2007; MENDONÇA et al. 2005; AMER e MEHLHORN, 2006a e 2006b; SILVA et al. 2006). Portanto, a procura por compostos larvicidas advindos de espécies vegetais, como os óleos essenciais extraídos de certas plantas, tem se intensificado na última década.

Esses extratos de plantas, chamados "óleos essenciais", são misturas químicas complexas formadas, às vezes, por mais de cem componentes responsáveis, por exemplo, pelo seu aroma. Diferentes partes das plantas têm sido usadas para obtenção do óleo essencial: flores, folhas, sementes, raízes, frutos, cascas, rizomas e tubérculos (ARIDOGAN et al., 2002).

A espécie vegetal utilizada neste trabalho é conhecida da comunidade científica e alguns estudos realizados com os óleos essenciais extraídos, tanto das folhas quanto dos frutos, têm mostrado resultados interessantes: o eugenol, constituinte majoritário da *Pimenta dioica* Lindl possui efeito comprovadamente analgésico e antipirético (LOPEZ et al., 1998). Contudo, não há relatos na literatura científica quanto ao uso do óleo essencial dessa espécie como agente larvicida, apesar de alguns trabalhos similares indicarem compostos de origem botânica com esse

tipo de atividade e potencial para uso no controle de vetores (GONZAGA et al., 2008; SILVA et al., 2004; POHLIT et al., 2004; PARK et al., 2002; PIZARRO et al., 1999).

Para o Brasil, pesquisas nesta área têm grande significado. No país a dengue causa morte de muitas pessoas todos os anos ou a incapacidade de trabalho por um período de aproximadamente 10 dias devido aos sintomas, geralmente, severos. Isto representa uma perda de milhões de reais tanto no investimento para erradicação da doença no Brasil, como na contagem dos dias de trabalho parado (SILVA, 2006).

Tendo em vista o crescimento da doença e os prejuízos causados pela dengue no país, torna-se de suma importância a descoberta de novos materiais e desenvolvimento de métodos de combate ao seu vetor. Dessa forma, pelo fato de muitas plantas, por natureza, serem tóxicas para os mosquitos, os óleos essenciais podem representar uma saída eficiente para esse problema.

Nesse contexto, na busca por produtos naturais que possam ser usados como larvicidas contra *Aedes aegypti* no controle da dengue, foi testado o óleo essencial extraído das folhas de uma planta da flora brasileira, a *Pimenta dioica* Lindl, contra as larvas desse mosquito.

CAPÍTULO 2
REVISÃO DA
LITERATURA

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - CONSIDERAÇÕES SOBRE ÓLEOS ESSENCIAIS

De acordo com MOUCHREK FILHO (2000), o termo “óleo essencial”¹ é empregado para designar líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte – quase sempre agradável – extraídos de plantas por algum processo específico, sendo o mais freqüente a destilação por arraste de vapor d’água².

A *International Organization for Standardization - ISO* define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d’água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (*Rutaceae*). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos voláteis³, óleos etéreos ou essências. Tais denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas como, por exemplo, a de possuírem aparência oleosa e aroma agradável, serem líquidos voláteis e solúveis em solventes apolares (como o éter). Em água, eles apresentam solubilidade limitada, mas o suficiente para aromatizar suas soluções aquosas, que, nesse caso, são denominadas hidrolatos (TELES, 2003).

É interessante destacar que 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

¹ Segundo BURT (2004) esse termo é derivado do nome inventado no século XVI pelo suíço Paracelsus von Hohenheim; foi esse cientista quem nomeou o componente efetivo da droga *Quinta essentia*.

² Para extração industrial, segundo SIMÕES et al. (2007), o método utilizado é a extração por CO₂ supercrítico, no qual nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando o óleo mais puro que aqueles obtidos por outros métodos.

³ Sua principal característica, de acordo com SIMÕES et al. (2007), é a volatilidade, diferenciando-se assim, dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes.

orgânicos. Os óleos vegetais são ésteres da glicerina com ácidos graxos de longas cadeias. Os últimos óleos citados são parafinas líquidas misturadas a outros hidrocarbonetos de peso molecular elevado.

SIMÕES et al. (2007) afirmam que além dos óleos obtidos de plantas (fitogênicos), produtos sintéticos são encontrados no mercado. Esses óleos sintéticos podem ser imitações dos óleos naturais ou composições de fantasia. A identificação dessa natureza se torna importante na indústria farmacêutica pelo fato de somente os óleos de origem natural serem permitidos pelas farmacopéias (exceções são aqueles óleos que contêm somente uma substância como é o caso do óleo essencial de baunilha, que possui a vanilina).

A constituição química dos óleos essenciais é muito complexa chegando alguns a centenas de compostos com funções orgânicas diferentes. A esse respeito SIMÕES et al. (2007) esclarecem que os constituintes dos óleos variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos contendo enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas concentrações (traços).

Os referidos autores explanam que embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleo essencial, sua composição pode variar segundo a localização na planta. Dessa maneira, óleos essenciais obtidos de diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar composição química, características físico-químicas e odores bem distintos. Cabe ressaltar que a composição química de um óleo essencial extraído de uma mesma espécie vegetal pode variar significativamente, de acordo com, por exemplo, a época de coleta, condições climáticas, tipo de solo, quimiotipos⁴ e ciclo vegetativo.

⁴ Vegetais botanicamente idênticos, mas que diferem quimicamente.

Quanto aos métodos de extração dos óleos essenciais eles variam de acordo com a parte da planta em que ele se encontra, bem como com a proposta de utilização dos mesmos. Os mais comuns são⁵: enfloração (*enfleurage*), arraste por vapor d'água, extração com solventes orgânicos, prensagem (ou expressão) e extração por CO₂ supercrítico (MOUCHREK FILHO, 2000).

Em relação à importância econômica dessas substâncias, segundo TELES (2003) os óleos essenciais são largamente utilizados em muitas indústrias para conferir aromas especiais em inúmeros produtos, tais como perfumes, cosméticos, sabonetes, condimentos etc. Eles são empregados também para mascarar odores desagradáveis em ambientes de trabalho e instalações sanitárias, além de serem usados como insumos em diversos produtos em indústrias de plásticos, tintas, borrachas, inseticidas, entre outras.

TELES (2003) ainda relata sobre os problemas relativos à qualidade de óleos essenciais e esclarece que eles podem ter origem na variabilidade da sua composição química, na adulteração ou falsificação ou, ainda, na identificação incorreta do produto e sua origem. Geralmente, os produtores de grande parte dos óleos essenciais comercializados não apresentam nem a identificação correta da planta da qual o produto foi obtido (incluindo o nome científico) e, tampouco, a procedência da amostra vegetal.

Dessa forma, a adulteração de óleos essenciais que já é conhecida desde a Antiguidade, torna-se evidente até o presente século, devido, principalmente, à grande variedade de estratégias sofisticadas de falsificações, sendo cada vez mais difícil detectá-las.

Sendo assim, de acordo com CHAAR (2000), foram desenvolvidos diversos métodos no intuito de avaliar a qualidade, não somente de matérias-primas que contêm óleos essenciais, como também dos próprios óleos. Dentre os métodos estão os organolépticos, o controle

⁵ BURT (2004) relata que o primeiro autêntico escrito acerca da obtenção de óleo essencial foi por destilação e atribuído ao físico catalão Villanova (que viveu cerca de 1235-1311).

de pureza, a análise qualitativa dos componentes, a análise do teor de óleo volátil em drogas vegetais e os métodos cromatográficos.

A análise química de separação e identificação dos constituintes dos óleos é feita por meio de técnicas cromatográficas – Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), e por técnicas espectrométricas – dentre as quais as mais freqüentes são a Espectroscopia de Ultravioleta (UV), Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN ^1H e ^{13}C) e Espectrometria de Massas (EM). O uso de bibliotecas e bancos de dados informatizados contendo informações existentes na literatura a respeito de um grande número de substâncias já conhecidas é amplamente utilizado (TELES, 2003; MOUCHREK FILHO, 2001).

Sobre a utilização dos óleos essenciais como agentes medicinais, ela vem ganhando destaque desde o final do século XX, estando em destaque em termos científicos. Entretanto, SIANI et al. (2000) ponderam que essa importância é fato conhecido desde a Antiguidade, quando diversos povos, incluindo gregos, egípcios e romanos, praticavam cultos religiosos associados à cura de males e à busca de bem estar físico, através dos aromas obtidos de partes específicas de certos vegetais.

De acordo com MONTEIRO (2008) a maior parte dos trabalhos sobre atividades biológicas atribuídas aos óleos essenciais descritos na literatura especializada, versam sobre sua ação antimicrobiana (bactericida e antifúngica, sobretudo). SIANI et al. (2000) relatam que essa capacidade, de certa maneira, representa uma extensão do próprio papel que os óleos exercem nas plantas, defendendo-as de bactérias e fungos fitopatogênicos.

Por outro lado, alguns estudos apontam compostos de origem botânica com atividade larvicida e potencial uso no controle de vetores (GONZAGA et al., 2008; SILVA et al., 2004; POHLIT et al., 2004; PARK et al., 2002; PIZARRO et al., 1999).

Como o *Aedes aegypti* é um mosquito com características domiciliar e peridomiciliar, o uso de agentes tóxicos aéreos para o controle

do mosquito nem sempre é eficiente, uma vez que a maioria dos mosquitos adultos esconde-se no interior das casas. A única maneira de se reduzir a densidade dos mosquitos a um nível onde as epidemias da dengue não ocorram é atacando os locais de reprodução (GLUBER, 1989).

O controle ideal é feito com o uso de larvicidas nos locais de reprodução. Normalmente são usados inseticidas e larvicidas organofosforados e piretróides sendo a utilização de produtos naturais uma alternativa para o controle químico convencional. Em termos, várias plantas têm mostrado atividade pesticida, como um mecanismo de defesa contra predação ou infecção (GONZAGA et al., 2008; SILVA, 2006).

2.2 - *Pimenta dioica* Lindl

A espécie vegetal *Pimenta dioica* Lindl, conhecida popularmente como pimenta da Jamaica⁶ (ou *allspice*), pertence à família *Myrtaceae* que compreende cerca de 140 gêneros e 3.000 espécies, distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e Austrália temperada (SOUSA, 2003).

CORRÊA (1984) diz que a planta (Figura 2.1) é originária da Índia e América Central e que se trata de uma árvore que pode atingir 10 metros de altura, fortemente aromática em todas as suas partes, com numerosas folhas pecioladas, elíptico alongadas, flores numerosas, fruto baga, globoso, piriforme, contendo duas sementes, raras vezes uma.

DUKE (1985) relata que esta espécie vegetal tem larga aplicação medicinal em vários países, sobretudo da América Central. Na Jamaica os frutos são utilizados no tratamento de resfriados, hemorragias e estomatites. Na Costa Rica, as folhas são usadas como carminativas e

⁶ GUENTHER (1950) explana que na Jamaica, a árvore não é plantada, ela é cultivada de forma espontânea por pássaros e morcegos que apreciam seu fruto e por isso, em vôo, deixam cair as sementes que vão formar a vegetação. Estas novas plantas desenvolvem-se sobre extensas áreas, formando florestas inteiras com, inclusive, árvores de pimenta em algumas regiões montanhosas.

estomáquicas, além de serem excelentes para diabetes. Na Guatemala aplica-se externamente em escoriações e dores reumáticas. Em Cuba é utilizada como bebida refrescante, chá depurativo e estimulante tônico. Nesse país o óleo essencial do fruto é usado ainda no tratamento de diarréia, dispepsia e flatulência.

De acordo com GUENTHER (1950) existem dois tipos de óleo de *Pimenta dioica* Lindl no mercado: o óleo destilado dos frutos, com fino odor e sabor, característico de pimenta e o óleo obtido das folhas.



Fonte: UCLA (2010); Marinho (2005).

Figura 2.1. *Pimenta dioica* Lindl: árvore, frutos e folhas.

De acordo com CHAAR (2000) o fruto seco contém 2 a 5% de óleo essencial e a quantidade do óleo no fruto depende do período de colheita. O pó contém eugenol (65 a 85%, componente majoritário – Figura 2.2), éter metil eugenol, cariofileno, felandreno, cineol, ácido palmítico, óleos fixos, resinas, açúcares, amido, ácido málico, oxalato de cálcio e taninos.

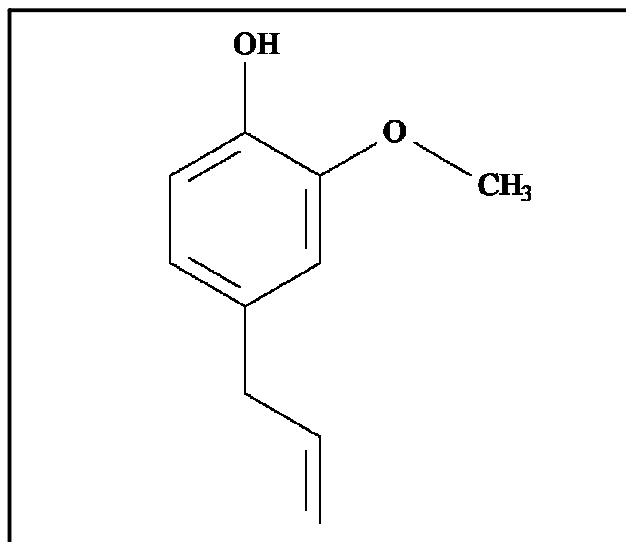


Figura 2.2. Fórmula estrutural do eugenol.

Estudos fitoquímicos de suas folhas não detectaram a presença de alcalóides e sim de compostos tanínicos e grande quantidade de óleo essencial (MOUCHREK FILHO, 2000).

O eugenol apresenta fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$ e massa molecular 164 (sua nomenclatura IUPAC é 4-alil-2-metoxifenol).

A respeito do eugenol é importante frisar que por ser o componente majoritário do óleo da *Pimenta dioica* Lindl (tanto de folhas como de frutos) é o responsável principal por muitas de suas atividades – sobretudo antimicrobianas e antioxidantes (COSTA SOBRINHO, 2008).

A literatura descreve que esse constituinte da *Pimenta dioica* Lindl é muito utilizado como agente antimicrobiano (COSTA SOBRINHO, 2008; MARINHO, 2005; NASCIMENTO, 2004; MONTEIRO, 2004; VÁZQUEZ et al., 2001), atrativo de insetos (MONTEIRO, 2008; SOUSA, 2003; REBÊLO, 2001), preparo de compósitos dentais e de cimentos ortopédicos de ossos (ROJO et al., 2006), anti-séptico, antiinflamatório (KOBAYSAHI, 1997), antiespasmódico (MYINTE et al., 1996), antialérgico (KIM, 1996), na composição de cosméticos (TOURIYA et al., 1995), antioxidante (COSTA, 1994), no tratamento da AIDS (KAEMPGEN, 1990) e como flavorizante (CRAVEIRO et al., 1981).

Alguns produtos obtidos por sínteses químicas, a partir do eugenol, tais como metil eugenol e acetato de eugenila adquiriram um elevado valor comercial, devido às utilizações desses produtos como princípios ativos nas indústrias agroquímicas, substituindo os atuais defensivos agrícolas por atrativos de insetos (feromônios) e nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (MOUCHREK FILHO, 2000).

Existem outros trabalhos versando sobre a importante atividade biológica do eugenol, que isoladamente já se descobriu ser bastante efetiva. Contudo ainda são poucos os trabalhos publicados a respeito do óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* Lindl. A maioria, contudo converge para algumas conclusões comuns, a mais importante é de que é o eugenol o componente majoritário e principal responsável por muitas de suas propriedades anti-sépticas sobre vários microrganismos, corroborando esta afirmação seguem algumas pesquisas com esse enfoque.

RODRÍGUEZ et al. (1997) avaliaram a atividade biológica de um creme do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl como repelente de insetos em tropas do exército cubano. Encontraram significativa diferença entre o grupo testado com o creme e outro com um creme placebo. Para o creme com o óleo essencial eles encontraram 100% de repelência por um tempo maior, quando comparado com outros repelentes não naturais encontrados no mercado. Devido aos excelentes resultados os autores sugeriram que o creme da *Pimenta dioica* Lindl pode ser empregado profilaticamente para evitar enfermidades transmitidas por mosquito, como a dengue hemorrágica, por exemplo. Neste mesmo trabalho eles comentam que outros investigadores encontraram atividade do óleo da pimenta sobre fungos e leveduras.

LOPEZ et al. (1998) estudaram o extrato da *Pimenta dioica* Lindl e comprovaram seus efeitos analgésico e antipirético em ratos e coelhos de laboratório. A toxicidade aguda oral também foi testada usando os mesmos seres vivos. Para os autores o eugenol encontrado em grandes quantidades nas folhas da planta, que atua inibindo a liberação de

prostaglandinas, pode ser o maior responsável por estas atividades, além disso, o ensaio toxicológico permitiu classificar o extrato como não tóxico.

É importante ressaltar que na Universidade Federal do Maranhão (UFMA) existe um dos grupos mais ativos na pesquisa com a *Pimenta dioica* Lindl no Brasil. Monografias e dissertações de mestrado já foram elaboradas, e ainda estão sendo realizadas, pesquisando a composição do óleo essencial e de sua atividade sobre microrganismos (MARINHO, 2005; NASCIMENTO, 2004; MONTEIRO, 2004; SOUSA, 2003⁷). Atualmente até a ação como aditivo em combustíveis está sendo pesquisada por mestrandos e graduandos dessa Instituição, reafirmando o interesse desse grupo pelas muitas propriedades úteis já descobertas e ainda as que estão por serem descobertas.

2.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS

As técnicas analíticas permitem a avaliação das qualidades do óleo essencial, garantindo, assim, a identificação, constância de seus constituintes químicos e a segurança de sua utilização.

A avaliação quantitativa e qualitativa envolve a utilização de diversas técnicas básicas que sofreram algumas alterações nos últimos anos, devido essencialmente à revolução da informática (programa de computadores, níveis de automação, forma de integração dos dados obtidos) e da sofisticação dos experimentos que podem ser realizados resultando na dedução de uma estrutura coerente. Entre as técnicas citamos a seguir, basicamente, aquelas utilizadas neste trabalho.

⁷ Em todos esses trabalhos utilizaram-se os frutos da *Pimenta dioica* Lindl.

2.3.1 - Cromatografia Gasosa (CG)

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

2.3.2 - Espectroscopia na Região do Ultravioleta (UV)

O uso da espectrofotometria no ultravioleta fica mais evidente relacionando-se o infravermelho, a RMN e o ultravioleta. A fim de caracterizar um composto orgânico, o químico usa, nos casos normais o IV para detectar e identificar os grupos funcionais e a RMN para determinar a disposição estrutural de prótons e carbonos. Depois de ter estabelecido pelo menos uma idéia preliminar sobre a estrutura do composto, o químico está habilitado a decidir se o UV será útil para caracterizar o composto (RALPH, 1983).

A absorção molecular na região do UV 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 UV é limitada, na maior parte, aos sistemas conjugados (SILVERSTEIN et al., 2007).

2.3.3 - Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV)

Como alternativa para avaliações cromatográficas de compostos voláteis, podem ser usadas técnicas que proporcionam informação direta acerca da composição de uma amostra particular sem prévia separação dos componentes, isto é, os métodos espectroscópicos.

A espectroscopia na região do infravermelho pode ser usada para obter informações acerca dos grupos funcionais da composição dos óleos essenciais, principalmente, grupos contendo oxigênio, uma vez que as vibrações moleculares são perceptíveis nessa região do espectro. Apesar de ser uma técnica altamente sensível, é pouco seletiva no caso de misturas de multicomponentes, e difícil para fazer medidas quantitativas de concentrações de componentes individuais (RALPH, 1983).

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) é uma das ferramentas mais comuns para a identificação de compostos orgânicos e inorgânicos puros, pois, com exceção de poucas moléculas homonucleares (como O_2 , N_2 e Cl_2), todas as espécies moleculares absorvem radiação no IV. A intensidade de absorção é uma função da variação do momento de dipolo envolvido na vibração (CRACKER e SIMON, 1987).

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

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

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

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

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

2.3.5 - Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN ^{13}C)

A espectrometria de RMN é uma das ferramentas mais valiosas para a determinação estrutural de compostos orgânicos, contribuindo para o estabelecimento do esqueleto da molécula.

Para a obtenção dos espectros de ressonância, submete-se a amostra a um campo magnético externo, de forma que determinados núcleos que apresentam um momento magnético nuclear (núcleos com número de massa ímpar como ^1H , ^{13}C , ^{31}P , por exemplo) podem entrar em ressonância com a radiofrequência aplicada, absorvendo a energia eletromagnética em frequências características para cada núcleo, conforme sua vizinhança química.

Os dados obtidos com esse método espectrométrico são muito importantes para a elucidação estrutural de praticamente todas as classes de produtos naturais, incluindo os metabólitos secundários vegetais. Os espectros de RMN de hidrogênio e de carbono 13 são os mais utilizados e a sua interpretação permite caracterizar o número e o tipo de átomos de H e C, em função da localização e do desdobramento dos sinais correspondentes à absorção da energia eletromagnética.

A grande variedade de técnicas disponíveis de RMN (COSY, NOESY, HETCOR, HMBC, INEPT, INADEQUATE, COLOC, entre outras)

permite identificar a proximidade espacial ou mesmo a conectividade de alguns átomos em particular, auxiliando dessa maneira, na montagem do composto constituído pelas diferentes partes da molécula (SIMÕES et al., 2007).

2.3.6 - Voltametria Cíclica (VC)

A voltametria cíclica consiste na aplicação de potencial por onda triangular do potencial do eletrodo, o qual é imerso em uma solução estacionária, medindo-se a corrente resultante. O potencial do eletrodo de trabalho é controlado versus o eletrodo de referência, tal como, eletrodo saturado de calomelano (ESC) ou eletrodo prata/cloreto de prata (Ag/AgCl). O potencial controlado, o qual é aplicado entre esses dois eletrodos pode ser considerado um sinal de analítico (WANG, 2006).

A voltametria cíclica é talvez a mais versátil técnica eletroanalítica para estudos de espécies eletroativas, isso fez com que nos últimos anos ela se tornasse uma ferramenta popular no estudo de reações eletroquímicas. Essa versatilidade combinada com facilidade das medidas foi resultado do extensivo uso da voltametria cíclica nos campos da eletroquímica, química inorgânica, química orgânica e bioquímica. No caso da química orgânica, muitos químicos orgânicos têm aplicado esta técnica para o estudo de caminhos (rotas) de reações biossintéticas, estudos de radicais livres gerados eletroquimicamente e estudos de modelos de catálises enzimáticas (MOUCHREK FILHO, 1997).

Com respeito ao amplo uso que a voltametria cíclica oferece, essa técnica não é geralmente bem entendida em comparação com outros métodos instrumentais, como a espectroscopia e a cromatografia.

