



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LARVICIDA E FUNGICIDA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS**

SARAH BÁRBARA DA SILVA

BRASÍLIA – DF

2023

SARAH BÁRBARA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LARVICIDA E FUNGICIDA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof. Dra. Náira da Silva Campos

Coorientador: Prof. Dr. João Paulo Barreto de Sousa

BRASÍLIA – DF

2023

SARAH BÁRBARA DA SILVA

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Náira da Silva Campos (orientadora)

Prof. Dr. João Paulo Barreto de Sousa (coorientador)

Prof. Dr. Rodrigo da Silva Ferreira (avaliador)

Prof. Dr. Carlos Eduardo de Melo Salvador (avaliador)

*Dedico este trabalho à minha
família, por todo amor e apoio.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas graças que me são oferecidas diariamente e pelo renovo de minhas forças e coragem. Pelo cuidado em me guiar no caminho do bem e da sabedoria. Por ter colocado em meu caminho pessoas especiais que me ajudaram durante toda essa jornada acadêmica.

Este trabalho é fruto do esforço, também, de meus pais João Alberto C. de Moraes, Silvia Maria da Silva e Caio Júlio C. S. Rêgo que sempre me apoiaram na jornada acadêmica, sempre me fizeram acreditar na educação como movimento transformador na minha vida e me ofereceram todos os recursos para que esse sonho fosse possível, os agradeço imensamente.

Agradeço a colaboração e apoio da minha orientadora professora Dr^a. Naira Campos e ao meu coorientador Dr. João Paulo, que fizeram deste trabalho uma possibilidade factível. Agradeço a disponibilidade, paciência e pelos ensinamentos. Ensinar é um dom, e posso dizer que vocês o têm.

Agradeço aos meus colegas Arthur C. Rodrigues, Wanessa Garcez e Clara S. Alves que tornaram os dias de laboratório muito mais que dias de experimentos. Agradeço por toda a ajuda e dedicação que se dispuseram para algo tão importante para mim.

Agradeço à Dr^a. Paula Corrêa pela paciência, pela disponibilidade e pelos diversos ensinamentos que agregaram muito em minha vida acadêmica e profissional.

Agradeço aos meus amigos pelo apoio, pela torcida e por todo amparo nas dificuldades. Em especial a minha amiga Natássia Veruska que em nenhum momento deixou que eu acreditasse que não fosse capaz, que me auxiliou e me amparou durante esse trabalho.

Por fim, agradeço a todos os professores, em especial às professoras Laila e Lorena pelo apoio e infraestrutura, alunos e estagiários do Laboratório de Farmacognosia que me ajudaram durante esse processo e a todos que torceram e acreditaram em mim.

*“O Senhor mesmo marchará diante de ti,
e estará contigo, e não te deixará nem te
abandonará. Nada temas, e não te
amedrontes.”*

Deuteronômio 31,8

RESUMO

As plantas produtoras de óleos essenciais são beneficiadas por características próprias desses compostos voláteis, os quais também encontram aplicação em diversas indústrias, como a alimentícia, cosmética e fragrâncias. Os óleos essenciais (OE) apresentam ainda uma série de atividades biológicas que podem ser exploradas. Este estudo buscou testar duas atividades (larvicida e fungicida) de cinco óleos essenciais extraídos por hidrodestilação, sendo eles *Citrus Sinensis* – laranja pêra, *Citrus latifolia Tanaka* – limão taiti, *Citrus Limon* – folhas de limão siciliano, *Lippia alba* – erva cidreira de folha e *Plinia trunciflora* – folhas de Jabuticaba-sabará. O teste larvicida demonstrou que nas concentrações de 250 µg/mL e 125 µg/mL todos os óleos apresentaram atividade larvicida superior a 90 % já nas primeiras 24 h observadas. Os óleos essenciais da laranja pêra, limão taiti e das folhas do limão siciliano tiveram atividade superior a 80 %, ou seja, morte média de 8 a cada 10 larvas na concentração de 62 µg/mL. Quanto a atividade fungicida, as amostras de OE das folhas de erva cidreira apresentaram concentração mínima inibitória (CMI) de 250 µg/mL para *C.tropicallis* e de 125 µg/mL para *C.glabrata*. O OE das folhas de limão siciliano apresentou concentração mínima inibitória (CMI) de 250 µg/mL para *C.tropicallis*, *C.glabrata* e *C.parapsilosis* (ATCC 22019). Para as amostras de OE do limão taiti foi obtida CMI de 500 µg/mL para as leveduras *C.glabrata* e *C.parapsilosis* (ATCC 22019). Os óleos de laranja pera e das folhas de jabuticaba não apresentaram atividade fungicida em nenhuma das concentrações nas leveduras em que foram testados. Os resultados obtidos demonstram potenciais atividades larvicida e fungicida para as amostras estudadas, mas estudos posteriores são necessários para caracterização química e avaliação de uso destas como alternativas aos problemas relacionados à reprodução do vetor *Aedes aegypti* e às infecções fúngicas causadas por leveduras do gênero *Candida*.

Palavras-chave: Óleos essenciais, atividades biológicas, larvicida, fungicida, *Candida*.

ABSTRACT

Essential oil-producing plants benefit from the unique characteristics of these volatile compounds, which also find application in various industries such as food, cosmetics, and fragrances. Essential oils (EOs) also exhibit a range of biological activities that can be explored. This study aimed to test two activities (larvicidal and fungicidal) of five essential oils extracted by hydrodistillation, namely *Citrus Sinensis* - orange, *Citrus latifolia Tanaka* - Tahiti lime, *Citrus Limon* - lemon leaves, *Lippia alba* - lemon verbena, and *Plinia trunciflora* - jaboticaba-sabará leaves. The larvicidal test demonstrated that at concentrations of 250 $\mu\text{g/mL}$ and 125 $\mu\text{g/mL}$, all oils showed larvicidal activity exceeding 90% within the first 24 hours observed. The essential oils from orange, Tahiti lime, and lemon leaf showed activity exceeding 80%, indicating an average mortality rate of 8 out of 10 larvae at a concentration of 62 $\mu\text{g/mL}$. Regarding fungicidal activity, the EO samples from lemon verbena leaves exhibited a minimum inhibitory concentration (MIC) of 250 $\mu\text{g/mL}$ for *C.tropicallis* and 125 $\mu\text{g/mL}$ for *C.glabrata*. The EO from lemon leaves showed a minimum inhibitory concentration (MIC) of 250 $\mu\text{g/mL}$ for *C.tropicallis*, *C.glabrata*, and *C.parapsilosis* (ATCC 22019). For the samples of Tahiti lime EO, a MIC of 500 $\mu\text{g/mL}$ was obtained for the yeasts *C.glabrata* and *C.parapsilosis* (ATCC 22019). The orange and jaboticaba leaf oils did not exhibit fungicidal activity at any of the tested concentrations against the yeasts. The obtained results demonstrate potential larvicidal and fungicidal activities for the studied samples, but further studies are required for chemical characterization and assessment of their use as alternatives to issues related to *Aedes aegypti* vector reproduction and fungal infections caused by *Candida* yeasts.

Keywords: Essential oils, biological activities, larvicide, fungicide, *Candida*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fruto laranja pera (<i>Citrus sinensis</i>).....	11
Figura 2 – Fruto limão taiti (<i>Citrus latifolia Tanaka</i>)	13
Figura 3 – Folhas do limão siciliano (<i>Citrus limon</i>).....	14
Figura 4 – Erva-cidreira (<i>Lippia alba</i>)	15
Figura 5 – Folhas de jabuticaba (<i>Plinia trunciflora</i>).....	16
Figura 6 – Ciclo de vida <i>Ae. aegypti</i>	17
Figura 7 – Estágios larvais do <i>Ae. aegypti</i>	18
Figura 8 – Óleos essenciais das espécies utilizadas	21
Figura 9 – Aparelho Clevenger	22
Figura 10 – Obtenção do óleo essencial	22
Figura 11 – Ensaio dose resposta com todas as amostras e controle.....	24
Figura 12 – Distribuição das 8 diluições de uma amostra na placa de poços	24
Figura 13 – Placa com crescimento de leveduras.....	26
Figura 14 – Aplicação do teste de Concentração Mínima Inibitória na levedura <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	27
Figura 15 – Estrutura química dos componentes majoritários do OE de laranja pera	37
Figura 16 – Estrutura química dos componentes majoritários do OE de limão taiti.....	38
Figura 17 – Estrutura química dos componentes majoritários do OE de erva cidreira.....	38
Figura 18 – Estrutura química dos componentes majoritários do OE das folhas de limão siciliano.....	39
Figura 19 – Estrutura química dos componentes majoritários do OE das folhas de jabuticaba	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fungos utilizados na avaliação da atividade fungicida dos óleos essenciais.....	25
Tabela 2 – Teste de triagem em <i>Ae. Aegypti</i> na concentração de 250 µg/mL.....	28
Tabela 3 – Teste dose-resposta em larvas de <i>Ae. Aegypti</i> em 24 h de exposição.....	29
Tabela 4 – Teste dose-resposta em larvas de <i>Ae. Aegypti</i> em 48 h de exposição.....	30
Tabela 5 – Teste dose-resposta em larvas de <i>Ae. Aegypti</i> em 48 h de exposição.....	31
Tabela 6 – Resultados da triagem das amostras em 4 cepas de levedura na concentração de 1000 µg/mL	34
Tabela 7 – Concentrações mínimas inibitórias das amostras em cada levedura.	35
Tabela 8 – Componentes majoritários dos óleos essenciais encontrados na literatura	37

SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO	10
1.2 O ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE <i>Citrus sinensis</i>	11
1.3 O ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE <i>Citrus latifolia tanaka</i>	12
1.4 O ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE <i>Citrus limon</i>	13
1.5 O ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE <i>Lippia alba</i>	14
1.6 O ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE <i>Plinia trunciflora</i>	15
1.7 O VETOR <i>Aedes aegypti</i>	16
1.8 LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida spp.</i>	18
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 ESPÉCIES VEGETAIS SELECIONADA.....	21
3.2 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	21
3.3 ENSAIO LARVICIDA.....	23
3.3.1 Preparo das larvas	23
3.3.2 Triagem das amostras com atividade larvicida	23
3.3.4 Teste dose-resposta	24
3.4 ENSAIO FUNGICIDA	25
3.4.1 Preparo dos fungos	25
3.4.2 Triagem das amostras com atividade fungicida	25
3.4.3 Teste dose-resposta	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
4.1 ENSAIO LARVICIDA.....	28
4.2 ENSAIO FUNGICIDA	33
4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	35
5 CONCLUSÕES.....	40
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 REFERENCIAL TEÓRICO

Os óleos essenciais (OE) podem ser definidos como as frações voláteis extraídas de plantas aromáticas. Os OE são misturas altamente complexas de compostos voláteis de baixa massa molecular responsáveis pelo aroma típico de plantas aromáticas. Estes produtos são extraídos de diferentes partes das plantas como, por exemplo, folhas, cascas, flores, botões, sementes, frutos e raízes contendo os aromas característicos da espécie vegetal, bem como outras propriedades (VELLA *et al.*, 2020).

Os OE podem ser obtidos por métodos de extrações, como hidrodestilação, arraste a vapor, prensagem a frio ou extração por solventes, em que os componentes voláteis das plantas são extraídos. (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014). Os óleos essenciais de frutas cítricas são extraídos principalmente pela prensagem do pericarpo dos frutos, sendo os óleos essenciais que predominam no mercado de exportação brasileiro. Dentre os óleos com maior exportação estão os de fruta cítrica como laranja pera e limão siciliano (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Os óleos essenciais variam em viscosidade, coloração, odor, sabor, composição química e quantidade de acordo com a planta de origem, o que interfere nas suas aplicações. No entanto, apesar das diferenças, há características químicas comuns entre eles como a presença de terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos), compostos aromáticos (fenol, aldeído, álcool e outros) e terpenóides (isoprenóides) (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014; BIZZO *et al.*, 2009).

Os OE têm ampla utilização em setores como perfumaria, cosméticos, alimentos e desempenham um papel como coadjuvante em medicamentos. São predominantemente utilizados como aromatizantes, fragrâncias, fixadores de fragrâncias e em formulações farmacêuticas, sendo comercializados tanto em sua forma bruta quanto beneficiada. Além disso, a separação de óleos voláteis fornece substâncias purificadas, como limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol, comumente encontradas (BIZZO *et al.*, 2009).

Os óleos essenciais são largamente conhecidos por possuírem propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Sua atividade antifúngica ocorre, pois os OE podem causar danos irreversíveis que impactam a permeabilidade da membrana e o equilíbrio osmótico da célula dos fungos. Adicionalmente, os OE apresentam atividade antioxidante, sendo capazes de neutralizar a ação da peroxidação lipídica induzida por radicais livres. Estudos prévios investigaram as propriedades antimicrobianas de óleos essenciais de diversas plantas, revelando que esses compostos apresentam potencial como agentes antimicrobianos naturais e

alternativos para a preservação de alimentos. Os terpenos e fenilpropanoides, caracterizados por sua natureza lipofílica e marcante atividade antimicrobiana, representam os principais ingredientes ativos nos óleos essenciais (OCAK *et al.*, 2012; VELLA *et al.*, 2020).

1.2 O ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE *Citrus sinensis*

O gênero *Citrus*, pertencente à família *Rutaceae*, engloba diversas espécies de plantas que produzem frutos amplamente cultivados e consumidos em todo o mundo, caracterizados por seu significativo teor de óleo essencial. Na medicina popular, essas plantas são empregadas por suas propriedades colagogas, antipiréticas, anti-inflamatórias, sedativas e antitóxicas. Uma das espécies que compõe esse gênero é a *Citrus sinensis*, nome da espécie vegetal comumente conhecida como laranja ou laranja pera no Brasil. Essa espécie é uma das árvores frutíferas mais cultivadas no mundo em regiões tropicais, semitropicais e em algumas regiões temperadas (JARADAT *et al.*, 2016; ANCILLO *et al.* 2015; KUMMER *et al.*, 2013).

As características da árvore dessa espécie incluem folhas elípticas alternadas de tamanho médio ou grande com margens inteiras e pecíolo curto. Suas flores são médias com pétalas brancas e anteras amarelas. Seus frutos, baga do tipo hesperídio, são médios, globosos de coloração alaranjada, com casca lisa de espessura média e polpa macia e succulenta de cor amarela ou laranja com três a quatro sementes por fruto, poliembrionárias e com cotilédones brancos (ANCILLO *et al.* 2015)

A extração dos OE da espécie *Citrus sinensis* é feita principalmente a partir de suas flores, com propriedades antimicrobianas, carminativas e aromatizantes, por possuírem especialmente sabineno, linalol, limoneno e (E)-nerolidol; e de seus frutos, constituídos por D-limoneno, com propriedades inseticidas e larvicidas, eficazes especialmente contra larvas de mosquitos, por exemplo. (JARADAT *et al.*,2016; AMUSAN *et al.*, 2005; MURUGAN *et al.*, 2012).

Figura 1 – Fruto laranja pera (*Citrus sinensis*)



Fonte: Imagem do autor

1.3 O ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE *Citrus latifolia tanaka*

A *Citrus latifolia Tanaka*, chamada popularmente de limão Taiti, floresce em climas tropicais, especialmente no México, Brasil, Peru, Índia e Egito. A maior parte da produção do limão colhido é consumida fresca, enquanto o restante é processado para fazer suco de limão vendido engarrafado ou usado na produção de bebidas gaseificadas. O óleo essencial, um subproduto principal, é empregado na indústria de perfumaria, cosméticos, farmacêutica e alimentícia. O óleo essencial de limão, em particular, tem sido utilizado desde tempos antigos devido aos seus efeitos antissépticos, carminativos, diuréticos e eupépticos. Alguns estudos apontam também para uma atividade anti-inflamatória (BONACCORSI et al., 2012; KUMMER et al., 2013).

Os óleos essenciais de plantas do gênero *Citrus* em geral possuem monoterpenos e sesquiterpenos como constituintes com diversas atividades. O óleo essencial de limão Taiti, em particular, tem sido utilizado desde tempos antigos devido aos seus efeitos anti-sépticos, carminativos, diuréticos e eupépticos. O OE da casca do limão Taiti tem como seu componente majoritário o limoneno, um terpeno que possui atividade antimicrobiana já muito elucidada na literatura, sendo um dos terpenos mais comuns na natureza. Além da atividade como antimicrobiano tem sido demonstrado que esse composto exerce efeitos antiulcerogênicos, gastroprotetores, quimiopreventivos, antiproliferativos, inseticidas, antimicrobianos e imunomoduladores, além dos efeitos anti-inflamatórios, modulando uma série de eventos da resposta imune. (DOS REIS GASPARETTO et al., 2022; KUMMER et al., 2013).

Outros componentes, como γ -terpineno, citral, linalol, β -cariofileno, α -pineno e β -pineno entre outros podem ser encontrados no OE do limão taiti a depender da parte da planta que se extraiu, além de fatores como idade da planta, região e temperatura. Em geral os óleos essenciais da casca do limão possuem um percentual elevado de limoneno, tornando menor a concentração de outros componentes, já para o óleo essencial das folhas a quantidade disponível desses outros componentes pode variar e apresentar valores mais altos de disponibilidade (BONACCORSI et al., 2012; KUMMER et al., 2013; PINO; ROSADO, 2001; SELVARAJ; PRASAD; VENKATESHWARLU, 2002).