Embora a polarografia seja a mais conhecida das técnicas voltamétricas, com a voltametria de redissolução é possível determinar

vários elementos, em concentrações em nível de parte por bilhão, usando uma instrumentação relativamente barata.

2.4 - ANÁLISE TÉRMICA

A análise térmica compreende um conjunto de técnicas que possuem um princípio comum: quando uma substância é aquecida (ou resfriada) de acordo com uma programação de temperatura, alguma propriedade química ou física pode ser observada e medida (IONASHIRO e GIOLITO, 1980).

A definição habitualmente aceita foi originalmente proposta pelo Comitê de Nomenclatura da Confederação Internacional de Análises Térmicas (ICTA) sendo, subsequentemente, adotada tanto pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) quanto pela Sociedade Americana de Testes de Materiais (ASTM).

Nesse contexto, análise térmica é um termo que abrange um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou temperatura, enquanto a temperatura da amostra, sob uma atmosfera específica, é submetida a uma programação controlada (TURI, 1997).

As técnicas termoanalíticas têm se tornado um instrumento quase que essencial nos estudos da cinética e mecanismos de substâncias, principalmente, pelo fato de fornecerem informações ausentes em métodos convencionais, porém, são de uso pouco frequente na análise de óleos essenciais. No entanto, 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 (WENDLANDT, 1986).

Ocasionalmente o uso de mais de uma técnica termoanalítica é aconselhável a fim de responder completamente e inequivocamente a um problema específico.

2.4.1 - Termogravimetria (TG)

Termogravimetria (TG) é a técnica na qual a mudança da massa de uma substância é medida em função da temperatura enquanto esta é submetida a uma programação controlada.

O termo análise termogravimétrica (TGA) é comumente empregado, particularmente em polímeros, no lugar de TG por ser seu precedente histórico e para minimizar a confusão verbal com T_g , a abreviação da temperatura de transição vítrea. Problemas adicionais podem ocorrer em pesquisas computadorizadas, já que ambas as abreviaturas são aceitas pela IUPAC (SU, 2010).

O registro é a curva TG; o equipamento utilizado para esta técnica é a termobalança. As curvas TG permitem obter conclusões quanto à estequiometria, estabilidade térmica da amostra, composição e estabilidade dos compostos intermediários, bem como composição do produto final (KEATTCH e DOLLIMORE, 1975).

No gráfico da TG a ordenada é apresentada usualmente em percentual de massa wt%, em vez da massa total, proporcionando assim uma fácil comparação entre várias curvas em uma base normalizada. Existem mudanças significativas, particularmente na temperatura da amostra, que podem refletir na curva TGA quando a massa inicial é significativamente variada entre experimentos (SU, 2010).

Ocasionalmente, o peso e a temperatura serão exibidos em função do tempo. Isto permite a verificação aproximada da taxa de aquecimento, mas é menos conveniente para propósitos de comparação com outras curvas (WENDHAUSEN, 2010).

A termogravimetria derivada (DTG) é um recurso matemático, que fornece a derivada primeira da curva TG em função do tempo ou da temperatura. O registro é a curva termogravimétrica derivada ou curva DTG (IONASHIRO e GIOLITO, 1980).

A termogravimetria é uma técnica útil para estudar a capacidade da substância de manter sua massa inalterada sob várias condições. Como em toda técnica de análise, existem fatores que influenciam os resultados. No caso da termogravimetria, esses fatores são provenientes das características instrumentais e da amostra (MARCONCINI e OLIVEIRA, 2007).

2.4.2 - 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, 1986).

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.

Ao longo do programa de aquecimento as temperaturas da amostra e da referência se mantêm iguais até que ocorra alguma alteração física ou química na amostra. Se a reação for exotérmica, a amostra irá liberar calor, ficando por um curto período de tempo, com uma temperatura maior que a referência. Do mesmo modo, se a reação for endotérmica a temperatura da amostra será temporariamente menor que a referência (TURI, 1997).

Mudanças na amostra tais como fusão, solidificação e cristalização são então registradas sob a forma de picos, sendo a variação na capacidade calorífica da amostra registrada como um deslocamento da linha base (WENDHAUSEN, 2010).

A curva DTA é então registrada tendo a temperatura ou o tempo na abscissa, e μV na ordenada. A diferença de temperatura é dada em μV devido ao uso de termopares em sua medição (SU, 2010).

2.5 - ASPECTOS SOBRE O *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) (Diptera: Culicidae) (Figura 2.3) é o principal responsável pela transmissão da febre amarela urbana e da dengue em todo o mundo (TAUIL, 2001). É doméstico e antropofílico, com atividade hematofágica diurna e utiliza-se, preferencialmente, de depósitos artificiais de água limpa para colocar seus ovos (CDC, 2010).



Fonte: INFO-E (2010)

Figura 2.3. Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).

Embora oriundo do Velho Mundo, esse mosquito acompanhou o homem em sua longa e ininterrupta migração pelo globo, e permaneceu onde as alterações antrópicas propiciaram a sua proliferação (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994). Hoje, o *Aedes aegypti* é considerado um mosquito cosmopolita, com ocorrência em regiões tropicais e subtropicais do planeta (CDC, 2010).

A ocorrência do *Aedes aegypti* se dá, principalmente, nas regiões tropicais. Dados do ano de 2009 indicaram as áreas de maior risco (mapa da Figura 2.4): América Central, América do Sul (exceto Chile, Uruguai e sul da Argentina), América do Norte (México), África, Austrália (norte), Caribe (exceto Ilhas Cayman), China (sul), Ilhas do Pacífico, Índia, Sudeste Asiático e Taiwan⁸ (CDC, 2010).



Fonte: WHO (2010).

Figura 2.4. Distribuição do *Aedes aegypti* no mundo em 2009: países ou áreas de risco.

⁸ O contorno das linhas das isotermas de janeiro e julho indicam os limites geográficos potenciais dos Hemisférios Norte e Sul do planeta para sobrevivência do *Aedes aegypti* ao longo do ano (WHO, 2010).

Nos Estados Unidos a ocorrência do mosquito é incomum, mas em 1995 foram registrados casos de transmissão no Texas. No Brasil o *Aedes aegypti* está distribuído na maior parte do país e a região Nordeste está mais suscetível à ocorrência de epidemias da dengue, onde o mosquito está restrito às vilas e cidades, sempre ligado ao peridomicílio e ao domicílio humano (NEVES, 2000).

Percebe-se que o mosquito *Aedes aegypti*, encontrou no mundo moderno condições muito favoráveis para uma rápida expansão, pela urbanização acelerada que criou cidades com deficiências de abastecimento de água e de limpeza urbana; pela intensa utilização de materiais não-biodegradáveis, como recipientes descartáveis de plástico e vidro; e pelas mudanças climáticas. Com essas condições, espalhou-se por uma área onde vivem cerca de 3,5 bilhões de pessoas tornando-se o causador de uma doença que é um grande problema de saúde pública (FUNASA, 2002).

2.5.1 - Ciclo de vida do *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 e vasos, dentro ou perto das habitações. Seu ciclo de vida compreende quatro estágios: ovo – larva – pupa – adulto (SILVA, 2006).

a) Ovo: o ovo (Figura 2.5), mede aproximadamente 1mm de comprimento, com contorno alongado e fusiforme. O ovo é depositado individualmente nas paredes dos depósitos que servem como criadouros, próximos à lâmina da água; no momento da postura os ovos são brancos, mas nas primeiras 24 horas adquirem a cor negra; a formação do embrião se completa em 48 horas (SILVA, 2006).



Fonte: FIOCRUZ (2010)

Figura 2.5. Ovos do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).

De acordo com dados da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA, 2002) são capazes de resistir a longos períodos de dessecação: 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.

b) Larva: nesta fase o *Aedes aegypti* (Figura 2.6) possui aspecto vermiforme, sifão curto, grosso e mais escuro que o corpo e possui quatro estágios evolutivos. A duração desta fase depende da temperatura e da alimentação, em média dura sete dias. As larvas são sensíveis a movimentos bruscos na água.



Fonte: WIKIMEDIA (2010)

Figura 2.6. Larvas do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).

c) Pupa: é o último estágio da fase aquática (Figura 2.7) e possui o aspecto de vírgula, sendo bastante móvel quando perturbada; seu corpo escurece à medida que se aproxima o momento da emergência do adulto. Esta fase dura de dois a três dias e durante este período a pupa não se alimenta (SILVA, 2006).



Fonte: ARBOVIRUS (2010).

Figura 2.7. Pupa do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).

d) Adulto: os mosquitos adultos estão na fase de reprodução e dispersão da espécie. Seu corpo é escuro, com faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais e possui um desenho em forma de lira no mesonoto (Figura 2.3). Podem acasalar 24h após emergirem e o acasalamento pode ser durante o voo ou pousados sobre uma superfície.

O repasto sanguíneo das fêmeas fornece proteínas para o desenvolvimento dos ovos e ocorre nas primeiras horas do dia e ao anoitecer (o macho alimenta-se de carboidratos extraídos dos vegetais). A fêmea faz uma postura (geralmente no fim da tarde) após cada repasto sanguíneo e o intervalo entre a alimentação e a postura é de três dias. A fêmea é atraída por recipientes sombreados ou escuros e prefere água limpa e distribui cada postura em vários recipientes (SILVA, 2006).

CAPÍTULO 3
OBJETIVOS

3 - OBJETIVOS

3.1 - GERAL

Caracterizar analiticamente e avaliar a atividade larvicida do óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* Lindl frente o *Aedes aegypti*.

3.2 - ESPECÍFICOS

a) Extrair quantitativamente o óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* Lindl.

b) Determinar as propriedades físico-químicas do óleo essencial: densidade, índice de refração, solubilidade, cor e aparência.

c) Caracterizar analiticamente o óleo por espectroscopia de ultravioleta-visível, infravermelho, ressonância magnética nuclear de carbono 13, além de determinar os seus componentes por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas.

d) Quantificar o componente majoritário do óleo essencial por cromatografia gasosa, ultravioleta-visível e voltametria cíclica, comparando os métodos de quantificação.

e) Determinar a perda de massa do óleo essencial através de análise termogravimétrica e análise térmica diferencial (TG-DTA).

f) Calcular a concentração letal CL_{50} do óleo a partir do teste de toxicidade (atividade contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*).

CAPÍTULO 4
**METODOLOGIA
EXPERIMENTAL**

4 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Físico-Química do Pavilhão Tecnológico, Central Analítica da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e Central Analítica da Unicamp em parceria com o Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

A metodologia adotada envolveu atividades usuais em um tratamento analítico de plantas aromáticas. Realizou-se o teste de atividade larvicida calculando-se a CL_{50} segundo o método REED-MUENCH (1938 apud COLEGATE e MOLYNEUX, 1993).

4.1 - OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

4.1.1 - Origem, Coleta e Preparo da Amostra Botânica

As folhas de *Pimenta dioica* Lindl foram coletadas da base da copa de uma árvore de aproximadamente 20 anos de idade, localizada na fazenda experimental Santa Elisa, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) no Estado de São Paulo. A espécie foi identificada pelo Dr. Romeu Benatti Júnior com base nos arquivos botânicos do Herbário da Universidade Federal de São Carlos-HUFSCar e sua exsicata está depositada no mesmo herbário, sob o número 3.652.

As amostras foram enviadas via aérea para São Luís onde então foram separadas em folhas e galhos e colocadas para secar em sala seca, por um período de sete dias. Após o período de secagem utilizou-se um moinho elétrico Tecnal, modelo TE-340 para a trituração das folhas. O material triturado foi armazenado em frascos de polietileno para posterior

extração do óleo essencial. Para as pesagens utilizou-se balança digital Marte, modelo AL 500, com precisão de 0,1mg.

4.1.2 - Extração do óleo essencial

Para a extração do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl utilizou-se um extrator de Clevenger de vidro acoplado a um balão de fundo redondo de 1000 mL e a uma manta elétrica como fonte geradora de calor. A cada rotina de extração do óleo essencial, foram pesadas 30g das folhas moídas e colocadas com 300 mL de água destilada em balão de fundo redondo acoplado ao sistema extrator. Em seguida ligava-se a manta elétrica e mantinha-se a temperatura em 100°C. Após 3,5 horas encerrava-se a destilação recolhendo-se o óleo essencial. O óleo foi seco por meio de percolação em Na₂SO₄ anidro. Essas operações foram realizadas em triplicatas e as amostras armazenadas em frascos de vidro sob refrigeração para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis. Posteriormente esses óleos foram submetidos às análises.

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

4.1.3 - Avaliação da Cinética de Extração do Óleo Essencial

Para a determinação da cinética de extração fez-se a hidrodestilação em sistema de Clevenger variando-se os tempos de extração em 1,0; 2,0; 3,0; 3,5; 4,0 e 5,0 horas, à temperatura de 100°C. Em cada extração usou-se uma massa de 30g de amostras para 300mL de água (1:10). A seguir mediu-se o volume do óleo, coletou-se, filtrou-se

em Na_2SO_4 anidro e armazenou-se sob refrigeração para evitar perda por volatilização.

4.2 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

As propriedades físico-químicas do óleo essencial determinadas foram: densidade, solubilidade em etanol a 70% v/v, índice de refração, cor e aparência.

4.2.1 - Densidade

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

4.2.2 - Solubilidade em etanol (70%)

Na determinação da solubilidade, utilizou-se uma solução de etanol/água à 70% (v/v), mantendo-se constante o volume de óleo e adicionando-se, proporcionalmente, volumes diferentes e crescentes da solução alcoólica até se atingir a completa solubilização.

4.2.3 - Índice de refração

Para a determinação do índice de refração, utilizaram-se pipetas de Pasteur em vidro para adicionar as amostras dos óleos diretamente sobre o prisma de Flint do refratômetro, à temperatura de 25°C; fazendo-se então as leituras. Para as medidas de índice de refração utilizou-se um refratômetro ABBE 2 WAJ.

4.2.4 - Cor e Aparência

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

4.3 - ANÁLISES QUÍMICAS

Utilizaram-se as técnicas de Cromatografia a Gás, Cromatografia a Gás Acoplada a Espectrometria de Massas, Espectrofotometria na Região do Ultravioleta-Visível, Análise Espectrométrica Vibracional na Região do Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 e Voltametria Cíclica.

4.3.1 - Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

As análises por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas por impacto de elétrons e analisador íon trap (CG-EM-IE-Ion trap), foram realizadas em equipamento Varian 2100, utilizando hélio como gás de arraste com fluxo na coluna de 1 mL min^{-1} ; temperatura do injetor: 270°C , split 1:50; coluna capilar ($15\text{ m} \times 0,25\text{ mm}$) com fase estacionária VF-1ms (100% metilsiloxano $0,25\mu\text{m}$) e programação de temperatura do forno de 60 a 200°C com taxa de aquecimento de $8^{\circ}\text{C min}^{-1}$, e de 200 a 290°C com taxa de aquecimento de $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$. No Espectrômetro de Massas as temperaturas do manifold, ion trap e da linha de transferência foram de 50°C , 190°C e 200°C , respectivamente. Foram injetadas alíquotas de $1,0\ \mu\text{L}$ (injetor automático CP-8410) das amostras diluídas na proporção de $20\mu\text{L}$ em $1,5\text{ mL}$ de hexano.

4.3.2 - Quantificação por Espectrofotometria no UV-Vis

Utilizou-se um espectrofotômetro UV-Vis modelo Cary 50 da Hewlett Packard. Fixou-se o comprimento de onda em 280 nm , onde foram observados os picos mais definidos para as concentrações testadas do óleo. As amostras foram adicionadas em uma solução a 60% v/v de etanol/água para viabilizar a completa diluição do óleo, já que esta relação foi a que apresentou a menor proporção de etanol sem que a solução turvasse.

Para a quantificação do eugenol utilizou-se o método de adição padrão nas seguintes condições analíticas: adicionou-se volumes crescentes de 0, 20, 40, 60 e $80\mu\text{L}$ de uma solução padrão de eugenol de

concentração $6,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em cinco balões volumétricos de 10mL contendo cada um deles um mesmo volume de 20 μ L da solução mãe. Essa solução foi preparada por diluição de 100 μ L do óleo essencial em 10mL de uma solução de etanol/água a 60%. A mistura também foi usada para completar os cinco balões. Em seguida mediu-se a absorbância em comprimento de onda 280nm, medido em relação ao branco.

4.3.3 - Análise Espectrométrica Vibracional na Região do Infravermelho

Analisou-se o óleo essencial por infravermelho no espectrômetro Nicolet - 5SXC FTIR, equipado com detector TGS na faixa de 4.000-400 cm^{-1} . As amostras foram analisadas diretamente em janelas de KBr.

4.3.4 - Análise Espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

Utilizou-se um espectrômetro de RMN Brüker avance DRX 400, com frequência de 400 MHz, com 1000 varreduras e usando-se como solvente clorofórmio deuterado.

4.3.5 - Determinações Voltamétricas

Os experimentos foram realizados em um sistema eletroquímico composto por um potenciostato, modelo CV50W, da Bioanalytical Systems, acoplado aos eletrodos e a um computador para captura dos dados, além de uma célula eletroquímica de vidro de 10 mL contendo tampa com entradas para os eletrodos (Figura 4.8).

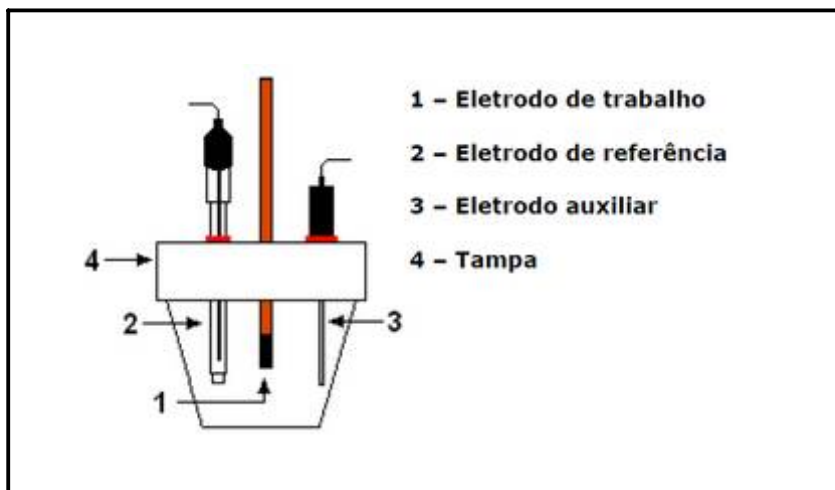


Figura 4.8. Diagrama esquemático da célula eletroquímica.

O eletrodo de trabalho utilizado ($\text{área} = 0,06 \text{ cm}^2$), o de referência e o eletrodo auxiliar foram, respectivamente, de carbono vítreo, prata em solução de cloreto de prata (Ag/AgCl) e platina. O eletrólito suporte usado foi uma solução etanol/tampão BR pH 3,3 a 55%.

4.3.5.1 - Quantificação por Voltametria Cíclica

Os experimentos voltamétricos realizados sem pré-concentração referem-se à voltametria cíclica com eletrodo de carbono vítreo. As condições das análises foram fixadas em: tempo de deaeração de 10 min.; tempo de equilíbrio de 15 s; potencial inicial de +1,20 V; potencial final de -0,20 V e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , em mistura de 60% etanol/tampão (Britton-Robinson-BR) e $\text{pH} = 3,3$.

As determinações voltamétricas foram realizadas em quintuplicata.

4.3.6 - Padrão

Utilizou-se um padrão concentrado de eugenol (98% de pureza) nas análises químicas, procedente da Indústria Dierberger de Óleos Essenciais.

As soluções padrão foram preparadas por diluição a diferentes concentrações em etanol e clorofórmio para cada técnica analítica.

Para a espectroscopia no UV a solução estoque apresentava concentração de $6,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e foi preparada acrescentando-se 100 μL do padrão de eugenol em um balão de 10 mL, aferido com solução etanol/água destilada a 60% (v/v). Na voltametria utilizou-se uma solução estoque de concentração $6,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, a qual foi preparada misturando-se 10 μL do padrão em balão de 10 mL e aferindo-se com uma solução etanol/tampão BR pH 3,3 a 55% (v/v). As soluções estoque do óleo essencial foram preparadas, semelhantemente, às do padrão de eugenol para cada método analítico, ou seja, 10 μL e 100 μL , respectivamente.

4.4 - ANÁLISE TÉRMICA

As análises térmicas foram realizadas em uma termobalança modelo DTG-60H/Simultaneous TG/DTA – marca Shimadzu. As condições fixadas foram: fluxo de nitrogênio a 50 mL/min. com taxa de aquecimento de 10°C/min.; massa aproximada de 10mg e cadinho de platina.

4.5 - OBTENÇÃO E CULTIVO DAS LARVAS

Como os ovos do *Aedes aegypti* não são postos diretamente na água, mas 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 500mL, semi-preenchidos com água e um pedaço de madeira de dimensões 20cmx5cm com uma parte imersa e outra não (Figura 4.9). A fêmea do *Aedes aegypti*, deposita seus ovos na parte imediatamente superior à lâmina d'água, na parte da madeira ainda úmida, mas fora da água do jarro.



Figura 4.9. Armadilha utilizada para a coleta dos ovos do *Aedes aegypti*.

Os ovos do *Aedes aegypti* foram imersos numa bacia plástica, de formato retangular, com cerca de 3 litros de água mineral para a eclosão. Após a imersão dos ovos, 0,5g de ração para ratos foi adicionado à água para auxiliar no crescimento das larvas. Todo o material foi mantido no interior de uma gaiola de madeira e coberta com uma tela de tecido, apropriada para insetos, a fim de evitar a contaminação por ovos de outras espécies de mosquito. Após a eclosão, as larvas foram

acompanhadas até que atingissem o 3º estágio do desenvolvimento, quando então foram utilizadas nos ensaios de atividade larvicida. Foram necessários de quatro a cinco dias para que as larvas atingissem o tamanho ideal para os ensaios.

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

4.6 - TESTE DE TOXICIDADE

Para realização do teste de toxicidade, as larvas selecionadas no terceiro estágio (Figura 4.10) foram transferidas para um béquer contendo 20mL de água mineral (26-28°C). As larvas foram capturadas utilizando-se uma pipeta de Pasteur (Figura 4.10). Cada teste foi feito em quintuplicata para cada concentração testada. Os controles positivos foram realizados com o organofosforado temephos em larvas do *Aedes aegypti*, na concentração utilizada pela Vigilância Sanitária que é de 100mg L⁻¹. Os controles negativos foram realizados com 20mL de água mineral (26-28°C) contendo 0,04% de Tween. As larvas foram expostas às soluções por 24 horas, sendo monitoradas de hora em hora. Ao fim dos períodos registrou-se a mortalidade.