Figura 2 – Fruto limão taiti (*Citrus latifolia* Tanaka)



Fonte: Imagem do autor

1.4 O ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE *Citrus limon*

O limão siciliano, *Citrus limon*, é uma das espécies mais conhecidas e utilizadas do gênero *Citrus*. Decorrente de uma árvore pertencente à família *Rutaceae*, possui folhas perenes e lanceoladas, flores brancas e frutos comestíveis de coloração verde ou amarelos quando maduros, oval, pontiagudos e ovalados, com uma polpa succulenta (KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ; SZOPA; EKIERT, 2020; PETRETTO et al., 2023).

C. limon possui uma composição química bastante rica como flavonóides, ácido cítrico, ácido ascórbico, cumarinas, ácidos carboxílicos, aminoácidos e vitaminas, com efeitos antibacterianos, antifúngicos, antivirais, antioxidantes, antiinflamatórios, antialérgicos, antidiabéticos, anticancerígenos, antiproliferativos, antimutagênicos, antissépticos, hepatoregeneradores, cardioprotetores e para feridas, propriedades curativas, assim como efeitos que auxiliam na prevenção da obesidade e na redução de lipídeos no sangue (KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ; SZOPA; EKIERT, 2020; LOPES CAMPÊLO et al., 2011; MAHDANI et al., 2020).

O óleo essencial do limão siciliano pode ser obtido das folhas e dos frutos, sendo amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. A composição química desse OE é principalmente de monoterpenoides, como D-limoneno, γ -terpineno, citral, linalol, β -cariofileno, β -micerno, α -pineno e β -pineno. Os efeitos antiinflamatórios de *C. limon* são oriundos dos componentes linalol, β -cariofileno e limoneno, e os efeitos antioxidantes de α -pineno e β -pineno (KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ; SZOPA; EKIERT, 2020; PUCCI et al., 2020; TEIXEIRA; MARQUES; FIGUEIREDO, 2013)

Figura 3 – Folhas do limão siciliano (*Citrus limon*)



Fonte: Imagem do autor

1.5 O ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE *Lippia alba*

As plantas do gênero *Lippia* são parte da família Verbenaceae com ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais. Esse gênero é composto por mais de 200 espécies que variam entre plantas herbáceas, arbustos pequenos e árvores. Comumente, muitas dessas espécies são utilizadas no tratamento de doenças relacionadas ao sistema gastrointestinal e respiratório. Estudos demonstram diversas propriedades farmacológicas atribuídas ao gênero *Lippia*, incluindo ação antimicrobiana, antifúngica, antimalárica, antiespasmódica, analgésica, anti-inflamatória e antipirética (SANTOS *et al.*, 2016).

A *Lippia alba* (Mill.) NE Brown é uma planta aromática originária das Américas e possui uma ampla distribuição, abrangendo o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. No Brasil, essa espécie está presente em diversas regiões, e popularmente pode ser chamada como “erva-cidreira”, “carmelitana”, “erva-cidreira-do-campo” e “falsa-melissa”. A erva cidreira é empregada tradicionalmente na medicina popular brasileira em infusões, extratos alcoólicos, macerações e formulações para compressas e banhos para tratar diversas condições, tais como doenças gástricas, diarreia, febre, asma e tosse, sendo reconhecida também por suas propriedades calmantes e antiespasmódicas (COSTA *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2016; SOUSA *et al.*, 2015)

O emprego na medicina tradicional pode ser atribuído, ao menos em parte, aos seus componentes bioativos voláteis. No entanto, é importante notar que podem existir consideráveis variações na composição dos óleos essenciais (OE) de *L. alba*, dependendo da origem do material vegetal, do estágio de crescimento e da parte específica da planta escolhida para a

destilação, método de extração do OE. A ampla atividade biológica de *L. alba* é provavelmente resultante da significativa diversidade desses constituintes bioativos (COSTA et al., 2014).

Em relação as características de composição química, o citral é um dos principais componentes no óleo essencial de *L. alba*, consistindo em uma mistura de dois isômeros estruturalmente distintos, mas com a mesma fórmula molecular: transgeranial e cis-neral. Diversas pesquisas destacaram as propriedades farmacológicas do citral, abrangendo efeitos espasmódicos, anti-inflamatórios, sedativos e antinociceptivos. A carvona e limoneno também fazem parte dos componentes mais encontrados nos óleos essenciais das folhas de *L. alba*. Além desses, outros compostos voláteis (monoterpenos e fenilpropanóides) foram descritos como metabólitos no OE dessa espécie vegetal: linalol, β -cariofileno, tagetona, mirceno, γ -terpineno, cânfora, estragol, eucaliptol e piperitona. (JUIZ et al., 2015; SANTOS et al., 2016; SOUSA et al., 2015).

Figura 4 – Erva-cidreira (*Lippia alba*)



Fonte: Imagem do autor

1.6 O ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE *Plinia trunciflora*

A *P. trunciflora* pertence à família Myrtaceae e é uma espécie de jabuticabeira nativa do Brasil. A presença de vários compostos fenólicos nesta fruta confere-lhe uma significativa atividade antioxidante, sendo que esta característica é principalmente associada aos flavonóis e antocianinas presentes em maior concentração na casca do fruto, além de compostos fenólicos. Na medicina tradicional, variedades de *Plinia* têm sido empregadas para tratar distúrbios estomacais, questões relacionadas à garganta e diabetes. (CARVALHO et al., 2022; LAGO et al., 2011).

A árvore mantém suas folhas durante todo o ano e pode atingir uma estatura média de até 15 metros, com um tronco que pode chegar a 40 centímetros de diâmetro. Sua casca, de tonalidade cinza a castanha, é suave e descama. Suas folhas, opostas umas às outras, são simples, em forma de lança e possuem uma tonalidade verde-escura, podendo atingir até 7 centímetros de comprimento. Possui flores, de cor branca pequenas e frutos são bagas suculentas e globosas, podendo alcançar até 3 centímetros de diâmetro (JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2023; OLIVEIRA et al., 2003).

Os estudos das características químicas e aplicações do óleo essencial dessa planta demonstram uma variabilidade na concentração de seus componentes por fatores como localização, clima, idade da planta dentre outros e apontam para uma possível atividade antimicrobiana ainda pouco explorada. Os componentes citados por serem os mais predominantemente encontrados OE das folhas da *P. trunciflora* são α -cadinol, apiol, α -terpineol, cubenol, espatulenol e o óxido de cariofileno (APEL et al., 2006; LAGO et al., 2011).

Figura 5 – Folhas de jabuticaba (*Plinia trunciflora*)



Fonte: Imagem do autor

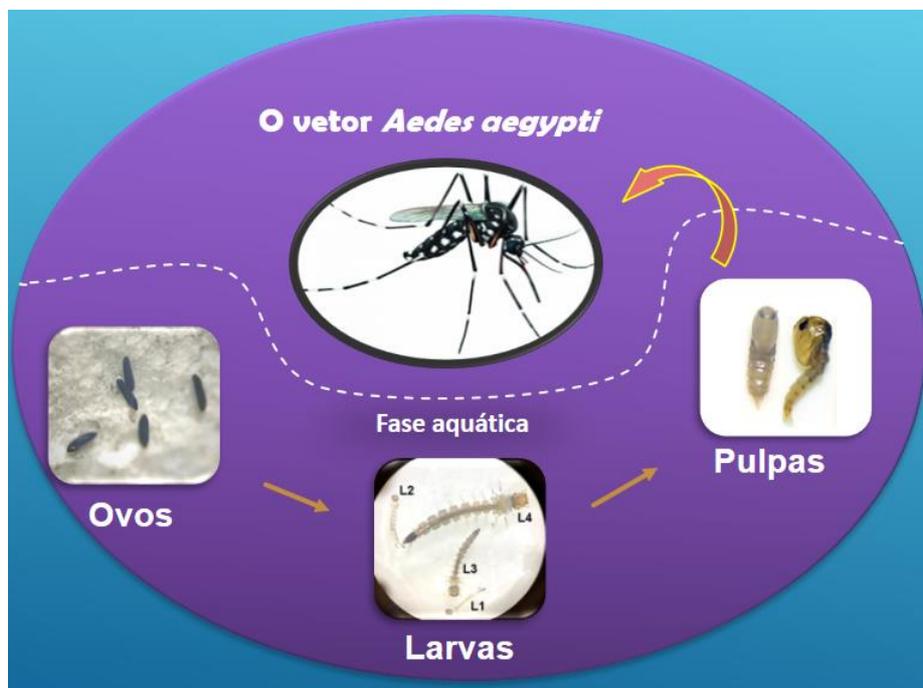
1.7 O VETOR *Aedes aegypti*

O mosquito da espécie *Ae. aegypti* é o principal vetor responsável pela transmissão de patógenos causantes de diversas arboviroses como dengue, chikungunya, zika e febre amarela, prevalentes em inúmeras regiões do mundo. Essas patologias além de causarem episódios de estado doente pontuais, podem ser causadoras de alterações morfológicas em seres humanos como microcefalia, Síndrome de Guillain-Barré e outras alterações neurológicas associadas com o vírus Zika. Sintomas que podem incluir febre, dor de cabeça, mialgia, erupção cutânea e

poliartralgia estão associados à Chikungunya, podendo esses sintomas persistirem por meses após a infecção ocorrer. Nos casos de dengue, pacientes com infecção grave podem desenvolver hemorragia múltiplas, às vezes levando ao óbito (DELRIEU et al., 2023; DE MORAIS et al., 2019)