Para o preparo da solução teste, pesou-se 20mg 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.



Figura 4.10. Larvas do *Aedes aegypti* em terceiro estágio.

4.6.1 - Análise Estatística

Após os testes, montou-se uma tabela com os valores das seis 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 mortos (soma das células de mortos abaixo) e o acumulado de vivos (soma das células de vivos acima).

A análise estatística dos dados foi realizada de acordo com o método de REED-MUENCH (1938), o qual parte do princípio de que um animal que sobreviva a certa dose, também irá sobreviver em qualquer outra dose menor que aquela, conseqüentemente, o animal que morrer com certa dose, também irá morrer em doses maiores que aquela. A partir de uma tabela contendo os dados de mortalidade para cada concentração testada, 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% (CL_{50}), pois nesse ponto o número de animais sobreviventes é igual ao número de animais mortos (COLEGATE e MOLYNEUX, 1993).

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

CAPÍTULO 5
**RESULTADOS E
DISCUSSÃO**

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

5.1.1 - Cinética

Na Figura 5.11 mostra-se a relação entre o rendimento percentual do óleo e o tempo de extração, para uma mesma massa de 30 g de folhas secas.

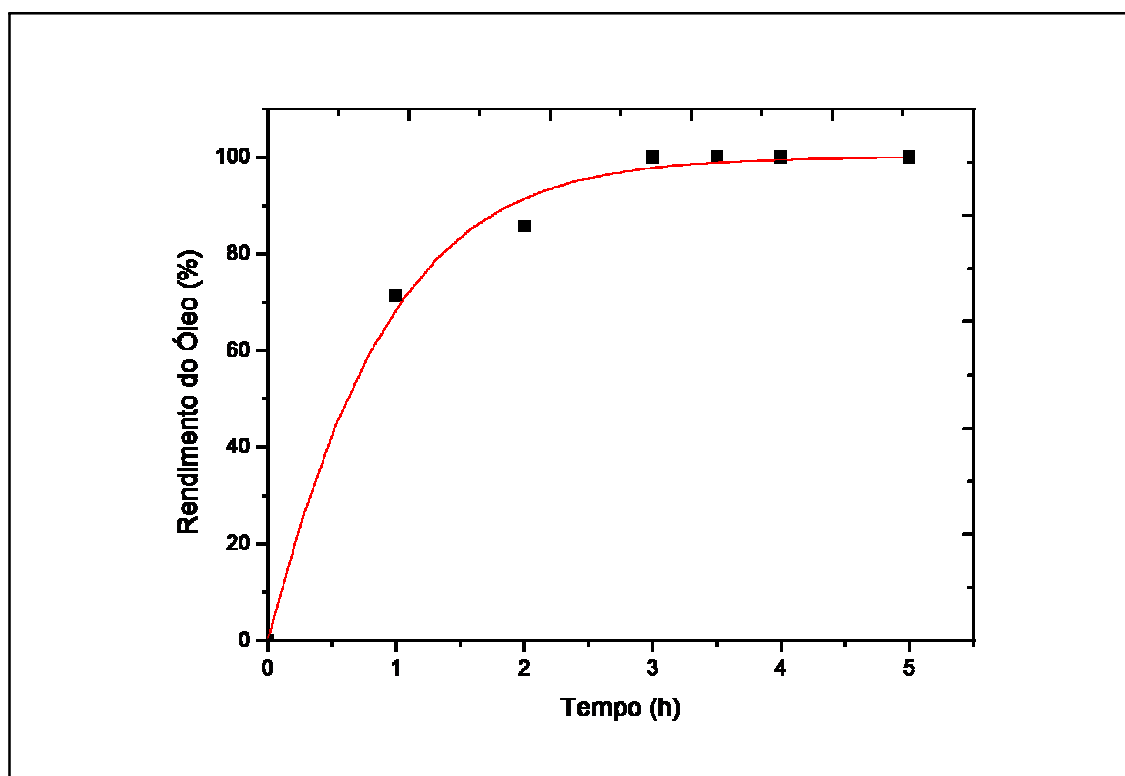


Figura 5.11. Rendimento de extração do óleo essencial pela variação do tempo de extração, com massa de amostra de 30g e temperatura de 100°C.

No gráfico da Figura 5.11 pode-se observar que o rendimento máximo do óleo extraído nas condições do item 4.1.3 foi obtido quando o tempo de extração foi de 3,0 horas, obtendo-se um volume de óleo essencial igual a 0,9mL atribuindo-se a este valor o teor de 100%. Para tempos maiores, verificou-se uma constância nos rendimentos, provavelmente, devido à diminuição crescente do óleo essencial no extrator, em decorrência da destilação.

Na indústria de essências a cinética de extração do óleo essencial é um dos principais parâmetros físico-químicos pesquisados. Além de estar diretamente relacionado com a qualidade do óleo essencial, o tempo de extração reflete-se na natureza econômica do processo. Por isso, uma destilação rápida pode conduzir a um produto contendo predominantemente constituintes mais voláteis, porém destituído das melhores características; ao contrário, uma extração prolongada encarece o produto e também pode sobrecarregá-lo de compostos de aromas indesejáveis (CHAAR, 2000).

5.1.2 - Rendimento

O rendimento da extração foi calculado diante da quantidade de óleo que se obteve a partir de uma determinada massa vegetal. Como nesse experimento partiu-se de uma massa de 30g de folhas moídas da *Pimenta dioica* Lindl e obtiveram-se em média $0,9\text{mL} \pm 0,05$ de óleo essencial em cada extração o rendimento v/m foi de 3%. Como a densidade do óleo foi determinada em $0,980\text{ g mL}^{-1}$ (Tabela 5.1) o rendimento m/m foi calculado em 2,94%.

5.2 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Os resultados obtidos na caracterização físico-química do óleo essencial extraído das folhas da *Pimenta dioica* Lindl estão na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Propriedades físicas do óleo essencial extraído das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl.

Propriedades físico-químicas	Resultados
Densidade (g mL ⁻¹)	0,980
Solubilidade em álcool a 70% (v/v)	1:2
Índice de refração (N _D ^{25°})	1,521
Cor	Amarelo
Aparência	Límpido
Rendimento (%)	2,94

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo, geralmente, específica para um determinado órgão e característica para o seu desenvolvimento, mas as condições ambientais são capazes de causar variações significativas. Alguns desses aspectos são: o ciclo vegetativo; o processo de obtenção; os fatores extrínsecos (ambiente no qual o vegetal se desenvolve, tipo de cultivo, temperatura, umidade relativa, grau de hidratação do terreno e a presença de micronutrientes como N, P e K) (SIMÕES et al., 2007).

Características como o índice de refração podem revelar se o óleo em questão sofreu alguma alteração⁹, devido, por exemplo, adulterações. Este parâmetro corresponde à relação entre a velocidade da luz no ar e a velocidade na substância em ensaio.

⁹ Por comparação com o índice de refração da água (1,3330).

5.3 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

5.3.1 - Análises espectrofotométricas do óleo essencial

As análises por métodos espectrofotométricos de óleos essenciais justificam-se pela necessidade de se conseguir informações sobre a provável composição química. Nesse tipo de análise é possível indicar a presença ou ausência de determinados grupos funcionais que caracterizam, ou não, um determinado óleo essencial.

5.3.1.1 - Análise Espectroeletrônica na Região do Ultravioleta

Os espectros de absorção na região do UV para o eugenol são apresentados na Figura 5.12 na presença do óleo essencial (A) e do padrão de eugenol (B).

A absorção máxima ($\lambda_{m\acute{a}x}$) foi observada nos comprimentos de onda 230 e 280 nm, com absortividade molar (ϵ) $2,76 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em solução de etanol/água a 60%, para o padrão de eugenol (curva B da Figura 5.12).

O espectro do óleo essencial é mostrado na curva A da Figura 5.12, com $\lambda_{m\acute{a}x}$ em 230 e 280 nm. Pode-se constatar que esse espectro apresenta os mesmos máximos de absorbância que o padrão de eugenol mostrado na curva B da Figura 5.12.

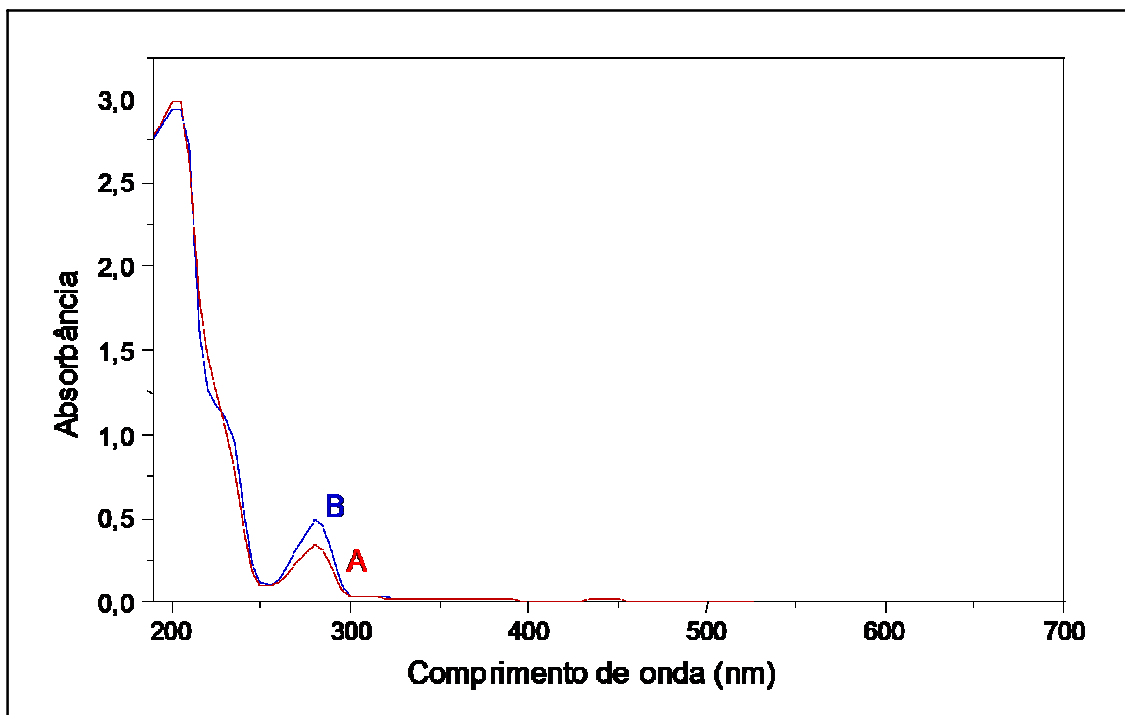


Figura 5.12. Espectros de absorção no UV: (A) Óleo essencial de *Pimenta dioica* Lindl (20 μ L/10mL) e (B) padrão de eugenol a 2,56 $\times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$.

As duas bandas na Figura 5.12 podem ser atribuídas à presença de compostos alifáticos insaturados (230 nm) e a compostos aromáticos (280 nm) como o grupo hidroxila, sendo ambas apresentando transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$, embora unidades fenilpropílicas apresentem bandas com máximo de absorção no mesmo intervalo dos comprimentos de onda observados (SILVERSTEIN et al., 2007; UGAZ, 1994). Contudo, ao se comparar o espectro do óleo essencial com o espectro do padrão de eugenol verifica-se que os mesmos praticamente se sobrepõem indicando que o eugenol encontra-se presente no óleo como componente majoritário.

5.3.1.2 - Análise Espectrométrica Vibracional na Região do Infravermelho

A Figura 5.13 mostra os espectros do padrão de eugenol (A) e do óleo essencial (B) das folhas da *Pimenta dioica* Lindl na região do infravermelho. Comparando os espectros A e B observa-se que todas as bandas de absorção coincidem nas mesmas frequências, indicando a presença de eugenol. Essa semelhança aponta ainda ser esse composto o componente majoritário no óleo essencial.

Os espectros da Figura 5.13 mostram uma forte banda de absorção na região de 3500, correspondente à deformação axial de OH. As bandas observadas em 2970 e 2837 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, à deformação axial assimétrica e simétrica do grupo CH_2 , enquanto que a existente em 3073 cm^{-1} é atribuída à deformação axial de C — H da estrutura benzênica. O estiramento da ligação C — O do grupo C — OH é devido à banda observada em 1270 cm^{-1} , aquelas observadas em torno de 1234 e 1029 são atribuídas aos estiramentos da ligação C — O do grupo metoxi (SILVERSTEIN et al., 2007).

O estiramento da ligação dupla do carbono aromático encontra-se em torno de 1595, 1499 e 690 cm^{-1} (SILVERSTEIN et al., 2007). Na Figura 5.13 tais estiramentos ocorreram em 1608, 1521 e 730 cm^{-1} ; a última banda é atribuída à deformação angular fora do plano, enquanto as outras são atribuídas à deformação axial. O composto alifático da molécula de eugenol apresentou bandas características em torno de 1610 e 900 cm^{-1} tanto no óleo, como no padrão, sendo a primeira banda atribuída à deformação axial da ligação C = C e a segunda à deformação angular fora do plano de =CH— (SILVERSTEIN et al., 2007; PEREIRA e MAIA, 2007).

A Tabela 5.2 apresenta o $\lambda_{\text{máx}}$ dos principais estiramentos do padrão de eugenol e do óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* Lindl.

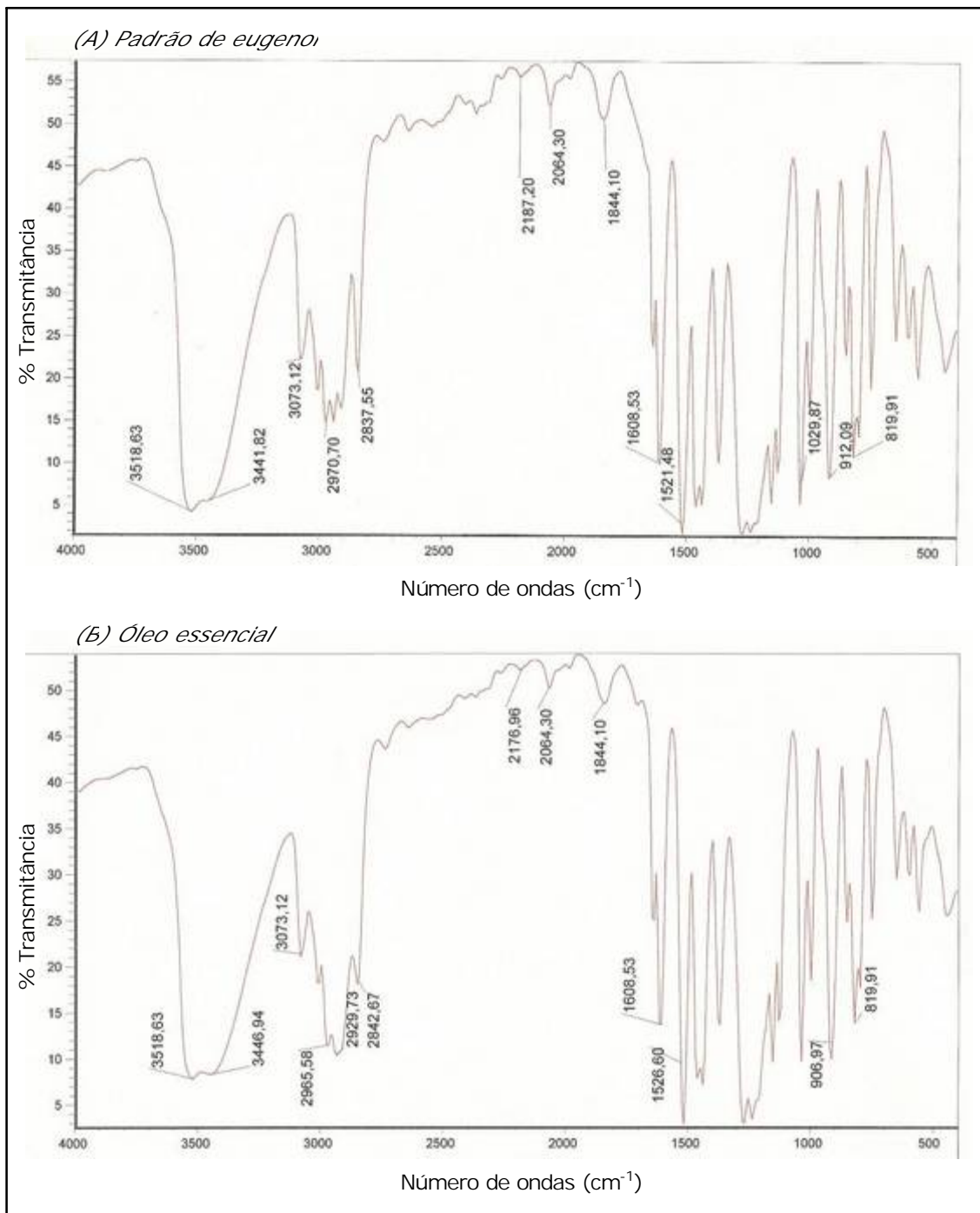
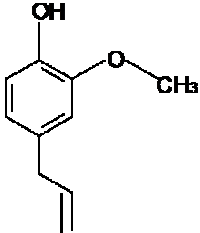
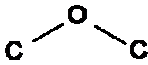
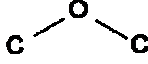


Figura 5.13. Espectros na região do infravermelho: (A) Padrão de eugenol. (B) óleo essencial de *Pimenta dioica* Lindl.

Tabela 5.2. Bandas de absorção e modos vibracionais do padrão de eugenol e do óleo essencial na região do Infravermelho.

Eugenol	Tipo de deformação	Grupo Funcional	Tipo de ligação	Absorção eugenol (cm ⁻¹)	Absorção óleo (cm ⁻¹)
	Axial	Hidroxila	O — H	3518,6	3518,5
	Axial	Aromático	C = C	1608,5	1608,5
	Angular plana	Hidroxila	O — H	1369,8	1372,9
	Axial	Aromático hidroxila	CO — H	1270,6	1270,5
	Axial assimétrica	Éter		1234,1	1234,7
	Axial simétrica	Éter		1029,8	1034,9
	Axial	Aromático	C — H	3073,1	3073,1
	Axial	Metila	C — H	2970,7	2965,5
	Axial	Alifático	C = C	1610,1	1615,0

5.3.1.3 - Análise por Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

Na Figura 5.14 estão apresentados os espectros de RMN ^{13}C em estado líquido do padrão de eugenol (A) e do óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* (B).

No espectro A da Figura 5.14 observam-se os 10 sinais relativos aos carbonos do eugenol. O sinal com deslocamento químico em torno de 143,9 ppm é relativo ao (C_1) do anel aromático, ligado ao grupo OH. O sinal em 146,5 ppm é devido ao (C_2) ligado ao grupo OCH_3 . Os sinais em 111,2; 121,2 e 115,5 ppm, são devidos aos (C_3), (C_5) e (C_6) do grupo do anel aromático, com grande intensidade. O sinal em 131,9 ppm é devido ao (C_4) ligado ao grupo CH_2CHCH_2 . Os sinais em 39,9; 114,4 e 137,9 ppm, são devidos aos (C_7), (C_9) e (C_8) dos grupos CH_2 e CH do grupo CH_2CHCH_2 . O sinal mais intenso em 55,8 ppm é devido ao (C_{10}) do grupo OCH_3 ligado ao anel aromático, o qual tem a maior intensidade devido às suas ligações aos três átomos de hidrogênios.

O espectro B é referente ao óleo essencial, no qual, assim como no caso do espectro A, predominam os sinais relativos aos átomos de carbonos do padrão de eugenol, apresentando praticamente os mesmos deslocamentos químicos dos átomos de carbonos, como se mostra na Tabela 5.3. Para o cálculo dos deslocamentos químicos teóricos, foram utilizados valores de grupos funcionais apresentados na literatura por SILVERSTEIN et al. (2007).

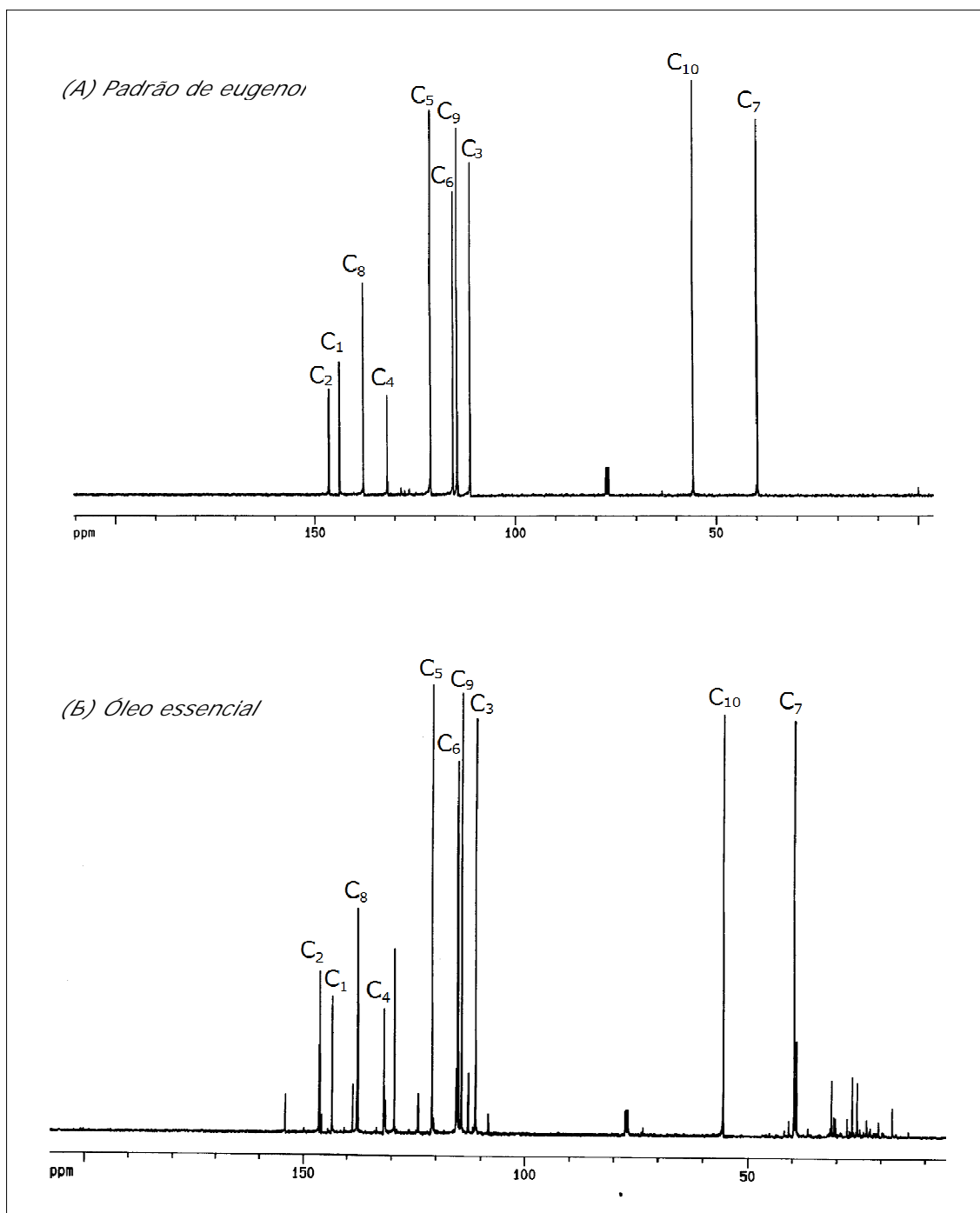
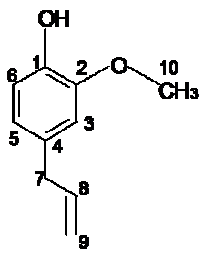


Figura 5.14. Espectros de RMN ¹³C: (A) Padrão de eugenol. (B) Óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica*.