O ciclo de vida do mosquito *Ae. aegypti* inclui 4 fases: uma fase a fase de ovo, duas fases aquáticas sucessivas (larval e pupa) e uma forma adulta (Figura 6). O mosquito adulto tem um tamanho médio de 5 mm, com uma coloração escura e pernas caracterizadas por faixas pretas e brancas. Os machos dessa espécie são principalmente fitófagos, obtendo sua alimentação a partir de néctar e outros carboidratos de origem vegetal para suprir a energia necessária às atividades, como o voo. Em contrapartida, as fêmeas também se alimentam de açúcares vegetais, mas necessitam de nutrientes sanguíneos para concluir o desenvolvimento ovariano. (TASCA et al., 2023; YANG et al., 2009).

Figura 6 – Ciclo de vida *Ae. aegypti*



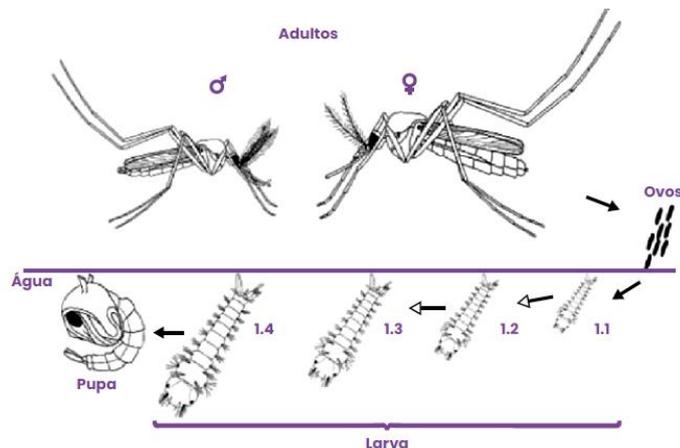
Fonte: Imagem do autor

A reprodução dos mosquitos de *Ae. aegypti* se dá após o repasto sanguíneo feito pelas fêmeas da espécie, pois inicia-se a maturação dos ovos, ou seja, a ovogênese. O *Ae. aegypti*, em comparação com outras espécies, tende a se alimentar várias vezes entre duas oviposições consecutivas, principalmente quando é perturbado antes de estar completamente alimentado. Essa particularidade eleva a probabilidade de o mosquito ingerir e transmitir o vírus (BARATA et al., 2001)

A escolha do local de oviposição pelas fêmeas é o principal determinante para a distribuição dos mosquitos em seus locais de reprodução, sendo de extrema importância para a distribuição das espécies na natureza. Diversos fatores físicos, químicos e biológicos podem exercer influência nessa decisão. Os ovos do mosquito do gênero *Aedes* podem realizar o fenômeno de diapausa, que ocorre quando o desenvolvimento do inseto é interrompido devido a fatores bióticos e/ou abióticos, proporcionando ao inseto a capacidade de sobreviver em condições adversas. A suspensão temporária da eclosão após o término do desenvolvimento embrionário, é uma ocorrência natural em mosquitos que depositam seus ovos fora da água, como é o caso do *Aedes* e a resistência dos ovos em ambiente seco pode ser significativamente prolongada, alcançando mais de um ano (RIOS et al., 2014; CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

A larva de mosquito atravessa quatro estágios de desenvolvimento (Figura 7), sendo o último deles o mais prolongado. Em média, os machos passam por um desenvolvimento larval mais rápido em comparação com as fêmeas. (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Figura 7 - Estágios larvais do *Ae. aegypti*.



Fonte: Andrade e Serpa Filho (2021).

1.8 LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* spp.

As infecções fúngicas sistêmicas ganham destaque como causas significativas de morbidade e mortalidade. O gênero *Candida*, em especial, é frequentemente identificada em hemoculturas de pacientes hospitalizados, e a incidência de infecções fúngicas, principalmente em indivíduos imunocomprometidos em ambientes como terapia intensiva, unidades pós-cirúrgicas e pacientes oncológicos está em ascensão (CRISEO; SCORDINO; ROMEO, 2015; SILVA et al., 2012).

As infecções fúngicas podem afetar alguns tecidos como pele, cabelo, unhas, mucosas, quando superficiais e outras potencialmente fatais quando sistêmicas, sendo

normalmente isoladas da cavidade oral, tratos vulvovaginal e urinário, detectadas em cerca de 31–55% dos indivíduos saudáveis. Historicamente, *C. albicans* constituía a maioria dos isolados clínicos, representando 70-80%, enquanto outras espécies de *Candida* não *albicans* (NCAC), como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, eram raramente encontradas. No entanto, nos últimos 10-30 anos, as espécies de NCAC emergiram como agentes patogênicos oportunistas significativos em seres humanos, e suas identificações se tornaram mais fácil com o avanço da tecnologia em exames de diagnóstico microbiológico (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015; SILVA et al., 2012).

Dentre os patógenos fúngicos de humanos, aqueles pertencentes ao gênero *Candida spp.* são os mais comuns, entre 200 espécies descritas, aproximadamente de *Candida*, somente 15 delas foram isoladas de infecções em humanos. Mesmo *C. albicans* sendo um microrganismo pertencente à microbiota humana endógena, também faz parte das 5 espécies causadoras da maioria das infecções em humanos, sendo elas: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015).

Determinados grupos de risco têm sido associados a algumas espécies de *Candida spp.*, como *C. glabrata* e *C. tropicalis* que são encontradas em pacientes com enfermidades hematológicas ou de órgãos sólidos e neutropenia; *C. krusei* naqueles pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas; *C. parapsilosis* é hoje a segunda espécie de *Candida* mais frequentemente isolada em hemoculturas, estando associada mais comumente nas infecções em neonatos, principalmente nas infecções relacionadas a cateteres (CRISEO; SCORDINO; ROMEO, 2015; POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os óleos essenciais são metabólitos secundários com abrangentes aplicações nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos. Suas extensas aplicações vêm se difundindo em diferentes países, tornando-os cada vez mais importantes no cenário comercial com influência econômica crescente. Além dos aspectos químicos que podem ser explorados, os óleos essenciais apresentam um perfil toxicológico baixo para o ser humano, além de ser uma opção favorável ao meio ambiente. Desta maneira, estudos que visam determinar os potenciais larvicidas e fungicidas de óleos essenciais a partir de plantas do cotidiano podem trazer bons impactos sociais, especialmente visando ao desenvolvimento de produtos comerciais, como a sugestão de novos medicamentos e/ou bioinseticidas. Neste contexto, os setores de saúde pública e meio ambiente também poderiam ser favorecidos, com a diminuição de atendimentos e ou com o uso de produtos sustentáveis. Considerando estas características aqui mencionadas os objetivos do presente trabalho foram:

1. Obter óleos essenciais de plantas consumidas em rotina e de interesse na indústria;
2. Avaliar atividade larvicida em *Ae. aegypti*;
3. Avaliar o potencial fungicida em leveduras;
4. Identificar os constituintes químicos dos óleos essenciais testados.

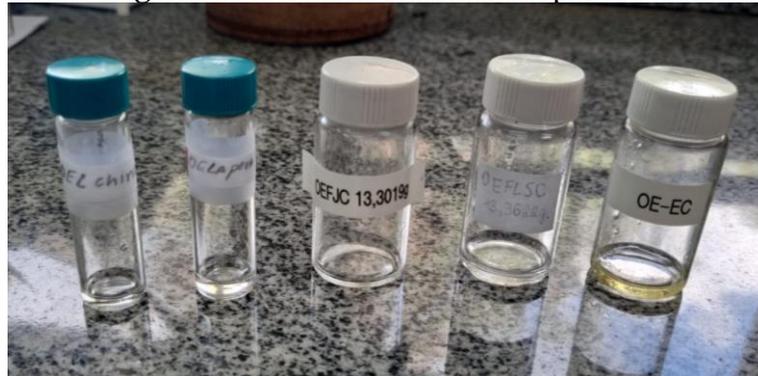
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ESPÉCIES VEGETAIS SELECIONADA

As espécies das plantas escolhidas para a extração dos óleos essenciais foram identificadas comparando-se informações botânicas gerais com banco de dados da literatura (FIOCRUZ, JABOT E REFLORA) e incluíram *Citrus Sinensis* – laranja pera, *Citrus latifolia Tanaka* – limão taiti, *Citrus Limon* – limão siciliano, *Lippia alba* – erva cidreira e *Plinia trunciflora* - Jabuticaba-sabará.