Tabela 5.3. Deslocamentos químicos teóricos e experimentais de ^{13}C do eugenol e do óleo essencial (a partir do TMS) com suas respectivas multiplicidades.

Eugenol	Átomos	δ (ppm)			Multiplicidade
		Teórico	Padrão de eugenol	Óleo essencial	
	C-1	140,7	143,9	143,5	Singleto (s)
	C-2	147,2	146,5	146,4	Singleto (s)
	C-3	113,3	111,2	111,1	Dubleto (d)
	C-4	131,3	131,9	131,7	Singleto (s)
	C-5	122,4	121,1	120,9	Dubleto (d)
	C-6	116,8	115,5	115,2	Dubleto (d)
	C-7	34,4	39,9	39,6	Triplete (t)
	C-8	137,1	137,9	137,6	Dubleto (d)
	C-9	113,2	114,4	114,9	Triplete (t)
	C-10	54,1	55,8	55,4	Quartete (q)

5.3.2 - Análise por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas

Por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa, foi possível identificar dezesseis picos constituintes do óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* Lindl, os quais são apresentados na Figura 5.15 conforme a ordem de eluição.

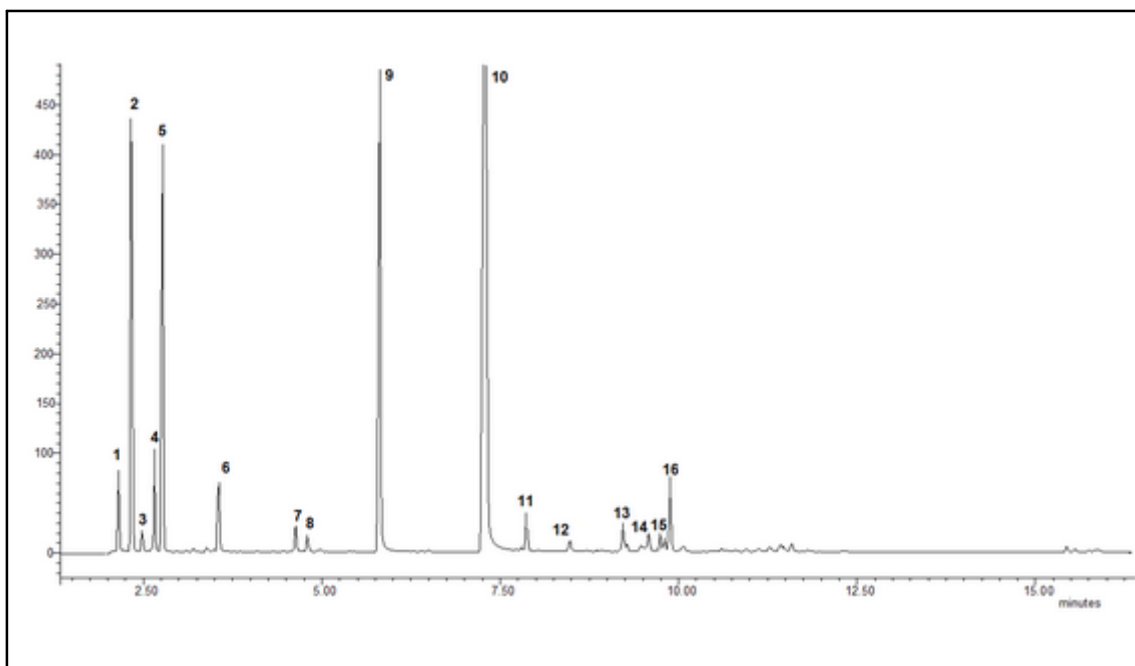


Figura 5.15. Cromatograma do óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* Lindl.

O cromatograma da Figura 5.15 mostra um pico mais intenso, com tempo de retenção em 7,384 minutos (pico 10), correspondente ao eugenol, o qual foi identificado por meio da comparação do seu espectro de massa com o fornecido pela espectroteca NIST02 (Figura 5.16) e com o espectro de massa do padrão de eugenol reportado por David et al. (2010). Os demais componentes também foram identificados utilizando-se a mesma metodologia adotada para o eugenol, além da comparação com os espectros de massa encontrados na literatura (ADAMS, 2007; SMITH, 2004).

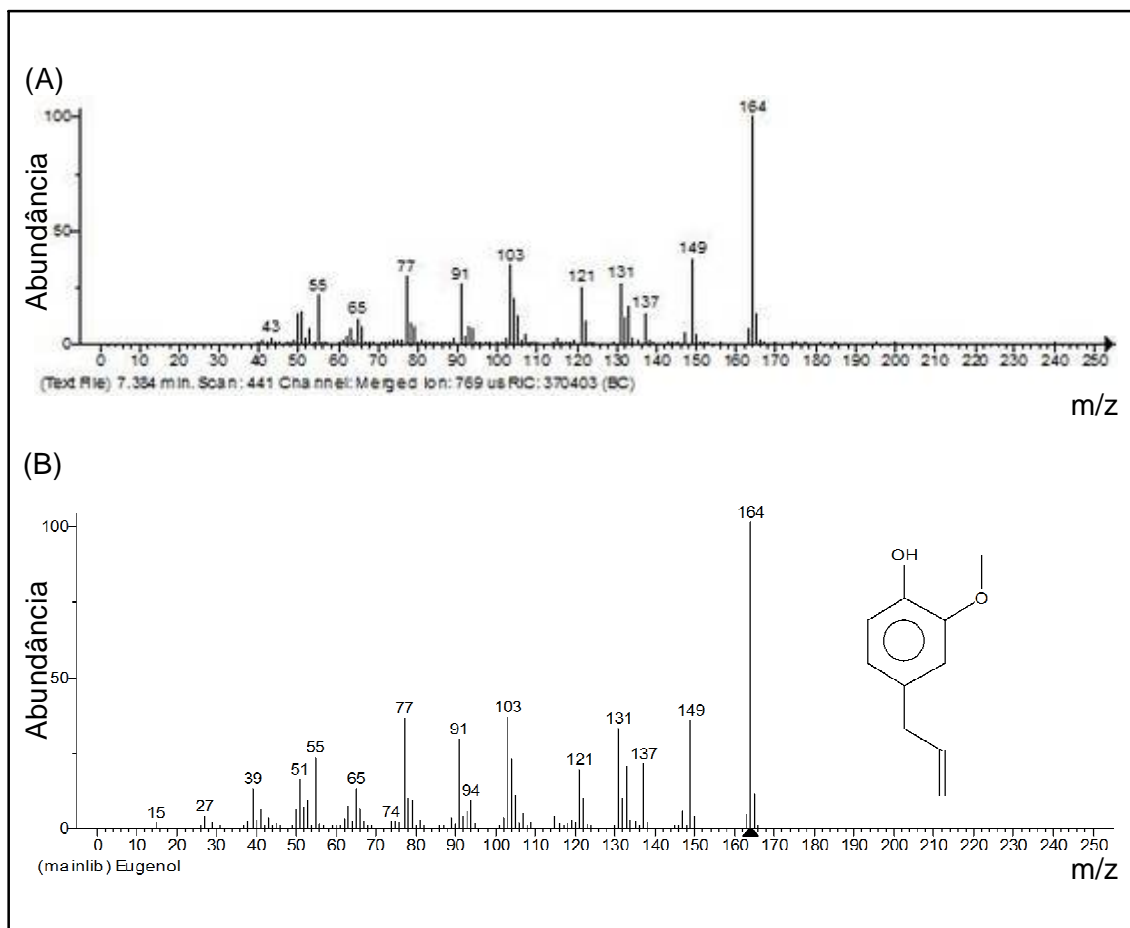


Figura 5.16. (A) Espectro de massas do pico cromatográfico de eugenol do óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* Lindl. (B) Proposta de identificação pela espectroteca NIST02.

O espectro de massas do óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* (Figura 5.16-A) mostra os principais fragmentos apresentados em abundância (%): 164 (100); 149 (39); 131 (32); 121 (23); 103 (34); 91 (34); 77 (46); 65 (20); 55 (39).

De acordo com SILVERSTEIN et al. (2007) fenóis apresentam um pico intenso correspondente ao íon molecular, o que facilita a sua identificação. Na Figura 5.16 o pico intenso com $m/z=164$ [M^+], corresponde à fórmula $C_{10}H_{12}O_2$, mostrando presença majoritária do eugenol no óleo.

Os espectros mostram ainda picos típicos da quebra de fenóis e éteres aromáticos, sendo o pico $m/z=149$ $[M - 15]$ característico da perda do radical metila ($\text{CH}_3\bullet$) e os picos $m/z=77$ e $m/z=65$ são correspondentes aos íons $[\text{C}_6\text{H}_5^+]$ e $[\text{C}_5\text{H}_5^+]$, respectivamente, originados por rearranjo – com a saída do grupo CO; já o fragmento com pico em $m/z=133$ $[M - 31]$ é referente à perda do grupo OCH_3 do éter (SILVERSTEIN et al., 2007).

O mecanismo de fragmentação dos principais picos característicos formados pelo eugenol está ilustrado na Figura 5.17 (CORTEZ et al., 1998).

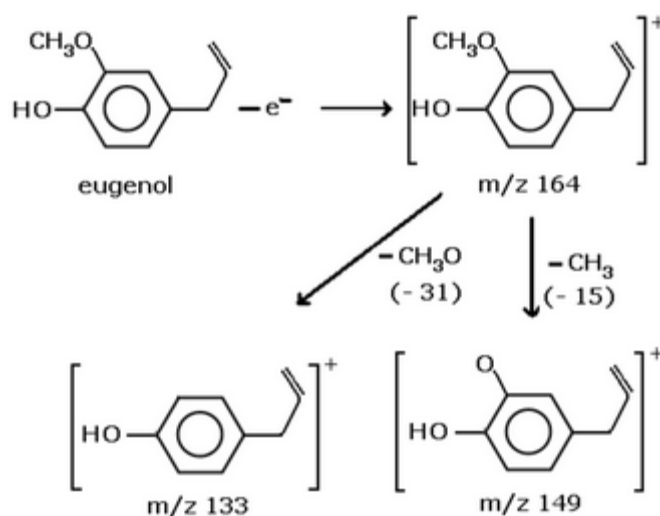


Figura 5.17. Fragmentação do eugenol e formação dos picos característicos.

Na Tabela 5.4 mostram-se os compostos presentes no óleo essencial, cujos picos foram apresentados no cromatograma da Figura 5.15. Verificam-se também os tempos de retenção de cada substância na coluna e o seu respectivo teor no óleo essencial. A quantificação do eugenol e dos demais componentes foram determinadas pela integração da área do pico correspondente. O alto teor relacionado ao pico 10 do cromatograma (74,04%) confirma esse composto como o componente majoritário do óleo essencial.

Tabela 5.4. Composição química do óleo essencial das folhas da Pimenta dioica Lindl.

Pico	Composto	TR ^a (min)	IR ^b	Teor (%)
1	1-octen-3-ol	2,17	980	1,38
2	β -pineno	2,35	975	6,51
3	α -pineno	2,49	930	0,30
4	o-cimeno	2,68	1025	1,97
5	Limoneno	2,76	1028	3,94
6	Linalol	3,58	1096	1,71
7	c.h.sabineno	4,65	969	0,21
8	α -terpineol	4,81	1192	0,17
9	5-indanol	5,83	1203	6,06
10	Eugenol	7,38	1362	74,06
11	α -cubebeno	8,20	1349	0,41
12	Cariofileno	8,62	1415	0,08
13	γ -muroleno	9,24	1478	0,27
14	α -cadineno	9,57	1515	0,17
15	α -muroleno	9,75	1499	0,24
16	δ -cadineno	9,87	1525	1,74

^a Tempo de retenção; ^b Índice de Retenção de Kovats

Relacionam-se a seguir os espectros de massas dos picos dos compostos mais abundantes apresentados na Figura 5.15 com as respectivas propostas de identificação por comparação com os dados da espectroteca NIST02 e com a literatura (ADAMS, 2007; SILVERSTEIN, 2007).

O espectro de massas referente à Figura 5.18(A) indica, com base na literatura (ADAMS, 2007) e na espectroteca NIST02, a presença no óleo essencial do composto β -pineno (pico 2, Figura 5.15).

O pico do íon molecular apresentou $m/z=136$, confirmando a fórmula $C_{10}H_{16}$. O pico de $m/z=93$ para o β -pineno é provavelmente produzido por uma estrutura de fórmula $C_7H_9^+$ formada por isomerização, seguida por clivagem alílica (SILVERSTEIN, 2007).

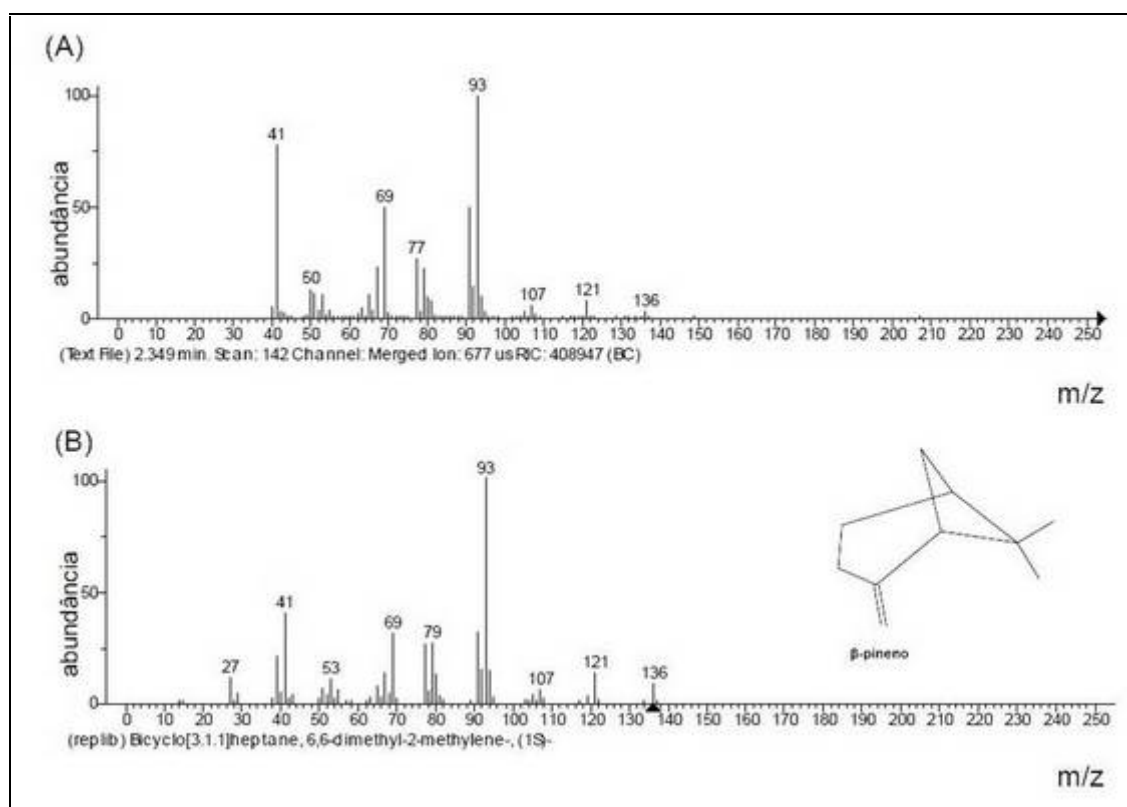


Figura 5.18. Espectros de massas: (A) Composto do pico 2 do cromatograma da Figura 5.15. (B) Propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

O espectro de massas da Figura 5.19(A), identificado como o-cimeno (pico 4, Figura 5.15), apresenta o pico do íon molecular com $m/z=134$, com fórmula $C_{10}H_{14}$, de baixa intensidade, característico de compostos aromáticos (SILVERSTEIN, 2007).

O pico de maior intensidade com $m/z=119$ [M-15] é proveniente da perda de um grupo metila. O pico com $m/z=91$ (44%) é característico do cátion tropílio ($C_7H_7^+$) e o pico de $m/z=65$ (9%) é resultante da eliminação neutra de acetileno (C_2H_2) do íon tropílio.

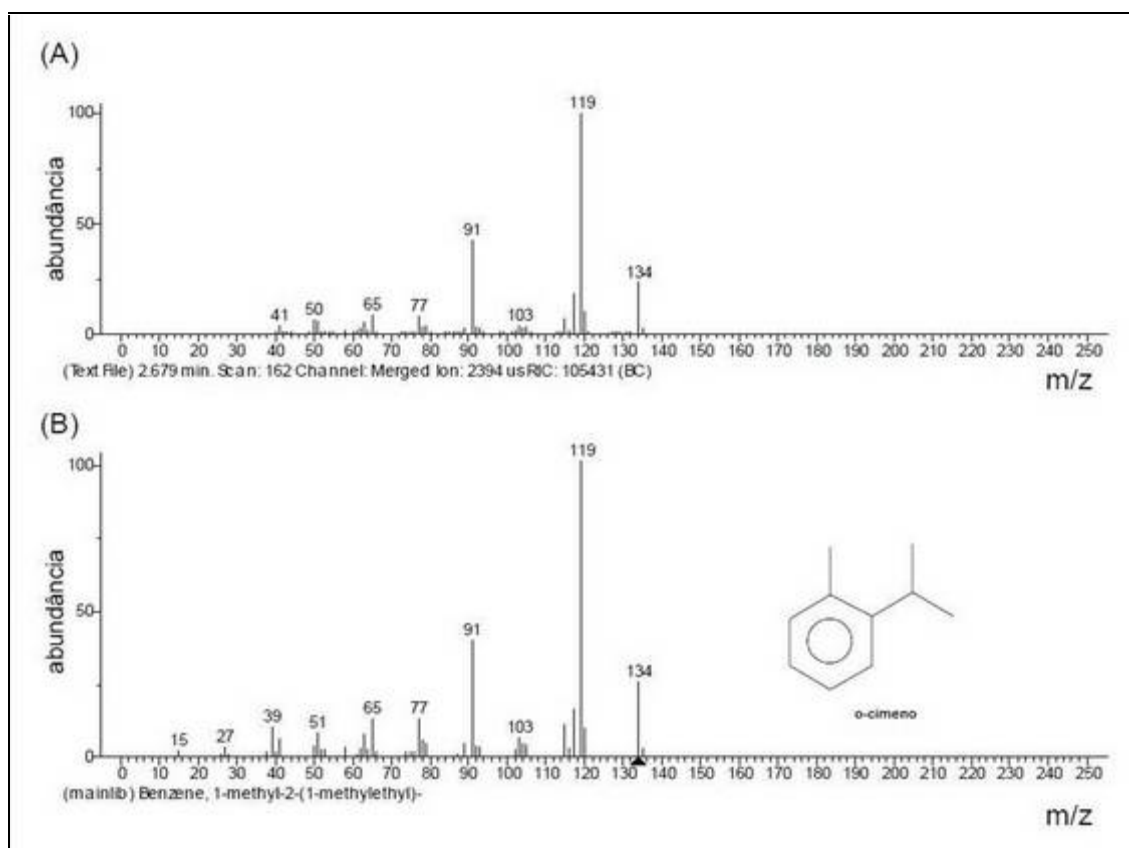


Figura 5.19. Espectros de massas: (A) Composto do pico 4 do cromatograma da Figura 5.15. (B) Propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

O espectro da Figura 5.20(A) sugere a presença do composto limoneno no óleo essencial (pico 5, Figura 5.15). O pico do íon molecular apresenta $m/z=136$ (13%), o que evidencia a fórmula $C_{10}H_{16}$.

O pico com $m/z=121$ [M-15] (19%), confirma a presença de um grupo metila como ramificação. O pico $m/z=93$ (66%) é provavelmente produzido por uma estrutura de fórmula $C_7H_9^+$. Alquenos cíclicos, como o limoneno, apresentam um modo especial de quebra, semelhante a uma reação *retro*-Diels-Alder com $m/z=68$ (38%) (Figura 5.21) (SILVERSTEIN, 2007).

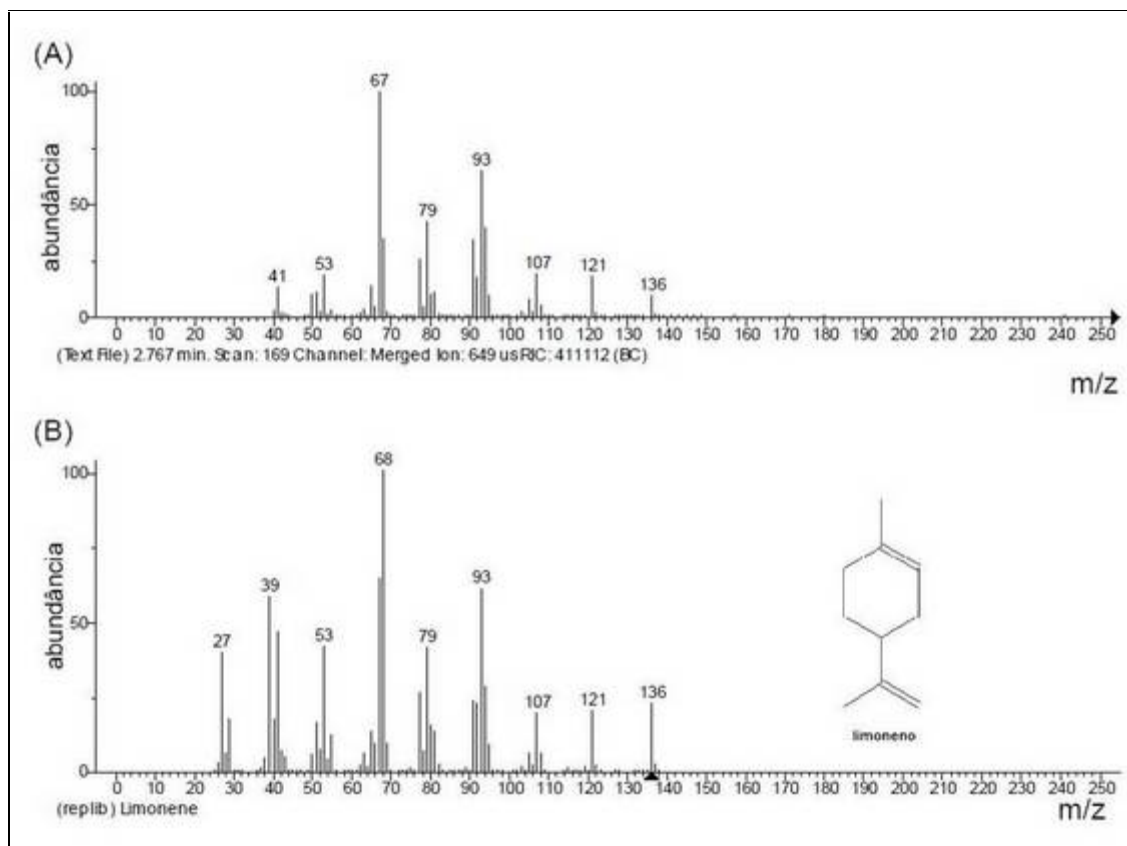


Figura 5.20. Espectros de massas: (A) Composto do pico 5 do cromatograma da Figura 5.15. (B) Propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

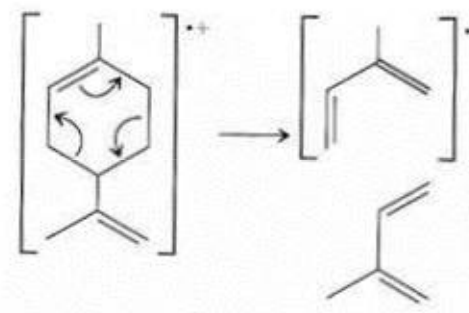


Figura 5.21. Fragmentação tipo reação *retro*-Diels-Alder do composto limoneno.

O espectro da Figura 5.22(A) foi relacionado ao linalol (pico 6, Figura 5.15), com pico do íon molecular $m/z=154$, confirmado como $C_{10}H_{18}O$ a sua fórmula molecular, de baixa intensidade, característico da alcoóis terciários. Os picos $m/z=136$ [M-18] (9%) e $m/z=121$ [M-18-15] (25%) são característicos da perda de água e do grupo metila, respectivamente.

Para alcoóis terciários, ocorre frequentemente a quebra de ligação C-C vizinha do átomo de oxigênio, com eliminação do maior grupo, o que fica evidenciado no pico de $m/z=71$ ($H_2C=CHCOH^+-CH_3$) e pelo pico de $m/z=83$. O pico com $m/z=93$ (78%) é devido à eliminação de água [M-18] e do grupo $C_3H_8^+$ [M-44] (SILVERSTEIN, 2007).

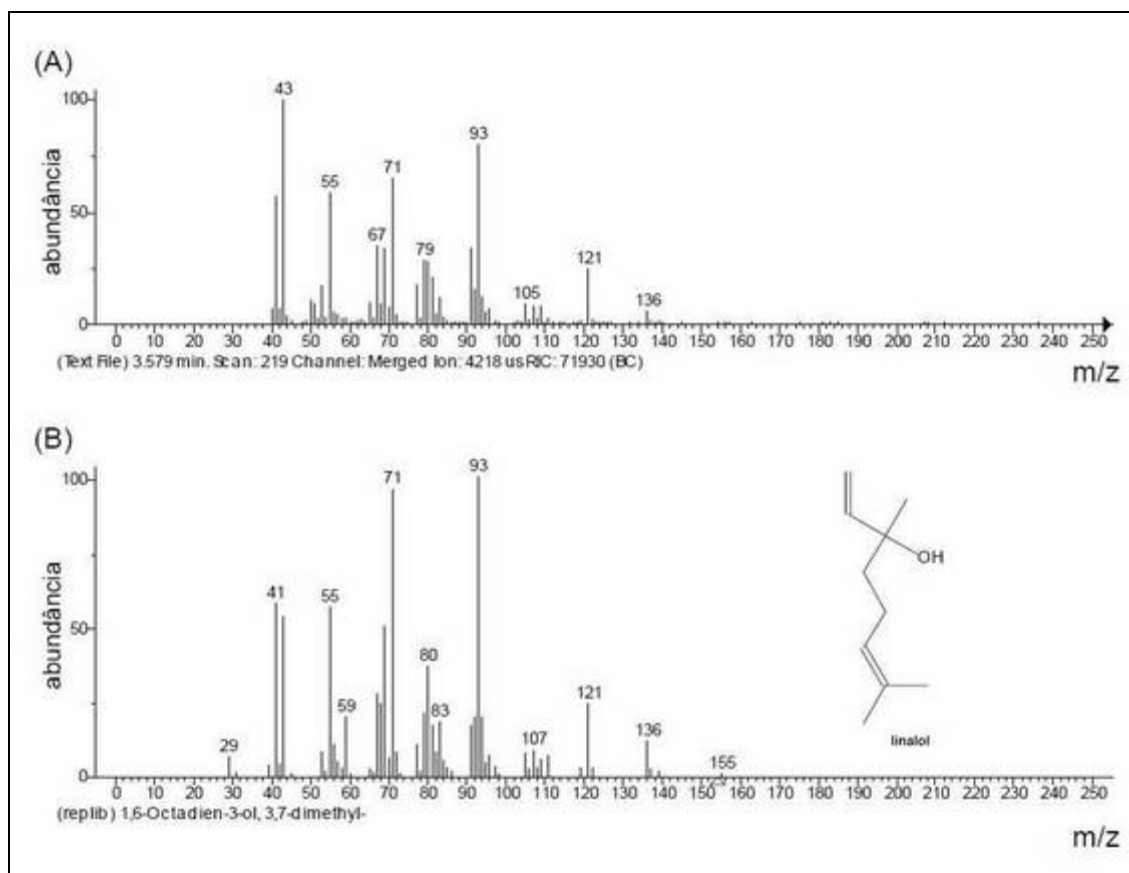


Figura 5.22. Espectros de massas: (A) Composto do pico 6 do cromatograma da Figura 5.15. (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

A Figura 5.23(A) refere-se ao espectro de massas do pico 9 da Figura 5.15, o 5-indanol. O pico do íon molecular apresenta $m/z=134$ (84%), com pico base de $m/z=133$ [M-1], característico de fenóis substituídos.

Um pico de $C_6H_5^+$ em $m/z=77$ (47%) é usualmente encontrado em fenóis (SILVERSTEIN, 2007).

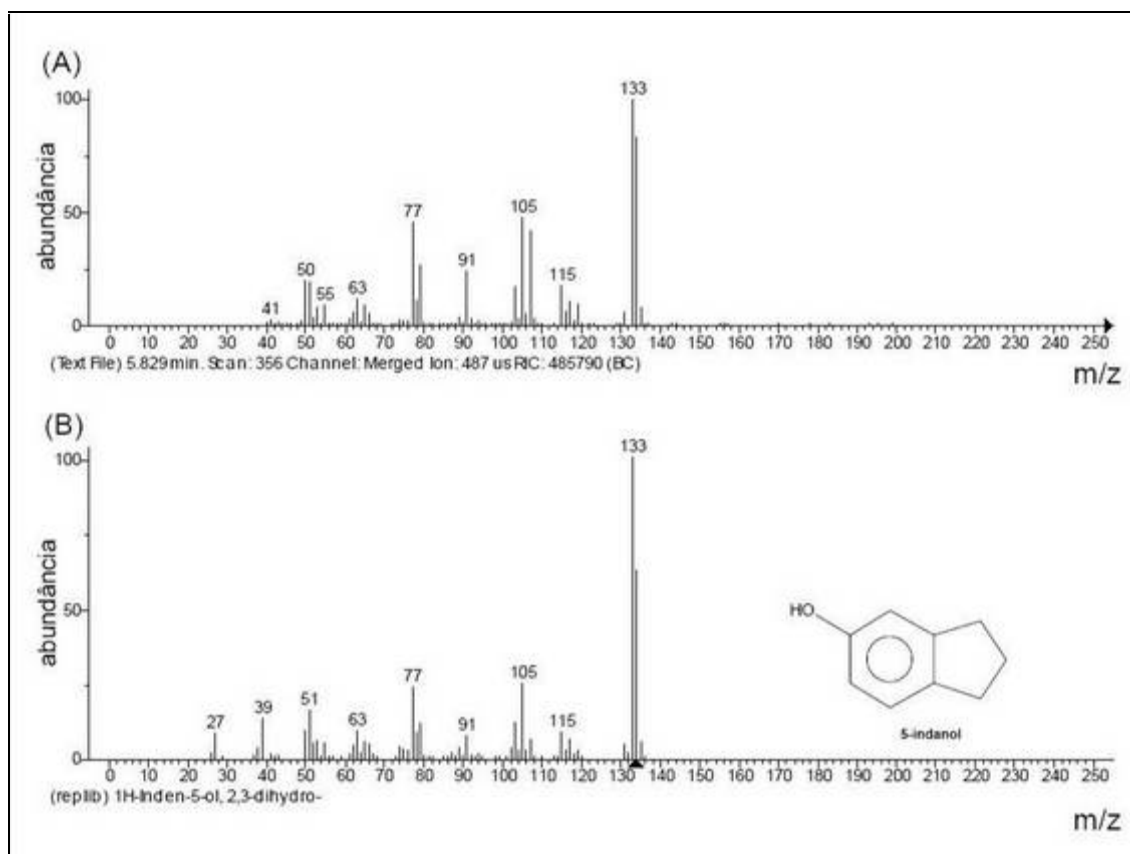


Figura 5.23. Espectros de massas: (A) Composto do pico 9 do cromatograma da Figura 5.15. (B) Propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

O espectro de massas da Figura 5.24(A) refere-se ao último pico da Figura 5.15: o componente δ -cadineno, identificado pela espectroteca NIST02 e confirmado por dados da literatura (ADAMS, 2007).

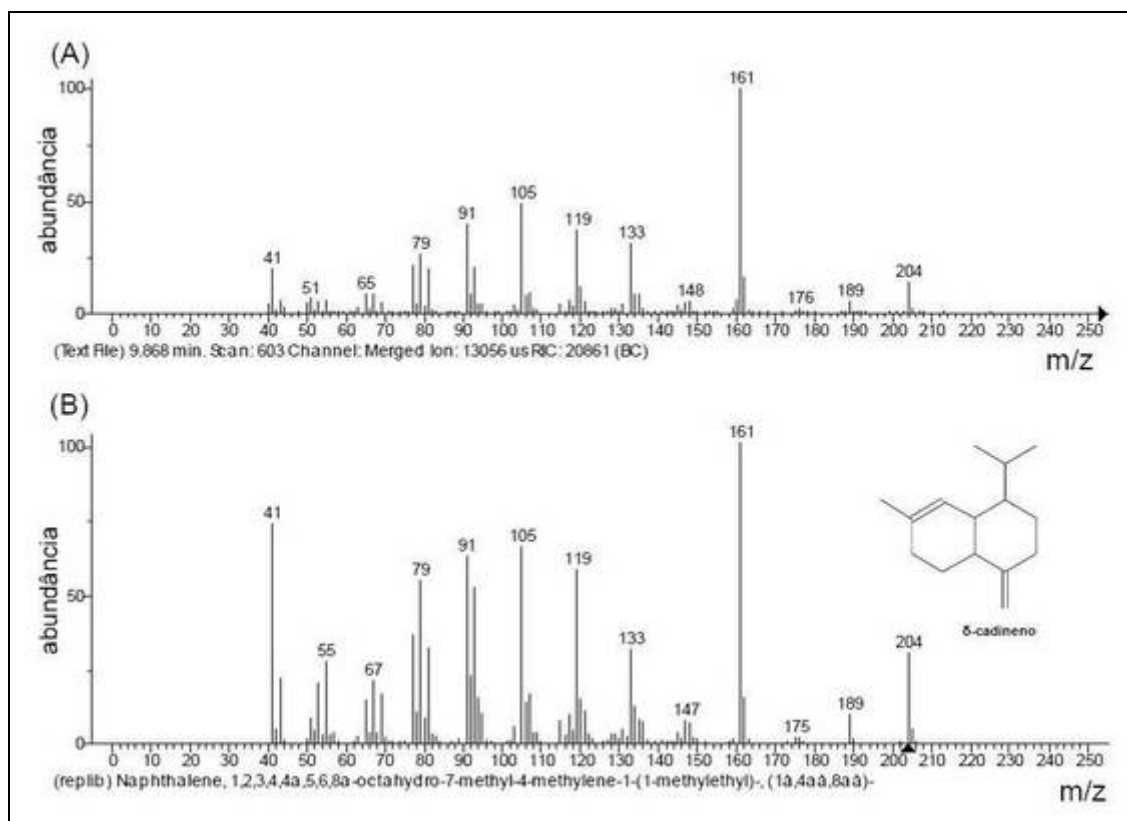


Figura 5.24. Espectros de massas: (A) Composto do pico 16 do cromatograma da Figura 5.15. (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

5.3.3 - Análise por Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica do eletrodo de carbono vítreo antes e após a difusão do eugenol mostra que quando o eletrodo é apenas polido (Figura 5.25.A), nenhuma resposta voltamétrica é obtida na região entre +1,20 e -0,20 V, em mistura de etanol/tampão-BR a 60%, pH 3,3 e na ausência de oxigênio. As ondas I/I', bem definidas em solução contendo o óleo essencial de *Pimenta dioica* e o eletrólito suporte, são atribuídas à resposta voltamétrica do composto eugenol difundido para a superfície do eletrodo de carbono vítreo, conforme mostra a Figura 5.25.B.

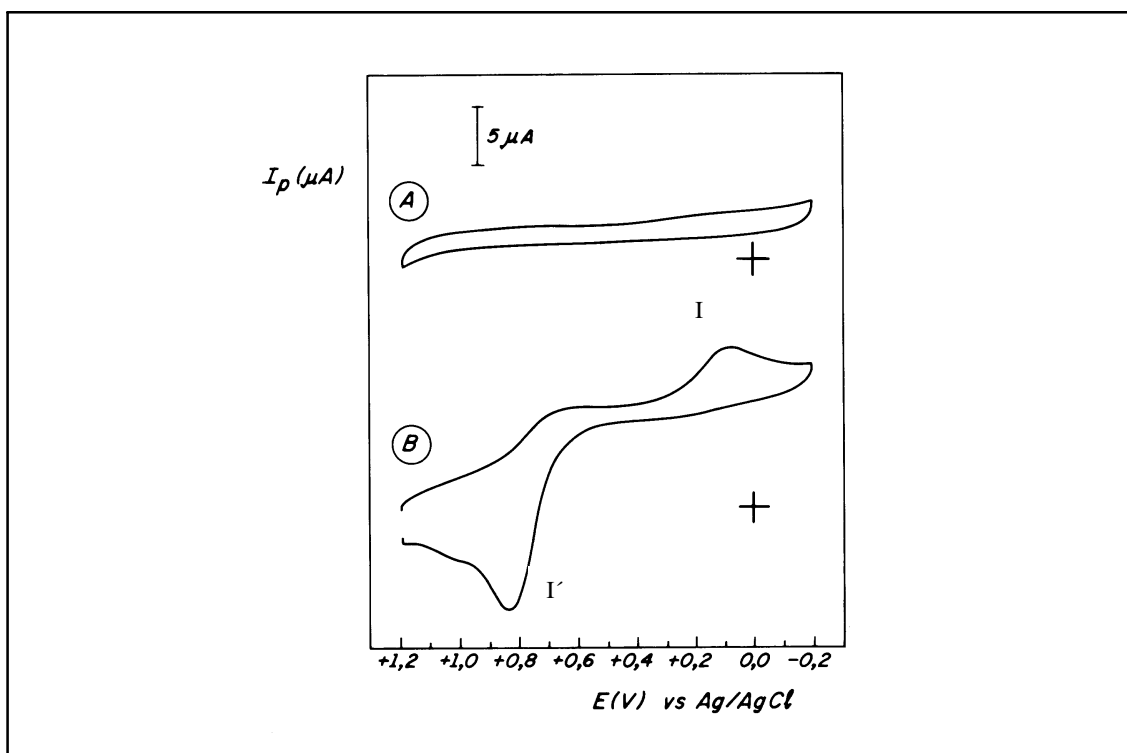


Figura 5.25. (A) Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo recém polido. (B) Voltamograma cíclico do óleo essencial registrado em eletrólito suporte (etanol/tampão a 60 %), pH 3,3; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

O comportamento eletroquímico de compostos fenólicos (eugenol), apresentado pelas ondas I/I', são atribuídos a um processo redox, o qual é devido ao grupo hidroxila da molécula de eugenol, originando compostos do tipo p-benzoquinonas (MOUCHREK FILHO et al., 1998).

Pelo comportamento do sistema, as ondas I/I' (Figura 5.25) são atribuídas a um processo difusional, o qual é confirmado pela relação linear entre a corrente de pico (I_{pa} e I_{pc}) e a raiz da velocidade de varredura do potencial ($v^{1/2}$), apresentado na Figura 5.26.

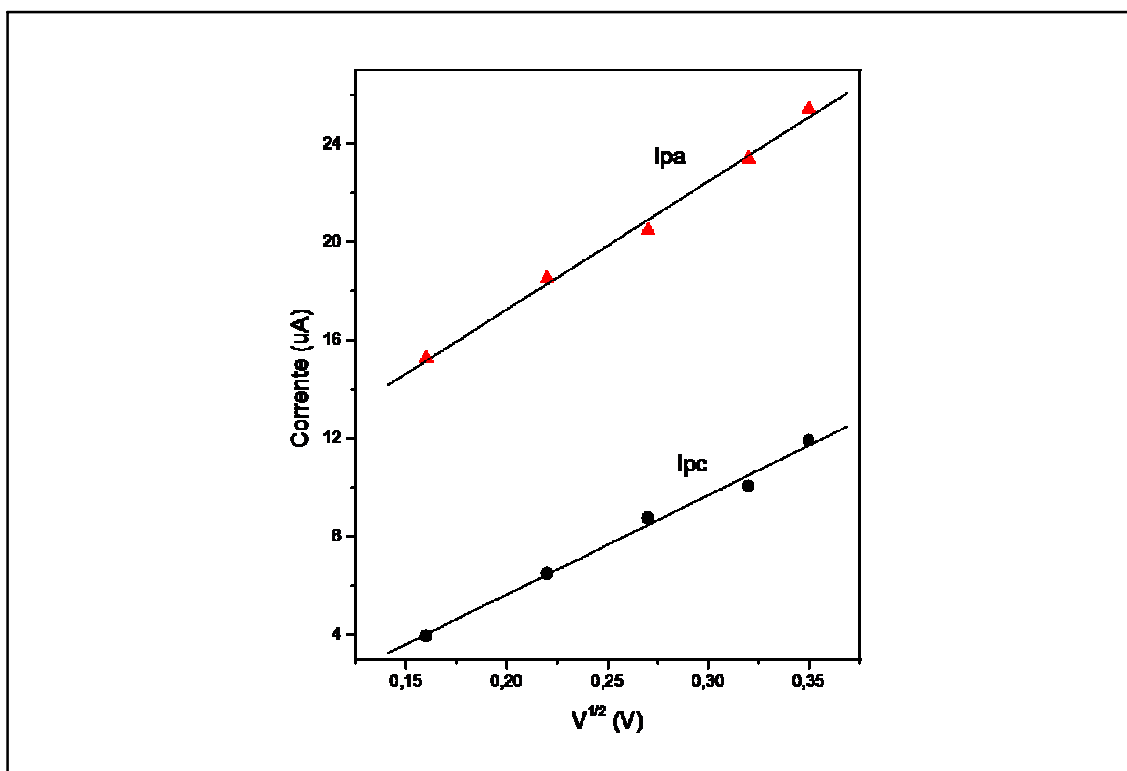


Figura 5.26. Dependência da corrente de pico da onda I/I' com a raiz quadrada da velocidade de varredura do potencial.

O estudo da dependência do potencial formal pelo pH da solução, para o padrão de eugenol, é apresentado na Figura 5.27. O potencial formal do composto é estimado pela média dos potenciais de pico das ondas I e I'. Os resultados apresentaram um coeficiente angular de $-0,26 \text{ mV pH}^{-1}$, o qual é muito próximo da metade do valor de $-0,59 \text{ mV pH}^{-1}$, esperado teoricamente para uma meia reação eletroquímica, envolvendo uma razão unitária entre prótons e elétrons. No caso da reação do eugenol, o valor de $-0,26 \text{ mV pH}^{-1}$ é atribuído a uma razão fracionada de um próton para dois elétrons.

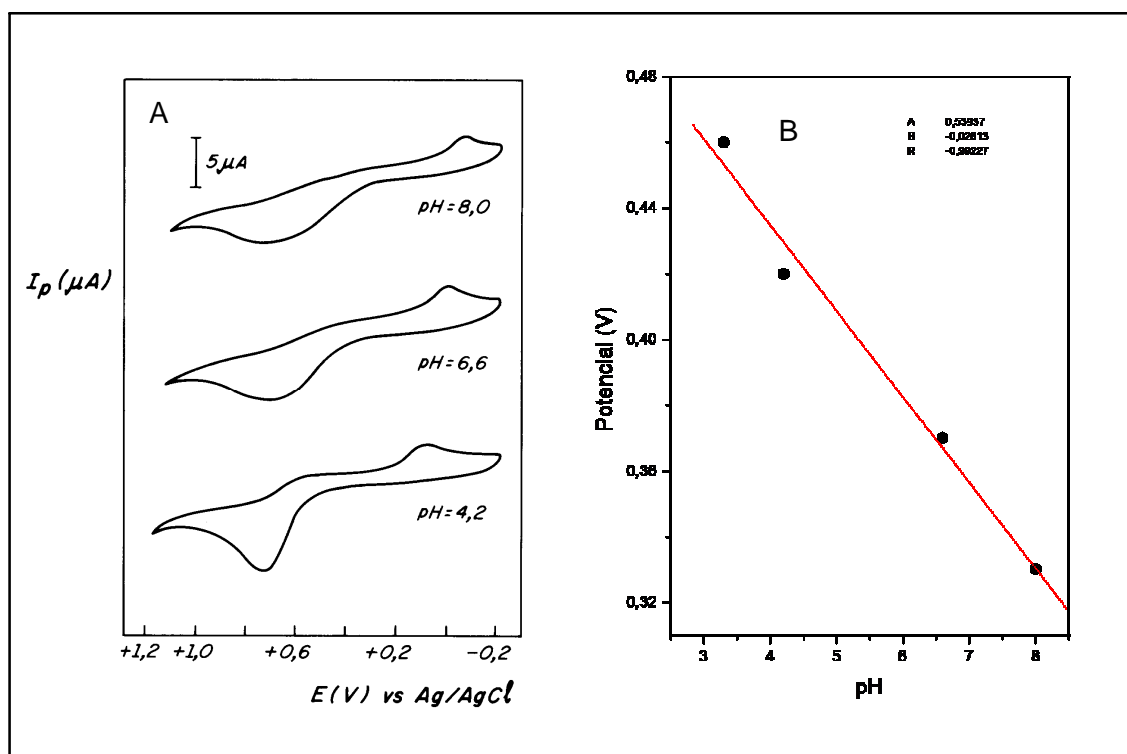


Figura 5.27. (A) Voltamograma cíclico do eugenol em função do pH, alterado por adição de 1 mol L^{-1} de NaOH. A velocidade de varredura do potencial foi de 50 mV s^{-1} . (B) Dependência do potencial formal do eugenol em função do pH na faixa de 3 a 8.