As plantas utilizadas no trabalho foram coletadas de diferentes lugares e em dias diferentes. A amostra de Erva cidreira foi coletada na cidade de Paracatu-MG no dia 12 de setembro às 8:00 h da manhã e posteriormente refrigerada, seu transporte ocorreu em bolsa térmica e o óleo essencial foi extraído no dia seguinte à sua coleta. As amostras das folhas de limão siciliano e as folhas de jabuticaba foram coletadas em Luziânia-GO na região leste no dia 1 de setembro às 18:00 h, ambas ficaram refrigeradas em saco plástico até a extração do óleo. Para as folhas de limão siciliano, o óleo foi extraído no quinto dia após a coleta, e para as folhas de jabuticaba, no sexto dia. Os óleos essenciais (limão taiti e laranja pera) foram extraídos a partir de frutos adquiridos em mercados locais na cidade de Brasília-DF.

Figura 8 – Óleos essenciais das espécies utilizadas



Fonte: Imagem do autor

3.2 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As extrações dos óleos essenciais em estudo foram feitas com o uso de aparelho de Clevenger, pelo princípio da hidrodestilação (Figura 9), o óleo essencial é conduzido pelo vapor de água e recuperado pelo processo de condensação (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014). As extrações dos óleos a partir das folhas e incluíram seus respectivos ramos. Essas partes foram recortadas manualmente e com o auxílio de uma tesoura para que pudessem ser transferidas para o balão de fundo redondo com capacidade de 6 L. Posteriormente, cerca de

3L de água potável foi adicionada até cobrir as partes das plantas utilizadas. O balão foi colocado na manta aquecedora, e a hidrodestilação se iniciou quando a água do balão começou a ebulir atingindo a temperatura de 100°C, sendo realizado um ciclo extrativo com cerca de 3 horas para cada espécie de planta. Os frutos, de limão taiti e laranja pera, pesando cerca de 1kg cada, foram cortados aleatoriamente com auxílio de uma faca e colocados no balão de fundo redondo, assim como descrito para as demais amostras. No entanto, seu ciclo extrativo durou cerca de 4 horas. Os óleos essenciais obtidos (Figura 10) foram coletados em frasco de vidro vedado com tampa rosqueável e identificado, e em seguida foram armazenados à -20 °C até serem empregados nos testes.

Figura 9 - Aparelho Clevenger



Fonte: Imagem do autor

Figura 10 - Obtenção do óleo essencial



Fonte: Imagem do autor

3.3 ENSAIO LARVICIDA

3.3.1 Preparo das larvas

Os testes larvicidas foram realizados no Insetário ArboControl Prof. José Elias de Paula, anexo ao laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília com larvas *Ae. aegypti* de cepa Rockefeller. As colônias de mosquitos foram mantidas no laboratório onde se reproduziam e mantinham o quantitativo de larvas para testes larvicidas seguindo as instruções preconizadas pela Organização Mundial da Saúde, assim como foi realizado no presente teste descrito. Os mosquitos foram tratados sob condições de fotoexposição (12 horas), umidade e temperatura controladas, e divididos em gaiolas onde eram alimentados de uma solução de água com açúcar a 10% adicionada a um recipiente de vidro com papel filtro. Além disso, as fêmeas do mosquito foram alimentadas com sangue de equino para que ocorressem os processos de produção e maturação dos ovos.

A eclosão dos ovos para a obtenção de larvas L3 foi realizada com 50 mg de ovos obtidos dos papéis de oviposição previamente retirados das gaiolas e secos sob temperatura ambiente. Os ovos pesados eram colocados no vácuo por 1 hora para melhor homogeneidade no tempo de eclosão e depois transferidos para uma bandeja contendo 4 L de água potável e ração para felino, onde levavam cerca de 72-96 horas para que as larvas chegassem ao estágio larval (L3) do teste.

3.3.2 Triagem das amostras com atividade larvicida

O ensaio larvicida ocorreu em uma etapa de triagem para o rastreio de quais amostras seriam ativas para a função larvicida e uma segunda etapa para a verificação da concentração mínima em essas amostras seriam ativas. Inicialmente as amostras foram testadas na concentração de 250 µg/mL diluídas em DMSO (Dimetilsulfóxido). Além do preparo da amostra foi realizada a preparação da placa de teste com 12 poços. Nessas placas foram adicionadas 10 larvas por poço separadas das bandejas de criação. As amostras diluídas foram aplicadas na placa de poços em triplicata, o volume da solução pipetada nos poços era de 50 µL, e o mesmo volume apenas de DMSO foi adicionado aos 3 poços de controle negativo. A leitura do teste para se verificar a quantidade de larvas mortas foi feita em 24, 48 e 72 horas após a aplicação das amostras. A mortalidade das larvas nos tempos foi feita com contagem manual, onde as placas eram cuidadosamente agitadas e as larvas que não apresentavam algum movimento eram contabilizadas mortas. Ao final de cada contagem eram feitas as médias de morte nos 3 poços para cada amostra.

3.3.4 Teste dose-resposta

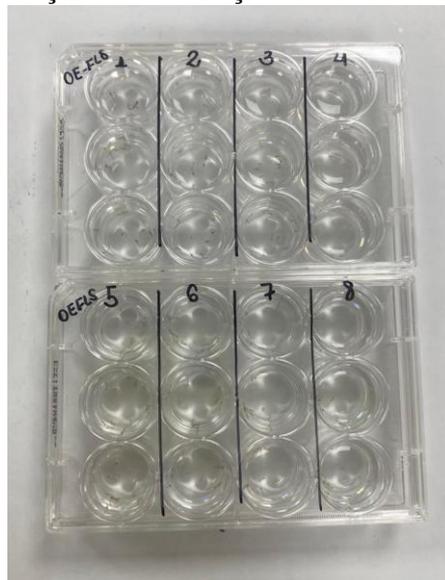
Esta etapa consistiu na verificação da concentração mínima em que as amostras de óleos essenciais da laranja pera (*Citrus Sinensis*), limão taiti (*Citrus latifolia Tanaka*), folha de limão siciliano (*Citrus Limon*), jabuticaba-sabará (*Plinia trunciflora*) e erva cidreira (*Lippia alba*) seriam ativas. A determinação do potencial larvicida das amostras ativas em outras concentrações foi feita a partir de uma diluição seriada do valor inicial de 250 µg/mL de cada uma das amostras de óleo essencial. Foram realizadas 8 diluições que resultaram nas concentrações de aproximadamente 125 µg/mL; 63 µg/mL; 31 µg/mL; 16 µg/mL; 8 µg/mL; 4 µg/mL; 2 µg/mL e cada uma dessas concentrações foi testada em triplicata na placa de poços para a avaliação da mortalidade das larvas (figuras 11 e 12).

Figura 11 – Ensaio dose resposta com todas as amostras e controle.



Fonte: Imagem do autor

Figura 12 – Distribuição das 8 diluições de uma amostra na placa de poço



Fonte: Imagem do autor

3.4 ENSAIO FUNGICIDA

3.4.1 Preparo dos fungos

Os fungos utilizados para a avaliação da atividade fungicida dos óleos essenciais extraídos foram leveduras, com 2 cepas *American Type Culture Collection* (ATCC) e duas cepas do gênero *Candida.*, conforme indica a Tabela 1.