A diminuição da corrente de pico observado na Figura 5.28, é atribuída à reação do grupo fenólico do eugenol com o hidróxido de sódio adicionado para o aumento do pH, gerando o fenolato de sódio e reduzindo a concentração do eugenol na mistura de etanol/tampão.

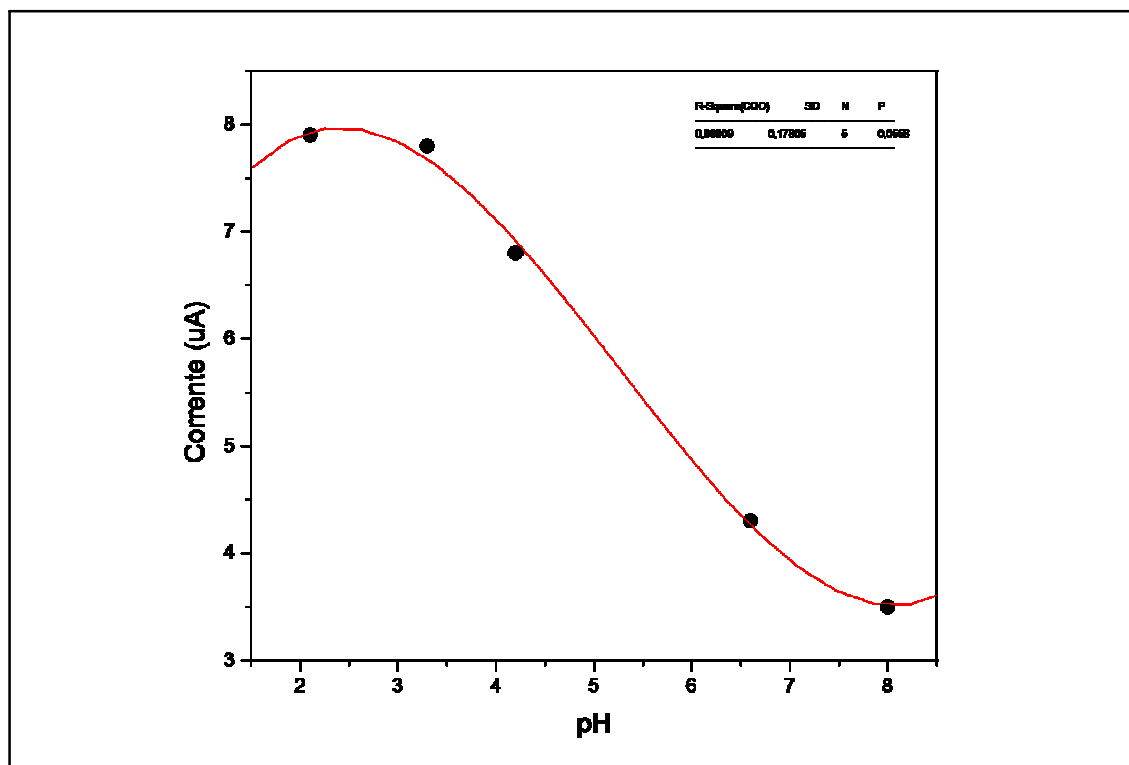


Figura 5.28. Dependência da corrente de pico anódica em função do pH na faixa 3 a 8.

5.3.4 - Quantificação de eugenol

5.3.4.1 - Quantificação por Cromatografia Gasosa

Para avaliar a concentração cromatográfica construiu-se um gráfico registrando a concentração de eugenol pelo valor médio ($n = 4$) das respectivas áreas e interpolando-se o valor da amostra.

Na Figura 5.29 mostra-se a determinação quantitativa do eugenol por CG, usando o método do padrão externo baseado no aumento da área do pico do cromatograma, em função do aumento da concentração de eugenol da solução padrão, na faixa de $6,1 \times 10^{-3}$ a $2,5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ (n = 4). A curva analítica apresentou um excelente coeficiente de correlação (r = 0,9998).

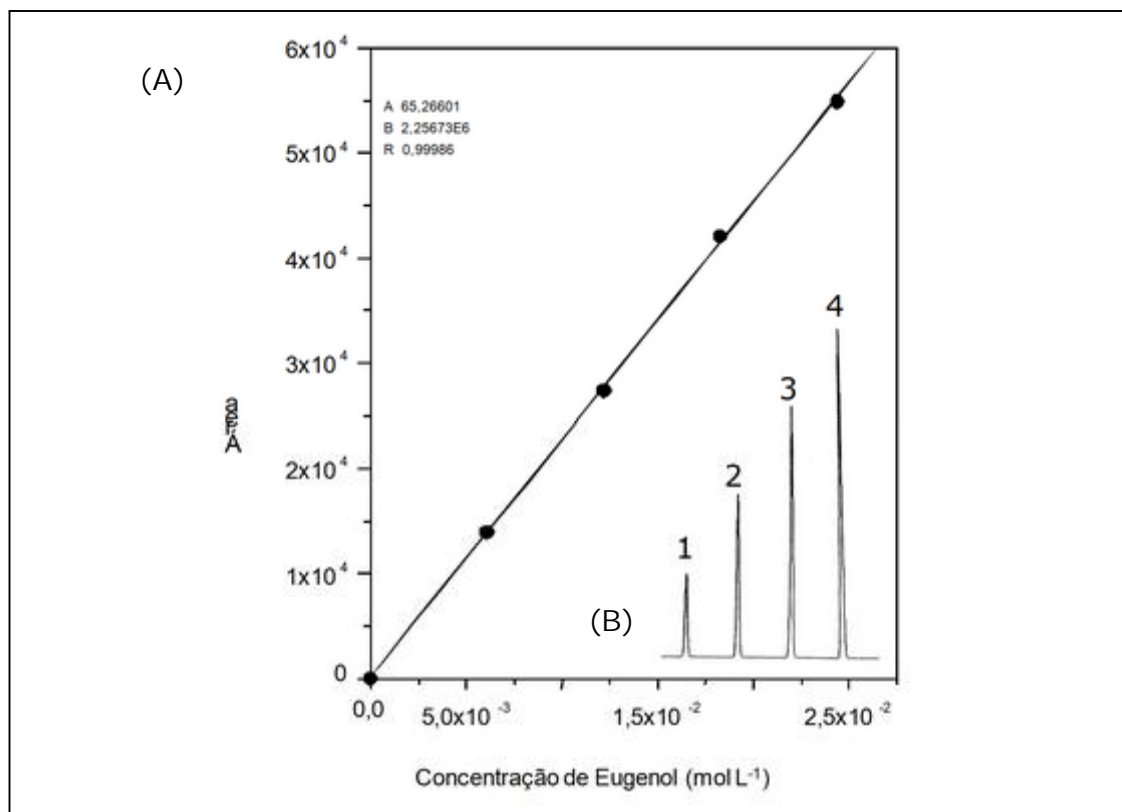


Figura 5.29. (A) Curva analítica e (B) Picos cromatográficos para as soluções contendo concentrações de padrão de eugenol: (1) $0,6 \times 10^{-2}$; (2) $1,2 \times 10^{-2}$; (3) $1,8 \times 10^{-2}$ e (4) $2,4 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹.

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

Pela quantificação cromatográfica (Figura 5.29) determinou-se o teor de eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da *Pimenta dioica* Lindl em $74,0 \pm 0,50\%$.

5.3.4.2 - Quantificação por Espectrometria na Região UV

A quantificação do eugenol no óleo essencial é mostrada na Figura 5.30, onde se observa a dependência da absorbância em função da concentração de eugenol. Os espectros de absorção foram obtidos por várias concentrações desse composto e a curva de adição padrão nos intervalos de $1,0 \times 10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. A determinação quantitativa do eugenol por espectrometria de UV foi acompanhada pelo aumento da absorção da banda do anel aromático ($\lambda_{\text{máx}}=280\text{nm}$), em função do aumento da concentração do eugenol no óleo. A curva analítica de adição padrão foi caracterizada pelo coeficiente de correlação ($r = 0,9988$).

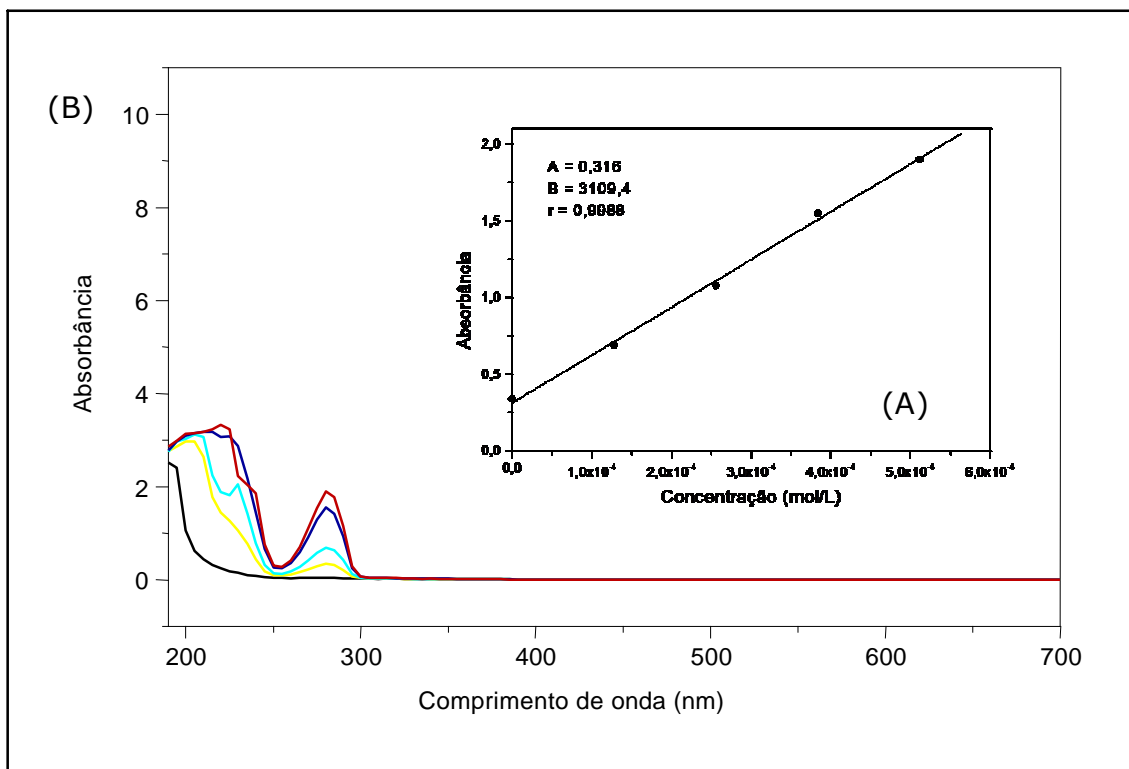


Figura 5.30. (A) Curva de adição padrão de solução contendo 20 μ L de solução estoque preparada com 100 μ L de amostra de óleo essencial, em 10mL de solução etanol/água a 60%. (B) Espectros de absorção da amostra e das concentrações do padrão de eugenol.

Utilizando-se a técnica de adição padrão determinou-se o teor de eugenol contido no óleo das folhas da *Pimenta dioica* Lindl em $76,2 \pm 0,30\%$.

5.3.4.3 - Quantificação por Voltametria Cíclica

A quantificação do eugenol pela técnica eletroanalítica de voltametria cíclica é mostrada na Figura 5.31.

A Figura 5.31A apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para várias concentrações de eugenol e na Figura 5.31B as curvas analíticas na faixa de $2,5 \times 10^{-4}$ a $20,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

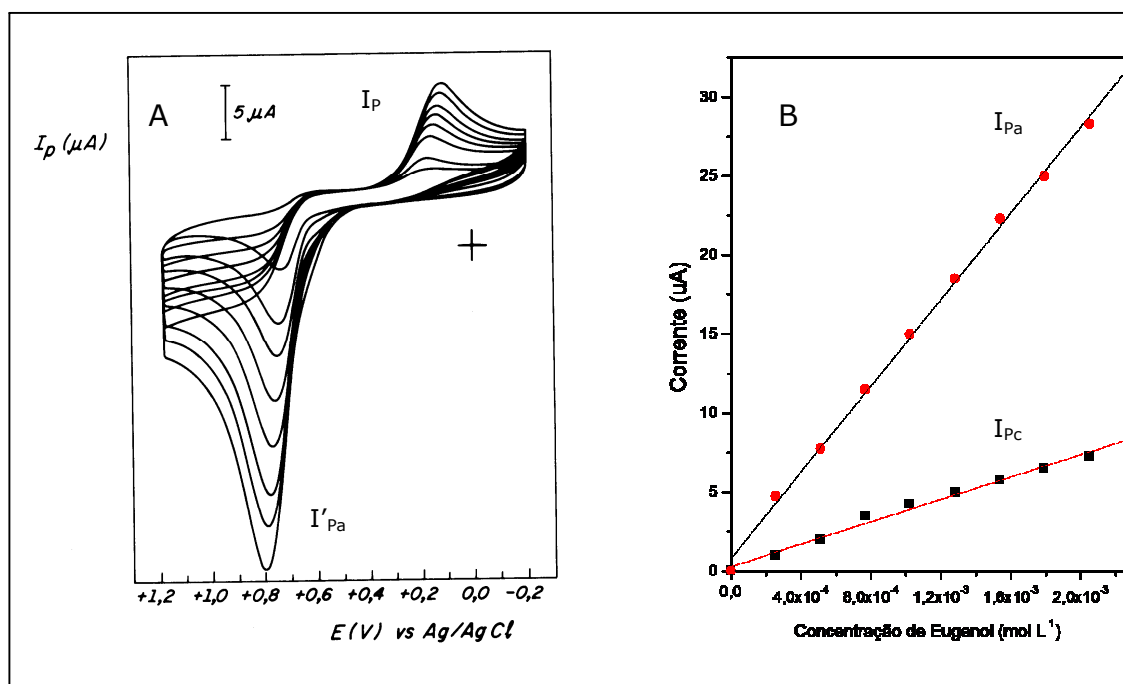


Figura 5.31. (A) Voltamogramas cíclicos. (B) Curvas analíticas do padrão de eugenol na faixa de concentração: $2,5 \times 10^{-4}$ a $20,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Registrados em eletrólito suporte (etanol/tampão a 60%), pH 3,3; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

As curvas analíticas da Figura 5.31 são caracterizadas pelos coeficientes de correlação $r = 0,9981$ e $r = 0,9923$ e desvios padrões (0,464 e 0,298), para os picos anódicos e catódicos, respectivamente.

A concentração média de eugenol nas folhas da *Pimenta dioica* Lindl foi calculada em $77,8 \pm 0,36\%$.

5.3.5 - Comparação entre os Métodos e Técnicas Utilizados para a Quantificação do Eugenol

A partir dos resultados obtidos pelas técnicas cromatográfica, espectrofotométrica e voltamétrica, e dos métodos de curva de padrão externo e de adição padrão, foi possível comparar e avaliar a utilização dessas técnicas aplicadas às determinações qualitativas e quantitativas do eugenol no óleo essencial da *Pimenta dioica*, conforme se mostra na Tabela 5.5.

Tabela 5.5. Comparação entre as técnicas analíticas de cromatografia, espectrofotometria e voltametria para determinação quantitativa de eugenol no óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl.

Técnicas Analíticas	Métodos Quantitativos	Concentração de eugenol (%)
Cromatografia Gasosa	Curva de Padrão Externo	$74,0 \pm 0,50$
Espectrofotometria UV	Curva de Adição Padrão	$76,2 \pm 0,30$
Voltametria Cíclica	Curva de Padrão Externo	$77,8 \pm 0,36$

Os resultados médios para a concentração de eugenol na Tabela 5.5 apresentam proximidade, sem grandes variações (de 74,0 a 77,8%), para um intervalo de confiança a 95% de probabilidade ($n = 5$).

5.4 - ANÁLISE TÉRMICA

Na Figura 5.32 mostram-se as curvas TG-DTA para 10mg do óleo essencial em atmosfera de nitrogênio.

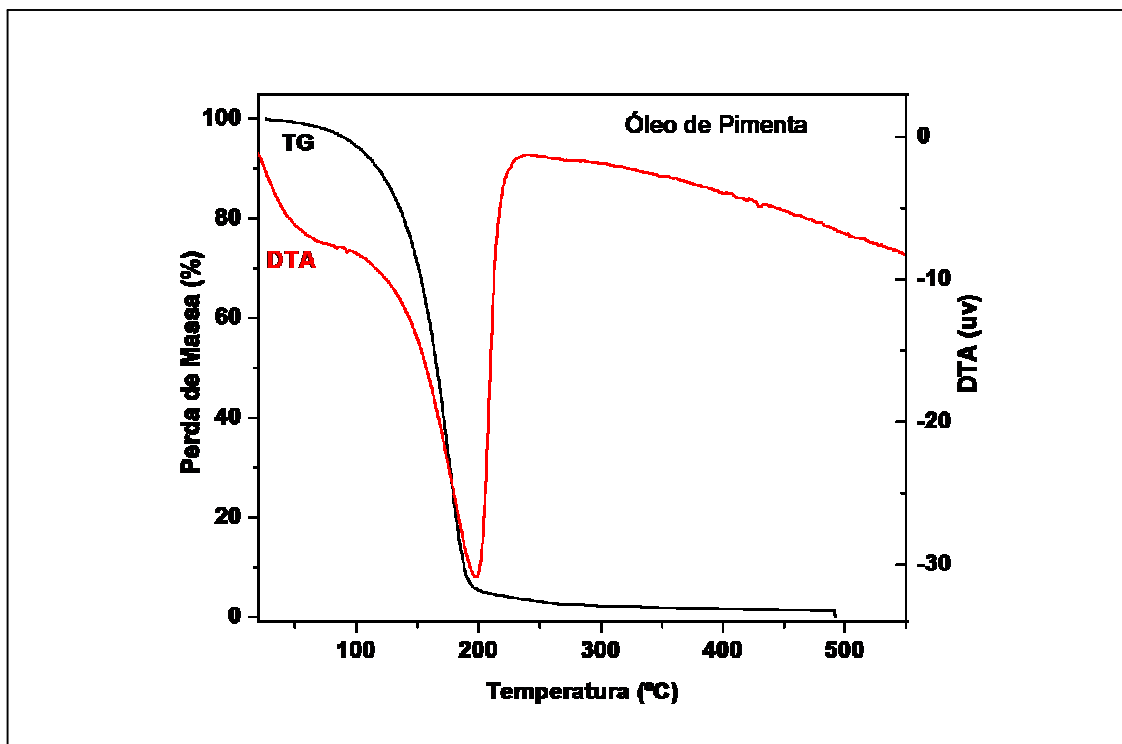


Figura 5.32. Curvas TG-DTA para o óleo essencial das folhas de *Pimenta dioica* Lindl em atmosfera de nitrogênio à taxa de aquecimento de 10 °C/min.

Em relação ao comportamento térmico do óleo essencial de pimenta, percebe-se na Figura 5.32 que este obteve uma única etapa de decomposição entre 142 e 192°C (temperatura de pico: 164°C) com perda de 97% da massa (9,7 mg), sendo a mesma devido ao processo de volatilização de alguns componentes do óleo.

5.5 - ATIVIDADE LARVICIDA

A atividade larvicida do óleo essencial extraído das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl foi testada em seis concentrações diferentes: 20, 50, 70, 90, 100 e 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo n é o número de larvas do mosquito *Aedes aegypti* utilizadas no ensaio larvicida para cada concentração (totalizando 10 larvas por ensaio).

Para cada concentração os testes foram realizados em quintuplicata. 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 seis concentrações testadas (Tabela 5.6).

Tabela 5.6. Mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição em várias concentrações do óleo essencial extraído das folhas da espécie vegetal *Pimenta dioica* Lindl.

Dose, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Log dose	Mortos	Vivos	Acumul. mortos	Acumul. vivos	Mortalidade %
120	2,0791	10	0	48	0	100
100	2,0000	10	0	38	0	100
90	1,9542	10	0	28	0	100
70	1,8451	10	0	18	0	100
50	1,6989	6	4	8	4	60
20	1,3010	2	8	2	12	20

Número de larvas ($n = 10$).

De acordo com a Tabela 5.6, a concentração de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl apresentou a menor atividade larvicida, matando, em média, duas larvas, o que corresponde a 20% de mortalidade. A partir da concentração de 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do óleo essencial a atividade larvicida foi constante, provocando a morte de 100% dos indivíduos testados, ou seja, 10 larvas.

A taxa de percentagem da mortalidade das larvas frente o óleo é mostrada na Figura 5.33, mostrando-se constante a partir do Log dose 1,8451 (concentração $70 \mu\text{g mL}^{-1}$).

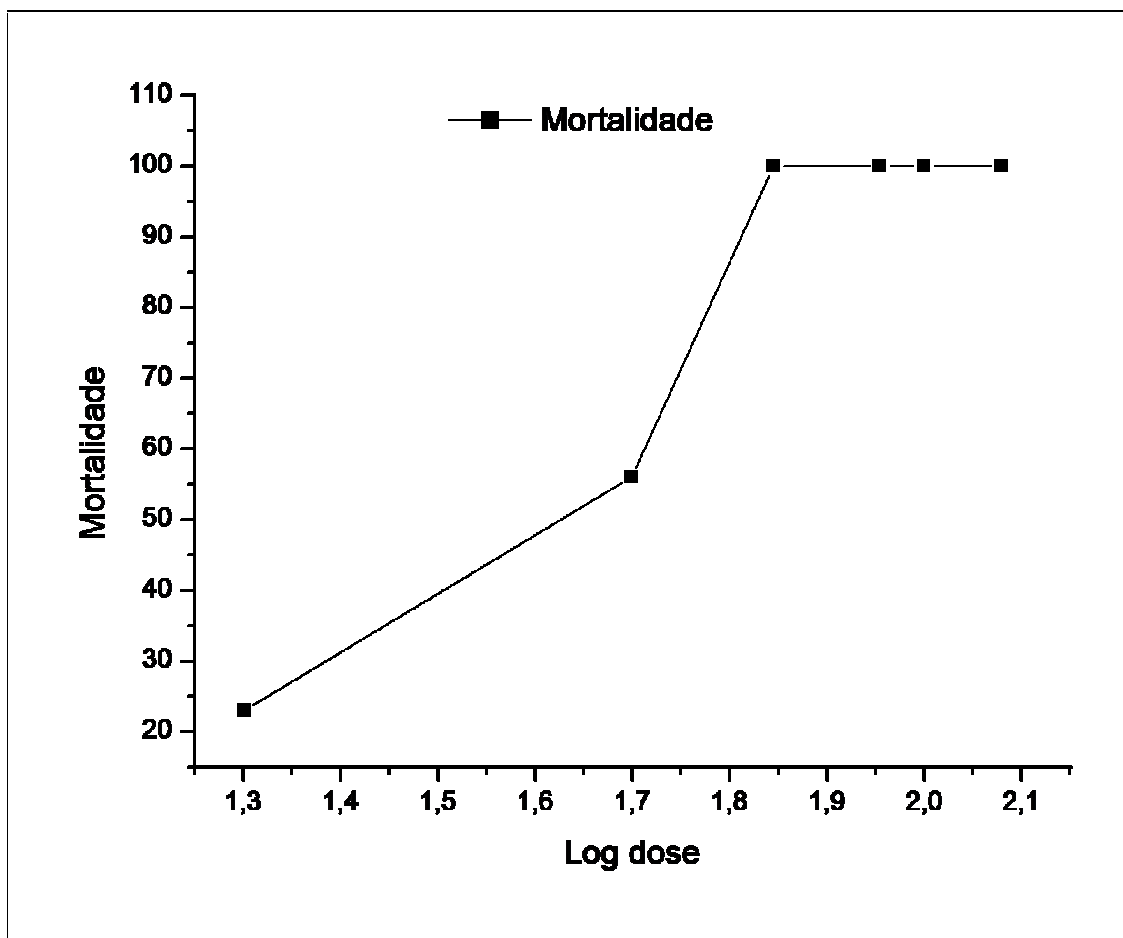


Figura 5.33. Taxa de mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* – expostas a seis concentrações diferentes do óleo essencial de *Pimenta dioica* Lindl, após 24 horas – versus o logaritmo de cada dose aplicada.

A Figura 5.34 mostra que a Concentração Letal 50% (CL_{50}), concentração na qual cinquenta por cento das larvas testadas morrem, foi encontrada próxima ao Log dose 1,69 (abaixo da concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$). De acordo com CHENG et al. (2003) valores de $CL_{50} < 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados ativos.

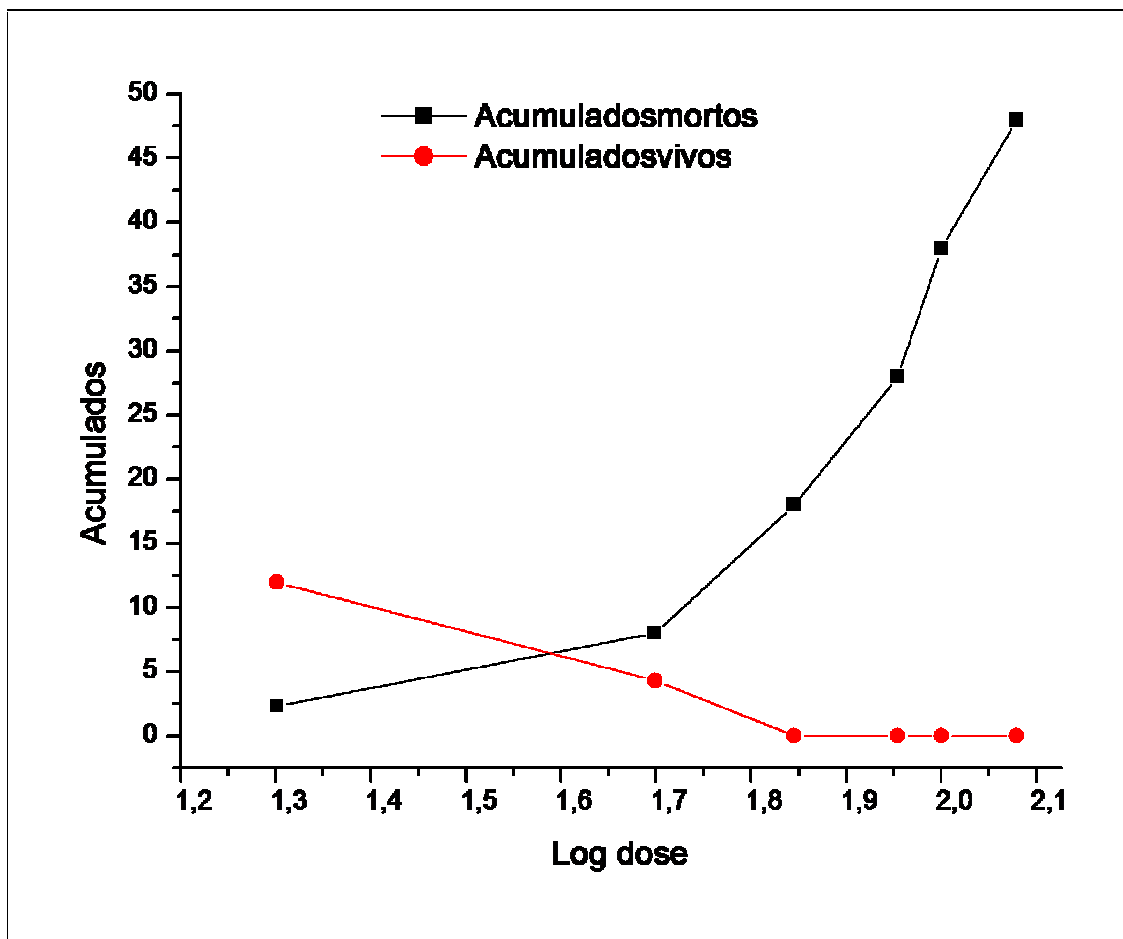


Figura 5.34. Estimativa da CL_{50} do óleo essencial de *Pimenta dioica* Lindl pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL_{50} é o ponto de intersecção das duas curvas.

A dose letal 50% para o óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl foi calculada através da intersecção das curvas de indivíduos acumulados mortos e indivíduos acumulados vivos da Figura 5.34, tendo como resultado a concentração de $38,86\mu\text{g mL}^{-1}$ com um intervalo de confiança de $2,25\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para o padrão de eugenol, componente majoritário do óleo essencial da espécie *Pimenta dioica* Lindl, a atividade larvicida foi testada nas mesmas seis concentrações do óleo essencial, sendo n o número de larvas do mosquito *Aedes aegypti* utilizadas no ensaio para cada concentração, num total de 10 larvas por ensaio.

De forma análoga ao óleo, para cada concentração os testes foram realizados em quintuplicata. Os dados sobre o número de larvas vivas e mortas foram encontrados através de uma média das cinco repetições para cada uma das seis concentrações testadas (Tabela 5.7).

Tabela 5.7. Mortalidade das larvas do *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição em várias concentrações padrão de eugenol.

Dose, $\mu\text{g mL}^{-1}$	Log dose	Mortos	Vivos	Acumul. Mortos	Acumul. vivos	Mortalidade %
120	2,0791	10	0	30	0	100
100	2,0000	9	1	20	1	90
90	1,9542	8	3	11	4	80
70	1,8451	2	7	3	11	20
50	1,6989	1	9	1	20	10
20	1,3010	0	10	0	30	0

Número de larvas ($n = 10$).

Analisando-se a Tabela 5.7 verifica-se que para o padrão de eugenol, a concentração de $20\mu\text{g mL}^{-1}$ não apresentou atividade larvicida. A concentração de $120\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou a maior atividade, provocando a morte de 100% dos indivíduos testados.

A taxa de percentagem da mortalidade das larvas frente o padrão de eugenol é mostrada na Figura 5.35, apresentando 100% de mortalidade no Log dose 2,0791 (concentração $120\mu\text{g mL}^{-1}$).

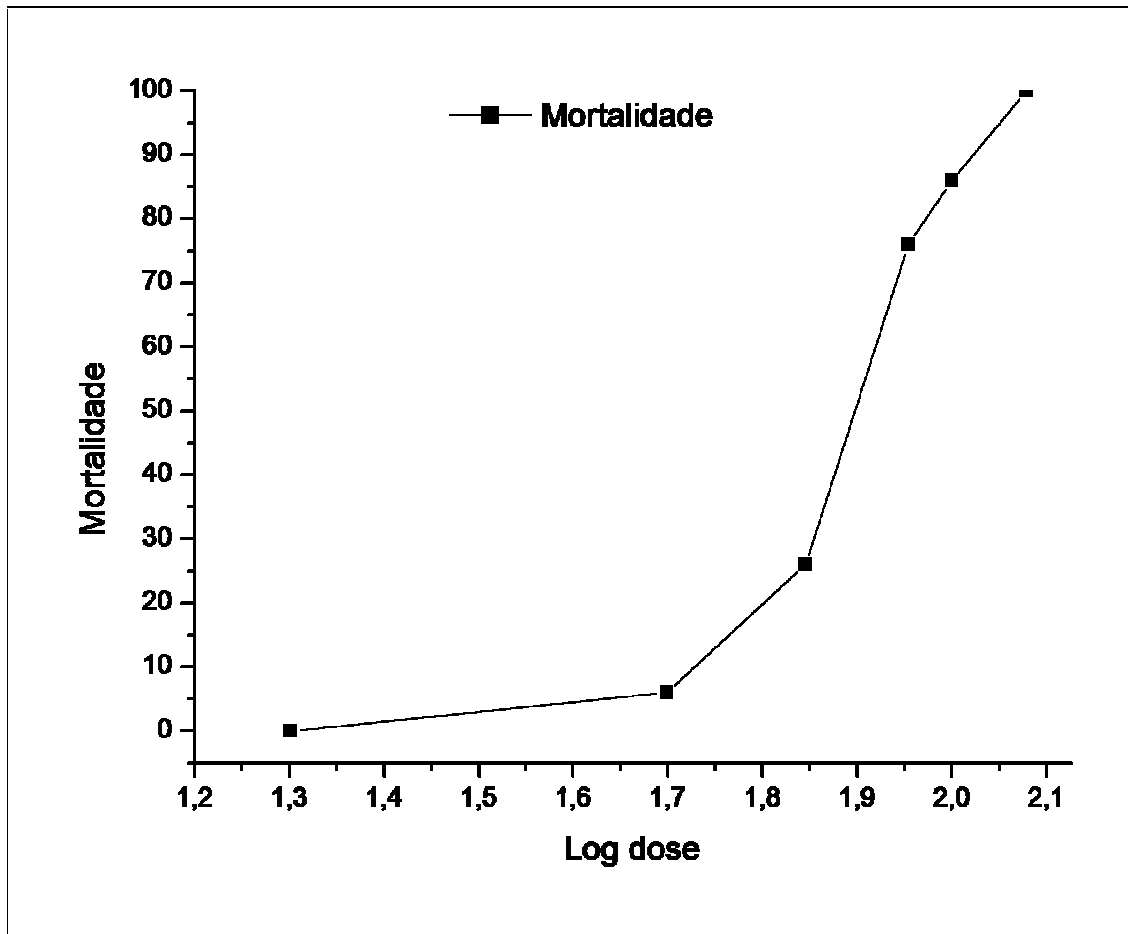


Figura 5.35. Taxa de mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* expostas a seis concentrações diferentes do padrão de eugenol, após 24 horas.

Partindo-se dos valores da Tabela 5.7 calculou-se a Concentração Letal 50% para o padrão de eugenol (CL_{50}). A Figura 5.36 mostra a estimativa da CL_{50} do eugenol pelo método REED-MUENCH (1938) a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada, tendo sido a CL_{50} o ponto de interseção das curvas.

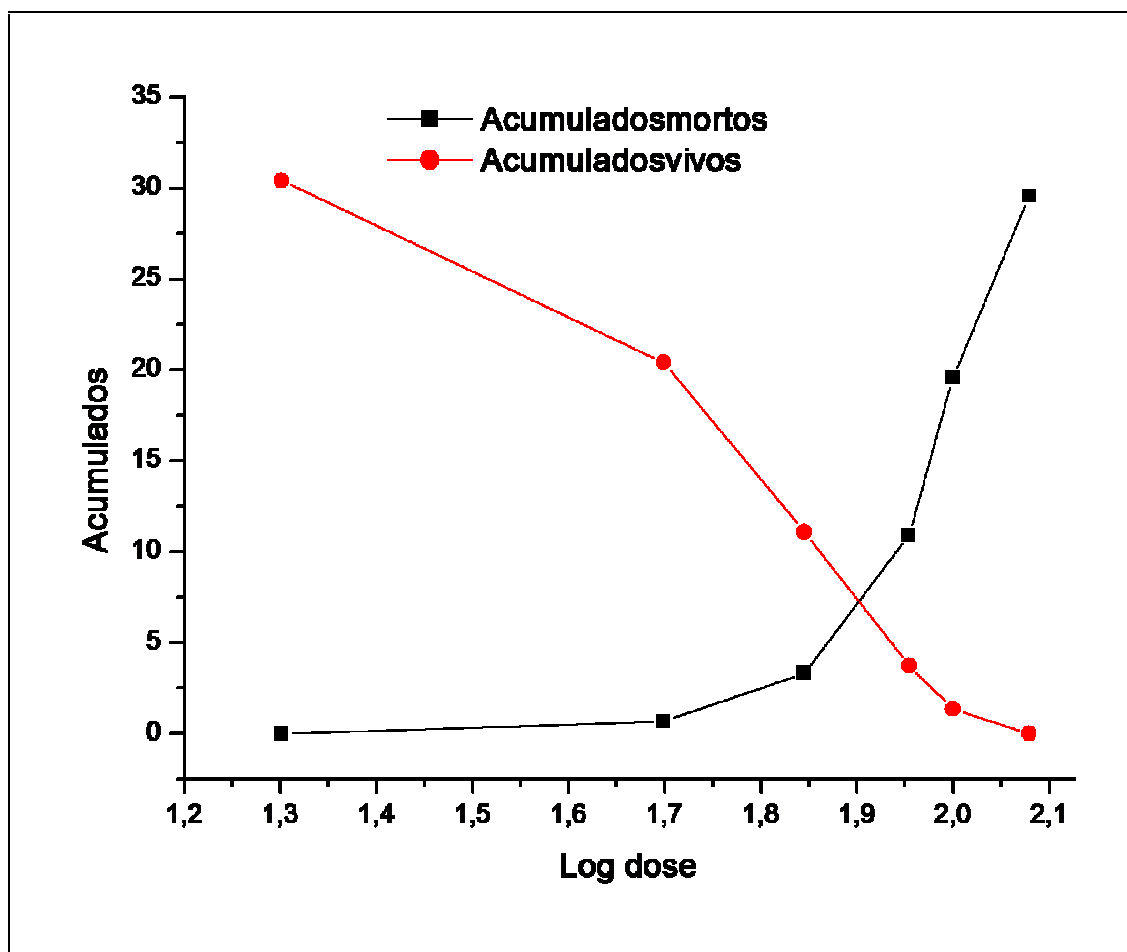


Figura 5.36. Estimativa da CL_{50} do padrão de eugenol pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL_{50} é o ponto de interseção das duas curvas.

Observando-se a Figura 5.36 verifica-se que o valor encontrado para a CL_{50} está próximo ao Log dose 1,90 (entre as concentrações 70 e 90 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O resultado obtido foi o valor de concentração 79,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com intervalo de confiança de 2,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Comparando-se as mortalidades apresentadas pelo óleo e padrão de eugenol na Figura 5.37, percebe-se que o óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* Lindl demonstrou melhor atividade larvicida contra o *Aedes aegypti*, indicando que a mistura de componentes do óleo age de maneira mais eficaz que o padrão isolado.

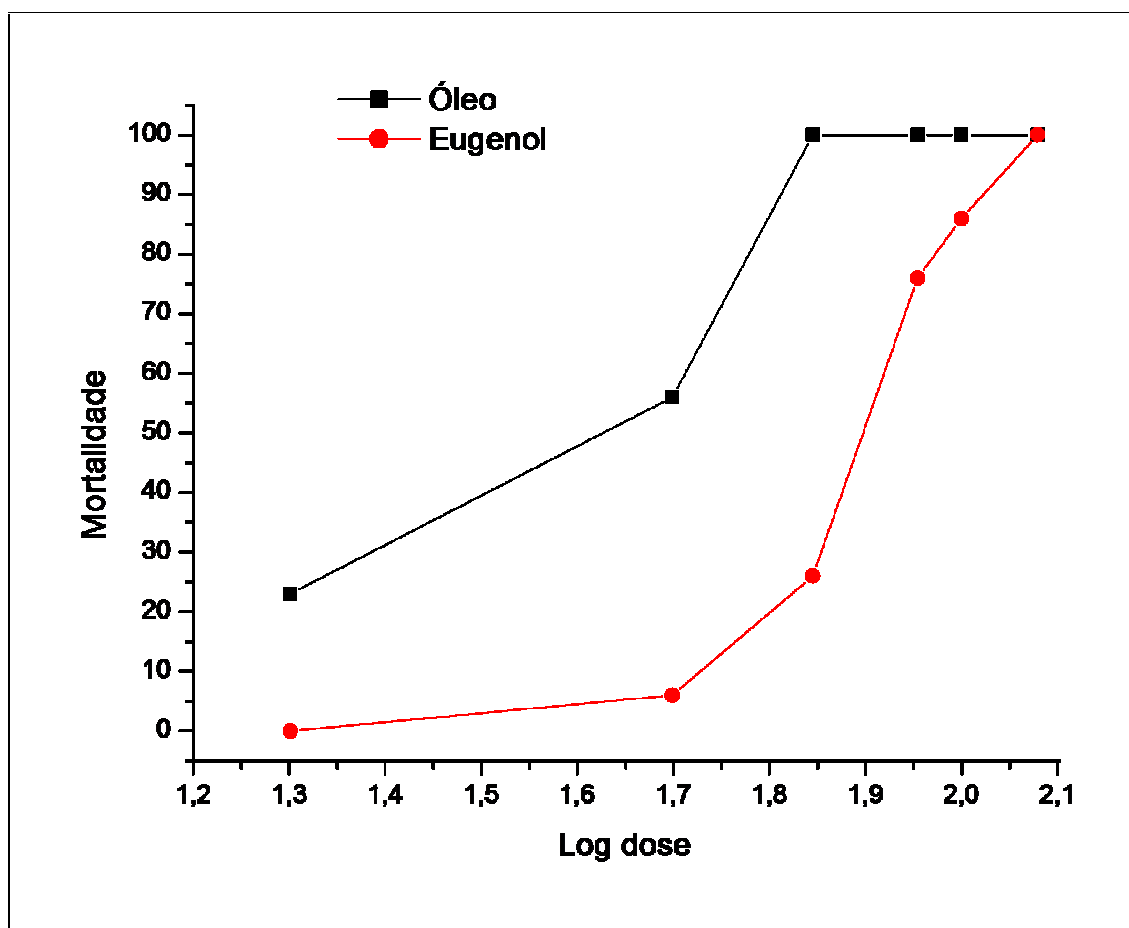


Figura 5.37. Comparação entre as taxas de mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* proporcionadas pelo óleo essencial da *Pimenta dioica* Lind e pelo padrão de eugenol.

A esse respeito, a potencialidade dos óleos essenciais varia segundo a espécie vegetal, a origem, a composição e os mecanismos de ação contra a praga em questão (LEYVA, 2009; TELES, 2009).

Os estudos de toxicidade mostraram ainda que na primeira hora de teste com a dose de $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ a mortalidade das larvas foi de $60\% \pm 0,3$; ao final da segunda hora esse percentual subiu para $80\% \pm 0,4$ (para o padrão de eugenol esses valores foram, respectivamente, $20\% \pm 0,2$ e $60\% \pm 0,3$).

Contra o *Aedes aegypti* alguns estudos mostram que os componentes terpênicos, alcoóis e aldeídos dos óleos essenciais são os principais responsáveis pela atividade inseticida ou larvicida (LUCIA et al., 2007; LEE, 2006; PANELLA et al., 2005; CARVALHO et al., 2003; ARAÚJO et al., 2003; KARR e COTAS, 1998).

É importante ressaltar, nesse contexto, que não se pode apenas atribuir a ação larvicida descrita neste estudo, portanto, ao composto eugenol particularmente; apesar de estar presente na ordem de 74,0 a 77,8% nas folhas da amostra de *Pimenta dioica*.

Outro fator importante a ser levado em consideração são os fenilpropanóides (como o eugenol) e, especialmente, os terpenóides, descritos por ALVES (2001) como os principais constituintes que estão envolvidos nas interações planta-inseto.

Essa premissa é fortuitamente alegada quando nos reportamos a diversos achados na literatura referentes a alguns dos compostos identificados pelas técnicas analíticas utilizadas neste trabalho e que, possivelmente, podem ter contribuído na ação larvicida do óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica*.

SANTOS et al. (2006) reportaram a atividade larvicida de mono e sesquiterpenos extraídos de óleos essenciais da família *Boraginaceae* frente ao *Aedes aegypti*. Entre os compostos majoritários os monoterpenos α - e β -pineno foram destacados como responsáveis pela ação larvicida (no presente estudo esse último composto apresentou um teor de 6,51%).

SIMAS et al. (2004) pesquisando produtos naturais no controle da dengue identificaram diversas classes de terpenos, como os compostos α - pineno, β -pineno, linalol e eugenol. Os referidos autores indicam também que algumas características estruturais químicas são importantes para a atividade biológica, como por exemplo, a indicação de que a ligação dupla exocíclica no β -pineno parece ser mais importante que a ligação dupla endocíclica do α -pineno.

Os óleos essenciais podem atuar também em enzimas digestivas e neurológicas bem como interagir com o tegumento do inseto (ISMAN, 2006). KIM et al. (2003) demonstraram a importância da relação entre a estrutura química e atividade biológica dos compostos; reportando que quanto maior a lipofilicidade, maior a penetração no tegumento do inseto.

Outra observação de SIMAS et al. (2004) é também quanto à importância da lipofilicidade de terpenos para a atividade larvicida em *Aedes aegypti*, quando se compararam monoterpenos e sesquiterpenos de estruturas correlatas.