Tabela 1-Fungos utilizados na avaliação da atividade fungicida dos óleos essenciais

FUNGO	TIPO
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	Levedura
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)	Levedura
<i>Candida tropicalis</i>	Levedura
<i>Candida glabrata</i>	Levedura

Antes de se realizar os testes é necessário a preparação dos fungos de acordo com os parâmetros ideais. Inicialmente, os fungos (leveduras) a serem testados foram colocados para crescer em meio ágar batata dextrose em tubos de ensaio identificados com o nome da levedura inoculada e a data, previamente preparados, na estufa com condições de 35°C por 48h, ou seja, dois dias antes do teste, procedimento denominado repique. Esse processo é realizado para que se tenha um inóculo com número adequado de estruturas jovens. No dia do teste, os fungos foram retirados em pouca quantidade do meio anterior (ágar batata dextrose) com a ajuda de uma alça de platina aquecida e transferidos para uma solução salina estéril a 0,85 % (0,85 g de NaCl em 100 mL de água destilada). Essa solução foi levada ao espectrômetro UV-Vis marca Bel photonics, modelo UV-M51 funcionando com comprimento de onda definido em 625 nm, região espectral em que há poucas espécies absorventes interferentes, em uma cubeta de vidro de 10mm. O valor ideal de absorbância para o teste é de 0,08 a 0,13, faixa ideal que representa a quantidade de unidades celulares da levedura em suspensão na solução salina. Valores abaixo de 0,08 indicam que a quantidade de levedura está baixa para o teste, e valores acima, demonstram quantidade elevada de fungos em suspensão. Sendo assim valores altos ou baixos de fungo podem enviesar a análise do potencial fungicida da amostra testada.

3.4.2 Triagem das amostras com atividade fungicida

O teste de potencial fungicida ocorreu também em uma etapa de triagem para o rastreio de quais amostras seriam ativas para essa função e uma segunda etapa para a verificação da

concentração mínima em que essas amostras seriam ativas. Nesse teste, tanto as amostras quanto os fungos já anteriormente preparados, passaram por uma série de diluições em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) que é um meio enriquecido com aminoácidos, vitaminas e outros nutrientes essenciais para propiciar o crescimento celular.

O preparo das amostras consistiu na pesagem de 25 mg de cada óleo essencial solubilizado em 1 mL de DMSO e, a partir dessa primeira solução, foi feita uma segunda diluição em meio RPMI para que a concentração de DMSO não passe de 5% (v/v), já que este solvente apresenta toxicidade relativa para os fungos testados. Desta forma, uma fração da primeira amostra foi colocada em um tubo tipo Eppendorf enumerado com a identificação do óleo essencial em DMSO e um volume calculado de meio RPMI foi adicionado para se obter a concentração necessária de 4 mg/mL. O preparo da diluição dos fungos em meio RPMI foi feito em duas diluições consecutivas a partir da solução salina com fungo inoculado. Na primeira diluição, os volumes utilizados resultaram numa proporção de 1:10 de solução salina e fungo para meio RPMI (I), e um volume dessa solução foi utilizado para a segunda diluição para uma proporção de 1:20 em meio RPMI (II).

Para a aplicação do teste foram utilizadas placas de 96 poços em formato de 'U' onde foram inicialmente adicionados 50 µL em triplicata de cada amostra diluída em meio RPMI e 100 µL da solução contendo os fungos diluídos em RPMI (II), sendo esse processo realizado para cada uma das 4 cepas de leveduras. Além das amostras, uma fileira com 8 poços foi preparada com somente o meio RPMI e outra fileira com 8 poços contendo somente meio RPMI e fungos como controles negativo e positivo respectivamente. Ao final, as placas prontas foram vedadas com parafilme e acondicionadas na estufa em 26 °C e 56 % de umidade por 48 h até a leitura. O crescimento das leveduras foi avaliado de forma visual. Por fim, os poços onde se tinham as amostras que não apresentaram crescimento ou pouquíssimo crescimento da levedura foram elegíveis para o teste de dose-resposta (Figura 13).

Figura 13- Placa com crescimento de leveduras

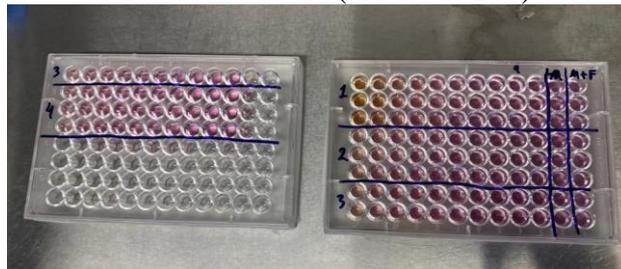


Fonte: Imagem do autor

3.4.3 Teste dose-resposta

A etapa do teste de dose resposta nas leveduras consistiu na verificação da concentração mínima necessária em que as amostras de óleos essenciais da Laranja pêra (*Citrus Sinensis*), Limão taiti (*Citrus latifolia Tanaka*), Limão siciliano (*Citrus Limon*), Jabuticaba-sabará e Erva cidreira de folha (*Lippia alba*) seriam ativas, inibindo o crescimento desses microrganismos. A determinação do potencial fungicida foi feita a partir de uma diluição seriada da concentração inicial de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de cada uma das amostras de óleo essencial. Foram realizadas 10 diluioes que resultaram nas concentraoes de aproximadamente 1000 $\mu\text{g/mL}$; 500 $\mu\text{g/mL}$; 250 $\mu\text{g/mL}$; 125 $\mu\text{g/mL}$; 63 $\mu\text{g/mL}$; 31 $\mu\text{g/mL}$; 16 $\mu\text{g/mL}$; 8 $\mu\text{g/mL}$; 4 $\mu\text{g/mL}$; 2 $\mu\text{g/mL}$ e cada uma dessas concentraoes foi testada em triplicata, na placa de poços, para cada um dos fungos. Ao final as placas foram vedadas e acondicionadas na estufa com condioes de temperatura e umidade de 26 $^\circ\text{C}$ e 56 % de umidade por 48 h até a etapa de leitura, que foi realizada do mesmo modo da triagem das amostras, com avaliação visual do crescimento das leveduras em cada uma das concentraoes. Para ser considerada a concentração mínima inibitória a amostra precisava apresentar o resultado de nenhum crescimento nos 3 poços que tinham a mesma concentração (Figura 14).

Figura 14 - Aplicação do teste de Concentração Mínima Inibitória na levedura *Candida albicans* (ATCC 10231)



Fonte: Imagem do autor

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os óleos essenciais extraídos das folhas de limão siciliano, das folhas de erva cidreira, das folhas de jabuticaba, do fruto laranja pera e do fruto limão taiti apresentaram colorações que variaram de incolor à levemente amarelado. Suas características odoríferas eram bem fortes e marcantes. A literatura mostra uma série de estudos que levantam várias atividades biológicas para os óleos essenciais analisados neste trabalho, com material robusto sobre as atividades antibacterianas, antifúngicas, antioxidante e anti-inflamatória (APEL *et al.*, 2006; LOPES CAMPÊLO *et al.*, 2011; PUCCI *et al.*, 2020; VELLA *et al.*, 2020)

4.1 ENSAIO LARVICIDA

O teste larvicida, inicialmente, foi realizado com as amostras dos óleos essenciais aqui citados e com amostras de extratos vegetais em acetato de etila para a triagem e continuação dos testes dose-resposta. Os resultados das amostras de extratos vegetais apresentaram baixa atividade larvicida, com pouca ou nenhuma atividade na concentração de 250 µg/mL. Por outro lado, os óleos essenciais apresentaram uma taxa de 100 % de morte das larvas na mesma concentração no prazo de 24 h, com potencial de atividade larvicida promissor (Tabela 2), o que permitiu a continuação dos testes que determinaram a relação de concentração da amostra com a morte das larvas. Por esses motivos o presente estudo não continuou com as análises dos extratos vegetais e prosseguiu somente com os óleos essenciais.

Tabela 2- Teste de triagem em *Ae. Aegypti* na concentração de 250 µg/mL.

Nº	Amostras	Média de larvas mortas em 24h	Média de larvas mortas em 48h	Média de larvas mortas em 72h
1	OE laranja pêra	10	10	10
2	OE limão taiti	10	10	10
3	OE folhas de erva cidreira	10	10	10
4	OE folhas de limão siciliano	10	10	10
5	OE folhas de jabuticaba	10	10	10
6	E folha de manga	0	1,33	2,33
7	E folha de caju	0,33	0,67	1
8	E folha de acerola	1	3,67	6
9	E folha de jabuticaba	0	1,33	2

Legenda: OE-óleo essencial, E-extrato

As Tabelas 3, 4 e 5, apresentam os resultados dos testes dose-respostas realizados após a triagem. O objetivo deste teste é avaliar a concentração mínima necessária do OE para causar a atividade larvicida.