COATS et al. (1991) estudando biorreguladores de pragas identificaram terpenos e fenilpropanóides, como o eugenol, e verificaram que o composto repeliu o mosquito *Aedes aegypti*, tendo a ressalva de que foi evidenciado nesse estudo a menor atividade de fenilpropanóides contendo núcleos benzênicos que possuíam substituintes nucleofílicos, como hidroxila, metoxila e benzodioxola.

FURTADO et al. (2005) reportaram em seu estudo a ação larvicida de óleos contendo limoneno, linalol e eugenol frente ao mosquito *Aedes aegypti*. Na ocasião esses compostos foram confirmados como majoritários e apresentaram menores atividades quando testados isoladamente (como ocorreu no presente trabalho). Os autores também sugerem a possibilidade de outros compostos serem responsáveis pela atividade larvicida do óleo essencial ou ainda a existência de um sinergismo entre o composto majoritário e outro(s) componente(s) do óleo, existentes em menor fração.

Como já relatado neste estudo, pesticidas químicos organofosforados e piretróides são uma poderosa ferramenta contra vetores e continuarão desempenhando papel importante no controle integrado. No entanto, eles têm desvantagens, como o custo elevado, riscos a saúde humana e a organismos não-alvo, bioacumulação e desenvolvimento de resistência dos organismos alvo (THATHEYUS 2007; PROPHIRO, 2008).

Em comparação ao principal larvicida utilizado no combate à dengue, o temephos, estudos recentes quanto à susceptibilidade deste composto referem que se trata de um produto que com o passar dos anos perdeu a sua força frente ao mosquito, sendo necessárias doses cada vez maiores no seu combate (FURTADO et al., 2005).

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

Nesse contexto é válido relatar outra importante observação quanto à ineficiência crescente do pesticida temephos utilizado no Brasil pelo Programa de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa): ele tem aspectos diferenciados no consumo do produto – enquanto na região Nordeste são consumidos 87,5g, no Sudeste o consumo é de 54,0g e no Sul 48,0g do produto (AUGUSTO e CAMARA NETO, 2007).

Diante desse panorama, os resultados alcançados com o óleo das folhas da *Pimenta dioica* Lindl mostram a importância da necessidade de novas alternativas usando produtos de origem natural, especialmente se levarmos em conta que estes podem minimizar a dependência aos inseticidas químicos sintéticos.

Partindo dos resultados alcançados e do princípio de que o óleo essencial é um produto natural e, portanto, menos nocivo à saúde das pessoas e dos animais domésticos (ISMAN, 2000), pode-se afirmar que o óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* Lindl é um promissor agente larvicida natural em locais de crescimento de larvas do *Aedes aegypti*.

CAPÍTULO 6
CONCLUSÃO

6 - CONCLUSÃO

Os resultados analíticos mostraram a eficiência da metodologia adotada tanto na extração do óleo essencial, quanto à identificação e quantificação do composto majoritário.

As folhas da *Pimenta dioica* Lindl forneceram um óleo essencial cujo rendimento foi próximo de 3,0%, um valor considerável para extração por hidrodestilação.

A caracterização por CG-EM permitiu identificar dezesseis componentes presentes no óleo essencial. Além disso, as técnicas UV-Vis, IF e RMN ^{13}C permitiram corroborar o composto eugenol como componente majoritário na amostra quando comparado ao seu padrão, no que diz respeito às suas absorbâncias e seus deslocamentos químicos.

Quanto à quantificação posterior por CG-EM, UV-Vis e VC o presente estudo também demonstrou a potencialidade da utilização da técnica eletroanalítica, com eletrodo de carbono vítreo, que apresentou uma resposta voltamétrica satisfatória para a análise do eugenol no óleo essencial, tendo sido possível a sua caracterização e quantificação compatível aos mesmos valores obtidos pelas outras técnicas.

Em relação ao estudo térmico por TG-DTA a perda de massa do óleo essencial ocorreu em uma única etapa de decomposição com perda de 97% da massa (9,7 mg) entre 142 e 192°C. Na literatura não foram encontrados dados para o óleo extraído das folhas da *Pimenta dioica* Lindl, possibilitando sugerir a determinação quantitativa de eugenol por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

Por sua vez, a atividade larvicida do óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* frente às larvas do *Aedes aegypti* foi maior que o padrão de eugenol mostrando-se, portanto, ser promissora a sua aplicação para esse fim. A letalidade larval causada pelo óleo ocorreu na primeira hora de teste com a dose $120 \mu\text{g mL}^{-1}$, acusando uma mortalidade de $60\% \pm 0,3$

e uma CL_{50} de $38,86 \mu\text{g mL}^{-1}$; tornando-se crescente ao final de 24 horas de monitoramento.

Nesse contexto o óleo das folhas da *Pimenta dioica* Lindl pode oferecer uma alternativa larvicida natural no combate à dengue. Os resultados foram considerados promissores, no entanto, pesquisas adicionais são necessárias para que se proporcione o uso deste óleo essencial para essa finalidade contra o *Aedes aegypti*.

Finalmente, por se tratar de uma multimistura que apresenta características como volatilidade e baixa solubilidade em água, sugerem-se outros estudos no intuito de se realizar, por exemplo, um processo de encapsulação, o qual pode ser uma saída para resolver essas limitações do óleo, favorecendo uma liberação mais prolongada do composto na água onde o mosquito deposita suas larvas.

CAPÍTULO 7
**PERSPECTIVAS
FUTURAS**

7 - PERSPECTIVAS FUTURAS

Relacionar quantitativamente por DSC o teor de eugenol no óleo essencial em função de sua temperatura de ebulição.

Estudar novas metodologias eletroquímicas para determinações qualitativas e quantitativas dos outros componentes do óleo essencial.

Isolar e testar como agentes larvicidas outros componentes do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl.

Investigar o efeito residual do óleo essencial das folhas no ambiente (persistência larvicida).

Testar o óleo em diferentes intervalos de temperatura para verificar se há resposta no monitoramento das larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

CAPÍTULO 8
REFERÊNCIAS

8 - REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. *Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. 4.ed. Carol Stream, Illinois: Allured, 2007.
- ALVES, HM. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*. 10-15, 2001.
- AMER, A.; MEHLHORN, H. Persistency of larvicidal effects of plant oil extracts under different storage conditions. *Parasitology Research*, 99: 473-477. 2006b
- AMER, A.; METHLHORN, H. Larvicidal effects of various essentials oils against, *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*. 99:466-72, 2006a.
- ARAUJO, E.C.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.; ANDRADE, I.L.; LIMA, M.A. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martisii* Benth. *J Agric Food Chem*, 51:3260-2, 2003.
- ARBOVIRUS. *Aedes aegypti*: pupa. Disponível em:
<http://www.arbovirus.health.nsw.gov.au/areas/arbovirus/mosquit/photos/aedes_aegypti_pupa.jpg> Acessado em: 15 fev. 2010.
- ARIDOGAN, B.C.; BAYDAR, H.; KAYA, S.; DEMIRCI, M.; OZBASAR, D.; MUMLU, E. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. *Arch. Pharm. Res.*, 25:6, 860-864, 2002.

BARRETO, C.F. *Aedes aegypti*- resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. *Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos*, Goiás, 1:2-62-73, nov. 2005.

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

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

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94:223-253, 2004.

CARVALHO, A.F.; MELO, V.M.; CARVEIRO, A.A.; MACHOO, M.I.; BEANTIM, M.B.; RABELO, E.F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* against *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98:569-71, 2003.

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

CDC, Centers for Disease Control and Prevent. Division of vector-borne infections diseases. Dengue fever. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue>>. Acessado em: 10 jan. 2010.

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

CHAMPAKAEW, D.; CHOOCHOTE, W.; PONGPAIBUL, Y.; CHAITHONG, U.; JITPAKDI, A.; TUETUN, B.; PITASAWAT, B. Larvicidal efficacy and biological stability of a botanical natural product, zedoary oil-impregnated sand granules, against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Parasitology Research*. 100: 729-737, 2007.

CHENG, S.S. HUANG, C.G.; CHEN, Y.J.; YU, J.J.; CHEN, W.J.; CHANG, S.T. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. *Bioresource Technology*, 100:452-456, 2009.

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

CHENG, S.S.; HUANG, C.G.; CHEN, Y.J.; YU, J.J.; CHEN, W.J.; CHANG, S.T. 2009. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. *Bioresource Technology*, 100: 452-456, 2009.

COATS, J.R.; KARR, L.L.; DREWES, C.D. In: *Naturally Occurring Pest Bioregulators*; HEDIN, P.A. ACS Symposium Series 449; American Chemical Society: Washington, DC, 1991, p. 306-316.

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

CONSOLI, R.; OLIVEIRA, R.L. *Principais mosquitos de importância sanitária do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.

CORRÊA, M.P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. v.3.

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

COSTA SOBRINHO, J.R.S. *Estudo analítico e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído das folhas da Pimenta dioica L.* São Luís, Programa de Pós-Graduação em Química, UFMA, 2008. Dissertação de Mestrado, 95p.

COSTA, A.F. *Farmacognosia*. 5.ed. Lisboa: Caloust Gulbekian, 1994. v.1.

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

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

DAVID, F.; SCANLAN, F.; SANDRA, P.; SZELEWSKI, M. Analysis of essential oil compounds using retention time locked methods and retention time databases. Application. *Food and flavor. Agilent Technologies*, May, 2002. Disponível em: <<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5988-6530EN.pdf>>. Acessado em 7 jan. 2010.

DE MENDOCA, F.A.; DA SILVA, K.F.; DOS SANTOS, K.K.; RIBENEIRO JUNIOR, K.A.; SANT'ANA, A.E. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Ae. aegypti*. *Fitoterapia*, 76:629-36, 2005.

DUKE, J.A. *Handbook of medicinal herbes*. Boca Raton: CRC, 1985.

FIOCRUZ. *Aedes aegypti*: ovos. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/media/memo_dengue2.jpg> Acessado em: 15 fev. 2010.

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

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

GERIS, R.; SILVA, I.G.; SILVA, H.H.; BARISON, A.; RODRIGUES-FILHO, E.; FERREIRA, A.G. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 50: 25-28, 2008.

GLEISER, R.M.; ZYGADLO, J.A. Insecticidal properties of essential oils from *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 101: 1349-1354, 2007.

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

GONZAGA, A.D.; GARCIA, M.V.B.; SOUSA, S.G.A.; DANIEL, V.; CORREA, R.S.; RIBEIRO, J.D. Toxicity of cassava manípueira (*Manihot esculenta* Crantz) and erva-de-rato (*Palicourea marcgravii* St. Hill) to adults of

Toxoptera citricida Kirkaldy (Homoptera: Aphididae). *Acta Amazonica*, 38:1, 101-106, 2008.

GUENTHER, E. *The essential oils*. Individual essential oils of the plant families Gramineae, Lauraceae, Burseraceae, Myrtaceae, Umbelliferae and Geraniaceae. New York: D. Van Nostrand, 1950. V. 4.

INFO-E. Empresa do Rio desenvolve bioinseticida contra o mosquito da dengue. Info-e ano VII, n.164, 2 de abril de 2008. Disponível em: <http://www.anprotec.org.br/infoe/acontece_vejamais.php?var=21>. Acessado em: 7 fev. 2010.

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. *Cerâmica*, 26(121), p. 17-24, 1980.

ISMAN, M. Plant essential oil for pest and disease management. *Crop Prot*, 19:603-08, 2000.

ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51: 45-66, 2006.

KAEMPGEN, D. Fed. Rep. Ger. Eugenol-isoeugenol mixtures para treatment of Aids. *Ger. Offen. De*, 3829200:A1., Mar 1, 1990.

KARR, L.L.; COTAS, J.R. Insecticidal properties of dlimonelene. *J Pest Sci*, 13:287-90, 1998.

KEATTCH, C.J.; DOLLIMORE, D. *An introduction to Thermogravimetry*. New York: Heyden, 1975.

KIM, E.H.; KIM, H.K.; CHOI, D.H.; AHN, Y.J. A acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). *Applied Entomology and Zoology*, 38(2): 261-266, 2003.

KIM, S. Inhibition of immediate allergic reaction by eugenol. *Yakhak Hoechi*, 40:6, 679-683, 1996.

KOBAYSAHI, R. Eugenol and isoeugenol dimmers as bactericides, fungicides and inflammation inhibitors. *Kibun Food Chemica*, 09176074:A2., Jul. 8, 1997.

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

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

LOPEZ, A.B.; CAPÓ, J.T; GONZÁLEZ, Y.C. Actividad analgésica y antipirética de un extracto fluido de *Pimenta dioica* L. y evaluación de su toxicidad aguda oral. *Rev. Cubana Farm.*, 32:3, 198-203, 1998.

LUCIA, A.; GONZÁLEZ, A.P.; SACCACINI, E.; LICASTRO, S.; ZERBA, E.; MASUH, H. Larvicidal effect of Eucalyptus grandis essential oil and turpentine and their major components on *Ae. aegypti* larvae. *J Am Mosq Control Assoc*, 23:293-303, 2007.

LUNA, J.E.D.; MARTINS, M.F.; ANJOS, A.F.; KUWABARA, E.F.; NAVARRO-SILVA, M.A. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 38: 842-843, 2004.

MARCONCINI, J.M.; OLIVEIRA, R.M. Termogravimetria de Cascas de Arroz. *Comunicado Técnico 89*. São Paulo: Embrapa, out. 2007.

MARINHO, S.C. *Caracterização química e avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais das espécies Pimenta dioica Lindl, Aniba duckei Kostermans e Zingiber officinale Roscoe*. São Luís, Programa de Pós-Graduação em Química, UFMA, 2005. Dissertação de Mestrado, 111p.

MENDONÇA, F.A.; SILVA, K.F.; SANTOS, K.K.; RIBEIRO JUNIOR, K.A.; SANT'ANA, A.E. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*, 76: 629-636, 2005.

MONTEIRO, O.S. *Caracterização do óleo essencial da Pimenta dioica Lindl e sua aplicação como atrativo de abelhas Euglossina*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2008. Tese de doutorado, 148p.

MONTEIRO, O.S. *Estudo Analítico do eugenol contido no óleo essencial extraído dos frutos da espécie Pimenta dioica Lindl e sua aplicação como agente bactericida*. São Luís, Programa de Pós-Graduação em Química, UFMA, 2004. Dissertação de Mestrado, 98p.

MOUCHREK FILHO, V. E. *Eletrodo de grafite pirolítico quimicamente modificado por vermelho de alizarina S: estudos voltamétricos e aplicação analítica*. São Carlos, Pós-Graduação em Química, IQSC, USP, 1997. Dissertação de Mestrado, 102p.

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

MOUCHREK FILHO, V.E. *Introdução à Química de Óleos Essenciais*. São Luís. 2001, 72p.

MOUCHREK FILHO, V.E.; MELO, C.M.S.; CHIERICE, G.O. Avaliação da composição química do óleo essencial da espécie *Pimenta dioica* L. In: Latin American Congress on Chromatography and Related Techniques, VII., 1998. *Livro de Resumos*. Águas de São Pedro, 1998, p.108.

MULLAI, K.; JEBANESAN, A.; PUSHPANATHAN, T. Effect of bioactive fractions of *Citrullus vulgaris* Schrad. leaf extract against *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Parasitology Research* 102: 951-955, 2008.

MYINT, S.; DAUD, W.R.W; MOHAMAD, A.B; KADHUM, A.A.H. Gas chromatographic determination of eugenol in ethanol extract of cloves. *Journal of Chromatography*, 679, 193-195, 1996.

NASCIMENTO, A.R. *Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente a bactérias isoladas de sururu (Mytella falcata)*. Lavras/MG, Programa de Pós-Graduação em Ciências, UFLA, 2004. Tese de Doutorado, 91p.

NEVES, D.P. *Parasitologia Humana*. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

PANELLA, N.A.; DOLAN, M.C.; KARCHESY, J.J.; XIONG, Y.; PERALTA-CRUZ, J.; KHASAWNEH, M. Use of novel compounds for pest control: insecticidal and acaricidal activity of essential oils components from heartwood of Alaska yellow cedar. *J Med Entomol*, 42:352-8, 2005.

PARK, I. K.; LEE, S.G.; SHIN, S.C.; PARK, J.D.; AHN, Y.J. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1866-1870, 2002.

PAVELA, R. Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 102: 555-559, 2008.

PENIDO, C.; COSTA, K.A.; PENNAFORTE, R.J.; COSTA, M.F.S.; PEREIRA, J.F.G. SIANI, A.C.; HENRIQUES, M.G.M.O. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergeninduced vascular permeability and hyperalgesia. *Inflammation Research*, 54: 295-303, 2005.

PEREIRA, C.A.M.; MAIA, J.F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 27(3): 624, 2007.

PITASAWAT, B.; CHAMPAKAEW, D.; CHOOCHOTE, W.; JITPAKDI, A.; CHAITHONG, U.; KANJANAPOTHI, D. Aromatic plant-derived essential oil: an alternative larvicide for mosquito control. *Fitoterapia*, 78:205-10, 2007.

PIZARRO, A.P.; OLIVEIRA-FILHO, A.M.; PARENTE, J.P.; MELO, M.T.; SANTOS, C.E.; LIMA, P.R. Aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquito. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32: 23-29, 1999.

PIZZI, M. Sampling variation of the fifty percent end-point, determined by the Reed-Muench (Behrens) Method. *Human Biol.*, 22, 151-190, 1950.

POHLIT, A.M.; QUINARD, E.L.J.; NUNOMURA, S.M.; TADEI, W.P.; HIDALGO, A.F.; PINTO, A.C.S. (et al.) Screening of plants found in the state of Amazonas, Brazil for activity against *Aedes aegypti* larvae. *Acta Amazonia*, 34:01, 97-105, 2004.

POLANCZYK, R.A.; GARCIA, M.O.; ALVES, S.B. Potencial de *Bacillus thuringiensis Berliner* no controle de *Aedes aegypti*. *Rev. Saúde Pública*, 37:813-816, 2003.

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

RALPH, L.S. *Identificação sistemática de compostos orgânicos*. Manual de Laboratório. 6.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1983, p. 367-378.

REBÊLO, J.M.M. *História natural das Euglossíneas*. As abelhas das orquídeas. São Luís: Lithograf, 2001.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 27:493-7, 1938.

RODRÍGUEZ, M.G.O.; SARRÍA, F. B.; VALCÁRCEL, A. C.; SALVADÓ, A. C. Uso de la crema repelente de *Pimenta dioica* por combatientes de una unidad militar. *Rev. Cubana Med. Milit.*, 26:2, 94-97, 1997.

ROJO, L.; VÁZQUEZ, B.; PARRA, J.; BRAVO, A.L; DEB, S.; SAN ROMÁN, J. From natural products to polymeric derivatives of Eugenol: a new approach for preparation of dental composites and orthopedic bone cements. *Biomacromolecules*, 7, 2751-2761, 2006.

SANTOS, R.P.; NUNES, E.P.; NASCIMENTO, R.F.; SANTIAGO, G.M.P.; MENEZES, G.H.A.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L. Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oils of *Cordia leucomalloides* and

Cordia curassavica from the Northeast of Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.*, 17(5), 1027-1030, 2006.

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

SIANI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUSA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, 16, ano 3, set./out. 2000.

SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G.; SANTOS, R.M.G.S.; RODRIGUES FILHO, E.; ELIAS, C.N. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubercens* St. Hil (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37:5, 396-399, set./out. 2004.

SILVA, O.S.; Prophiro, J.S.; ROSSI, J.C.N.; KANIS, L.A.; ROMÃO, P.R.T.; BLAZIUS, R.D. Larvicidal effect of andiroba oil *Carapa guianensis* (Meliaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22: 699-701, 2006.

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

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

SIMAS, N.K.; LIMA, E.C.; CONCEIÇÃO, S.R.; KUSTER, R.M.; OLIVEIRA FILHO, A.M. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue:

atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilterpenóides. *Química Nova*, 27:01, 46-49, fev. 2004.

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

SMITH, R. M. *Understanding Mass Spectra*: a basic approach. 2.ed. USA: Wiley-Interscience, p.185-186, 2004.

SOUSA, M.C. *Estudos analíticos do óleo essencial dos frutos da espécie Pimenta dioica Lindl e sua aplicação como atrativo de insetos (feromônio)*. São Luís, Programa de Pós-Graduação em Química, UFMA, 2003. Dissertação de Mestrado, 99p.

SU, H.N. Introduction to TG/DTA/DSC. Illinois Institute of Technology. Disponível em: <<http://tptc.iit.edu/center/research/PhaseDiagram/Content/presentation//DSC.pdf>> Acessado em: 7 jan. 2010.

TAUIL, P.L. Urbanização e Ecologia da Dengue. *Caderno de Saúde Pública*, 17, 99-102, 2001. Supl.

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

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

THATHEYUS, J.A. Bio control of mosquitoes In: Defeating the public enemy, the mosquito: a real challenge. *Loyola*, 76-94, 2007.

TOURIYA, B.; ABDELGHAMOUR, T.E; ABDELOUAFI, I. Application of a two levels factorial design to the study of the antimicrobial activity of three terpenes. *Sci. Aliments.*, 15:6, 571-578, 1995.

TURI, E.A. *Thermal Characterization of Polymeric Materials*. 2.ed. California, USA: Academic Press. v.1, 1997.

UCLA. Library. Spice images. Disponível em: <[http://unitproj1.library.ucla.edu/biomed/spice/images/ALLSPICE\(PIMENTO\).jpg](http://unitproj1.library.ucla.edu/biomed/spice/images/ALLSPICE(PIMENTO).jpg)> Acessado em: 7 fev. 2010.

UGAZ, O. L. *Investigación Fitoquímica*. Métodos en el estudio de productos naturales. Lima, Fondo Editorial de la Pontificia de la Universidad Católica del Perú, p. 23-42. 1994.

VÁZQUEZ, B.I.; FENTE, C.; FRANCO, C.M.; VAZQUEZ, M.J.; CEPEDA, A. Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 157-163, 2001.

WANG, J. *Analytical electrochemistry*. 3.ed. New York: Wiley-VCH, 272p, 2006.

WENDHAUSEN, P.A.P. *Análise térmica*. Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/analise-termica-pdf-a23903.html>> Acessado em: 7 fev. 2010.

WENDLANDT, W.W.M. *Thermal Analysis*. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 1986.

WHO, World Health Organization. International travel and health. 2009 edition. Disease distribution maps: Dengue. Disponível em: <<http://www.who.int/ith/en>>. Acessado em: 10 fev. 2010.

WIKIMEDIA. *Aedes aegypti*: larva. Disponível em: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/95/Aedes_aegypti_larva.jpg> Acessado em: 15 fev. 2010.