Tabela 3-Teste dose-resposta em larvas de *Ae. Aegypti* em 24 h de exposição

Nº	Código da Amostra – Concentração (µg/mL)	Número de larvas mortas por poço			Média	%
		1	2	3		
1	OE Laranja pera - 250	10	10	10	10	100
2	OE Laranja pera - 125	10	10	10	10	100
3	OE Laranja pera - 62	10	10	8	9,3	93
4	OE Laranja pera - 31	5	9	2	5,3	53
5	OE Laranja pera - 16	0	0	0	0	0
6	OE Laranja pera - 8	0	0	0	0	0
7	OE Laranja pera - 4	0	0	0	0	0
8	OE Laranja pera - 2	0	0	0	0	0
9	OE Limão taiti - 250	10	10	10	10	100
10	OE Limão taiti - 125	10	10	10	10	100
11	OE Limão taiti - 62	10	10	10	10	100
12	OE Limão taiti - 31	4	1	1	2	20
13	OE Limão taiti - 16	0	0	0	0	0
14	OE Limão taiti - 8	0	0	0	0	0
15	OE Limão taiti - 4	0	0	0	0	0
16	OE Limão taiti - 2	0	0	0	0	0
17	OE Folha de limão siciliano - 250	10	10	10	10	100
18	OE Folha de limão siciliano - 125	9	9	9	9	90
19	OE Folha de limão siciliano - 62	7	8	7	7,3	73
20	OE Folha de limão siciliano - 31	1	3	2	2	20
21	OE Folha de limão siciliano - 16	0	0	0	0	0
22	OE Folha de limão siciliano - 8	0	0	0	0	0
23	OE Folha de limão siciliano - 4	0	0	0	0	0
24	OE Folha de limão siciliano - 2	0	0	0	0	0
25	OE Folha de erva cidreira - 250	10	10	10	10	100
26	OE Folha de erva cidreira - 125	9	10	9	9,3	93
27	OE Folha de erva cidreira - 62	4	2	2	2,7	26
28	OE Folha de erva cidreira - 31	0	0	1	0,3	3
29	OE Folha de erva cidreira - 16	0	0	0	0	0
30	OE Folha de erva cidreira - 8	0	0	0	0	0
31	OE Folha de erva cidreira - 4	1	0	0	0,3	3
32	OE Folha de erva cidreira - 2	0	0	0	0	0
33	OE Folha de jabuticaba - 250	10	10	10	10	100
34	OE Folha de jabuticaba - 125	10	10	10	10	100
35	OE Folha de jabuticaba - 62	2	6	2	3,3	33
36	OE Folha de jabuticaba - 31	0	0	0	0	0
37	OE Folha de jabuticaba - 16	0	0	0	0	0
38	OE Folha de jabuticaba - 8	0	0	0	0	0
39	OE Folha de jabuticaba - 4	0	0	1	0,3	3
40	OE Folha de jabuticaba - 2	0	0	0	0	0
41	DMSO	0	0	0	0	0

Tabela 4-Teste dose-resposta em larvas de *Ae. Aegypti* em 48 h de exposição

Nº	Código da Amostra - Concentração (µg/mL)	Número de larvas mortas por poço			Média	%
		1	2	3		
1	OE Laranja pera - 250	10	10	10	10	100
2	OE Laranja pera - 125	10	10	10	10	100
3	OE Laranja pera - 62	10	10	8	9,3	93
4	OE Laranja pera - 31	5	9	2	5,3	53
5	OE Laranja pera - 16	0	0	0	0	0
6	OE Laranja pera - 8	0	0	0	0	0
7	OE Laranja pera - 4	0	0	0	0	0
8	OE Laranja pera - 2	0	0	0	0	0
9	OE Limão taiti - 250	10	10	10	10	100
10	OE Limão taiti - 125	10	10	10	10	100
11	OE Limão taiti - 62	10	10	10	10	100
12	OE Limão taiti - 31	5	2	1	2,7	27
13	OE Limão taiti - 16	0	1	0	0,3	3
14	OE Limão taiti - 8	0	0	0	0	0
15	OE Limão taiti - 4	0	0	0	0	0
16	OE Limão taiti - 2	0	0	0	0	0
17	OE Folha de limão siciliano - 250	10	10	10	10	100
18	OE Folha de limão siciliano - 125	10	9	10	9,7	97
19	OE Folha de limão siciliano - 62	8	9	7	8	80
20	OE Folha de limão siciliano - 31	5	6	3	4,7	47
21	OE Folha de limão siciliano - 16	1	0	0	0,3	3
22	OE Folha de limão siciliano - 8	0	1	0	0,3	3
23	OE Folha de limão siciliano - 4	0	0	0	0	0
24	OE Folha de limão siciliano - 2	0	0	0	0	0
25	OE Folha de erva cidreira - 250	10	10	10	10	100
26	OE Folha de erva cidreira - 125	10	10	10	10	100
27	OE Folha de erva cidreira - 62	4	3	5	4	40
28	OE Folha de erva cidreira - 31	4	3	4	3,7	37
29	OE Folha de erva cidreira - 16	0	0	0	0	0
30	OE Folha de erva cidreira - 8	0	0	0	0	0
31	OE Folha de erva cidreira - 4	1	0	0	0,3	3
32	OE Folha de erva cidreira - 2	0	0	0	0	0
33	OE Folha de jabuticaba - 250	10	10	10	10	100
34	OE Folha de jabuticaba - 125	10	10	10	10	100
35	OE Folha de jabuticaba - 62	5	6	4	5	50
36	OE Folha de jabuticaba - 31	2	0	1	1	10
37	OE Folha de jabuticaba - 16	0	0	0	0	0
38	OE Folha de jabuticaba - 8	1	0	0	0,3	3
39	OE Folha de jabuticaba - 4	2	0	1	1	10
40	OE Folha de jabuticaba - 2	2	0	0	0,7	7
41	DMSO	0	0	0	0	0

Tabela 5-Teste dose-resposta em larvas de *Ae. Aegypti* em 48 h de exposição

N°	Código da Amostra – Concentração (µg/mL)	Número de larvas mortas por poço			Média	%
		1	2	3		
1	OE Laranja pera - 250	10	10	10	10	100
2	OE Laranja pera - 125	10	10	10	10	100
3	OE Laranja pera - 62	10	10	8	9,3	93
4	OE Laranja pera - 31	5	9	4	6	60
5	OE Laranja pera - 16	2	0	0	0,7	7
6	OE Laranja pera - 8	1	0	0	0,3	3
7	OE Laranja pera - 4	0	0	0	0	0
8	OE Laranja pera - 2	1	1	0	0,7	7
9	OE Limão taiti - 250	10	10	10	10	100
10	OE Limão taiti - 125	10	10	10	10	100
11	OE Limão taiti - 62	10	10	10	10	100
12	OE Limão taiti - 31	6	4	3	4,3	43
13	OE Limão taiti - 16	0	1	1	0,7	7
14	OE Limão taiti - 8	0	0	1	0,3	3
15	OE Limão taiti - 4	0	1	0	0,3	3
16	OE Limão taiti - 2	0	0	0	0	0
17	OE Folha de limão siciliano - 250	10	10	10	10	100
18	OE Folha de limão siciliano - 125	10	9	10	9,7	97
19	OE Folha de limão siciliano - 62	9	10	7	8,7	87
20	OE Folha de limão siciliano - 31	5	6	6	5,7	57
21	OE Folha de limão siciliano - 16	1	2	0	1	10
22	OE Folha de limão siciliano - 8	0	1	1	0,7	7
23	OE Folha de limão siciliano - 4	2	0	1	1	10
24	OE Folha de limão siciliano - 2	0	0	0	0	0
25	OE Folha de erva cidreira - 250	10	10	10	10	100
26	OE Folha de erva cidreira - 125	10	10	10	10	100
27	OE Folha de erva cidreira - 62	4	5	4	4,7	47
28	OE Folha de erva cidreira - 31	5	4	5	4,7	47
29	OE Folha de erva cidreira - 16	0	0	1	0,3	3
30	OE Folha de erva cidreira - 8	0	0	0	0	0
31	OE Folha de erva cidreira - 4	1	1	1	1	10
32	OE Folha de erva cidreira - 2	0	0	1	0,3	3
33	OE Folha de jabuticaba - 250	10	10	10	10	100
34	OE Folha de jabuticaba - 125	10	10	10	10	100
35	OE Folha de jabuticaba - 62	5	6	6	5,7	57
36	OE Folha de jabuticaba - 31	2	1	1	1,3	13
37	OE Folha de jabuticaba - 16	0	0	0	0	0
38	OE Folha de jabuticaba - 8	2	1	0	1	10
39	OE Folha de jabuticaba - 4	2	0	1	1	10
40	OE Folha de jabuticaba - 2	3	0	0	1	10
41	DMSO	0	0	0	0	0

Os óleos essenciais avaliados apresentaram comportamento semelhante em relação às diluições e correspondente atividade larvicida, com decaimento da atividade larvicida a partir

da concentração de 31 µg/mL, exceto pelo óleo de erva cidreira que decaiu consideravelmente já na concentração de 62 µg/mL, com morte de 47 % das larvas em 72 h de observação.

Os óleos essenciais de laranja pera, limão taiti e das folhas do limão siciliano apresentaram os percentuais médios de mortalidade das larvas acima de 80 % até a concentração de 62 µg/mL na observação final de 72 h. Os resultados próximos podem estar relacionados com o fato dessas plantas serem do gênero *Citrus*, produtoras de frutos cítricos, o que leva a necessidade de mais pesquisa sobre os fatores de composição química que podem relacionar as amostras e seus desempenhos como agentes larvicidas em comum. Outro ponto relevante é que se trata de resultados obtidos de plantas produzidas em larga escala, com grandes quantidades de óleos essenciais obtidos anualmente e expressivo impacto financeiro, no Brasil (BIZZO, Humberto R; HOVELL; REZENDE, 2009; TEIXEIRA; MARQUES; FIGUEIREDO, 2013).

As frutas cítricas ocupam a posição de destaque na produção agrícola global, sendo a laranja a variedade principal. Nos últimos dez anos, aproximadamente 95% do volume total de óleos essenciais exportados anualmente pelo Brasil consistiu no óleo essencial de laranja, representando entre 80 % e 90 % do valor total gerado com as exportações desse segmento no mesmo período. Durante a última década, o país teve uma média anual de 168 toneladas de óleo essencial de limão taiti exportadas. No entanto, em 2020, esse número atingiu 182,6 toneladas, resultando em uma receita de US\$ 3,7 milhões. A produção do óleo de limão siciliano, extraído por meio de um processo a frio, experimentou um crescimento significativo ao longo do decênio. Iniciando em 182 toneladas em 2011, essa produção aumentou para 318 toneladas em 2019, registrando um notável salto para 820 toneladas em 2020 (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; BIZZO; REZENDE, 2022; TEIXEIRA; MARQUES; FIGUEIREDO, 2013).

A continuidade dos testes com esses óleos pode trazer ainda mais perspectivas de aplicações para esses óleos que apresentam uma boa disponibilidade no mercado. Estudos com suas frações isoladas, testes pupicidas, adulticidas e estudos sinérgicos entre eles podem ser propostas de continuação dos estudos a fim de se consolidar a atividade desses óleos essenciais contra o vetor *Ae. Aegypti*.

Os óleos das folhas de jabuticaba e das folhas de erva cidreira apresentaram atividade menor que 60 % na concentração de 62 µg/mL na observação final de 72 h, mas em concentrações superiores apresentaram atividade superior a 90 % já nas primeiras 24 h observadas. Um estudo anterior de atividade larvicida demonstrou que os óleos essenciais

derivados das folhas de *L. alba* (quimiotipos II e III), e outras espécies do gênero *Lippia*, como *L. aff. gracilis*, *L. gracilis* e *L. microphylla* demonstraram potencial como agentes larvicidas naturais eficazes contra *A. aegypti*. Esses resultados indicam que a utilização de óleos essenciais provenientes da espécie *Lippia* no controle de insetos representa uma possibilidade alternativa, contribuindo para a redução dos efeitos tóxicos associados a alguns compostos pesticidas no meio ambiente. (P SANTIAGO *et al.*, 2006)

A literatura carece de informações sobre o óleo essencial da espécie de jabuticaba estudada neste trabalho. Os resultados obtidos também demonstraram algum potencial larvicida em concentrações de 250 µg/mL e 125 µg/mL, com 100% de morte das larvas já em 24 h de exposição ao óleo essencial. A introdução de uma possível atividade biológica para uma amostra ainda não muito estudada abre possibilidades para uma série de estudos mais aprofundados.

Todos os óleos apresentaram atividade larvicida superior a 90 % na concentração de 250 µg/mL e 125µg/mL já nas primeiras 24h observadas. Os resultados obtidos a partir dos testes larvicidas com as amostras dos óleos essenciais testados abrem possibilidades de pesquisas posteriores para o melhor entendimento dos potenciais observados. A necessidade de estudos complementares para a avaliação da composição química dos OE foi perceptível, dado que há uma variabilidade dessa composição por diversos fatores atrelados a planta, como seu modo de cultivo, temperatura, ambiente, entre outros. Desta forma, entender quais componentes otimizam os resultados obtidos podem iniciar uma série de outros testes, tais como o pupicida e com o mosquito adulto, tornando a utilização dos óleos essenciais uma alternativa frente ao combate desse vetor responsável por diversas doenças que impactam na saúde pública do país e do mundo.

4.2 ENSAIO FUNGICIDA

O teste fungicida, inicialmente, também contou com as amostras dos óleos essenciais aqui citados e com amostras de extratos vegetais para a triagem e continuação dos testes dose-resposta. No entanto o presente estudo continuou os testes dose-resposta somente com os óleos essenciais.

No teste fungicida a triagem das amostras que inibiram o crescimento das leveduras foi feita à uma concentração de 1000 µg/mL, a leitura foi realizada de modo visual e as amostras que foram ativas ou pouco ativas, quando uma quantidade quase imperceptível de fungo cresceu, seguiram para o teste de concentração inibitória mínima em cada uma das leveduras

Candida glabrata, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida albicans* (ATCC 10231). Os OE de laranja pera (OE-LAR), limão taiti (OE-LT), folha de limão siciliano (OE-FLS) e erva cidreira (OE-FEC) apresentaram atividade em 3 das 4 cepas testadas, com exceção da *Candida albicans* (ATCC 10231), para a qual nenhuma amostra demonstrou atividade fungicida. Já o óleo da folha de jabuticaba (OE-FJ) apresentou atividade somente na cepa de *Candida tropicalis* (Tabela 6).

Tabela 6-Resultados da triagem das amostras em 4 cepas de levedura na concentração de 1000 µg/mL

Código amostras	Leveduras			
	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. Albicans</i> (ATCC10231)	<i>C. Parapsilosis</i> (ATCC 22019)
1- OE-LAR	atividade moderada	ativa	inativa	atividade moderada
2- OE-FJ	atividade moderada	inativa	inativa	inativa
3- OE-LT	atividade moderada	atividade moderada	inativa	atividade moderada
4- OE-FLS	atividade moderada	atividade moderada	inativa	atividade moderada
5- OE-FEC	atividade moderada	atividade moderada	inativa	atividade moderada

O teste de concentração mínima inibitória (CMI) foi realizado com as amostras dos óleos que tiveram um pouco de atividade ou ativas para cada levedura em 10 concentrações obtidas através de diluição seriada. A concentração inicial foi de 1000 µg/mL, diluída nas concentrações de aproximadamente 500 µg/mL, 250µg/mL, 125 µg/mL, 62 µg/mL, 31 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL e 2 µg/mL. No teste CMI os resultados foram considerados quando nenhum sinal visual de crescimento era obtido dos 3 poços. Os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7- Concentrações mínimas inibitórias das amostras em cada levedura.

Código amostras	Concentração Mínima Inibitória (µg/mL)			
	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. Albicans</i> (ATCC10231)	<i>C. Parapsilosis</i> (ATCC 22019)
1- OE-LAR	-	-	-	-
2- OE-FJ	-	-	-	-
3- OE-LT	-	500	-	500
4- OE-FLS	250	250	-	250
5- OE-FEC	250	125	-	-

A amostra de OE das folhas de erva cidreira obteve concentração mínima inibitória de 250 µg/mL para *C.tropicallis* e de 125 µg/mL para *C.glabrata* e não obteve atividade em nenhuma concentração para *C.parapsilosis* (ATCC 22019). O OE das folhas de limão siciliano obteve como CMI de 250 µg/mL para *C.tropicallis*, *C.glabrata* e *C.parapsilosis* (ATCC 22019). Dentre os óleos que seguiram para o teste de concentração mínima inibitória, o OE das folhas do limão siciliano foi o único que apresentou CMI em todas as 3 leveduras em que foi testado. Para as amostras de OE do limão taiti foi relatada CMI de 500 µg/mL para as leveduras *C.glabrata* e *C.parapsilosis* (ATCC 22019). Os óleos de laranja pêra e das folhas de jabuticaba não tiveram atividade fungicida em nenhuma das concentrações nas leveduras em que foram testados.

Os resultados obtidos são animadores e demonstram potencial fungicida que pode ser explorado nos óleos essenciais que tiveram concentração mínima inibitória em alguma levedura. As cepas do gênero *Candida* utilizadas no teste são de fungos que apresentam uma alta taxa de infecção em humanos, sendo as maiores causadoras de infecção fúngica (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015). A pesquisa de produtos naturais como os OEs para problemas recorrentes de saúde pública, como as infecções fúngicas podem trazer resultados que impactam a saúde humana e se tornam possibilidades de desenvolvimento farmacêutico, gerando também impacto financeiro. Nesse sentido, os resultados do teste em questão se tornam importantes no que diz respeito aos impactos anteriormente citados.

4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

A avaliação química dos óleos essenciais pode ser feita por cromatografia gasosa com

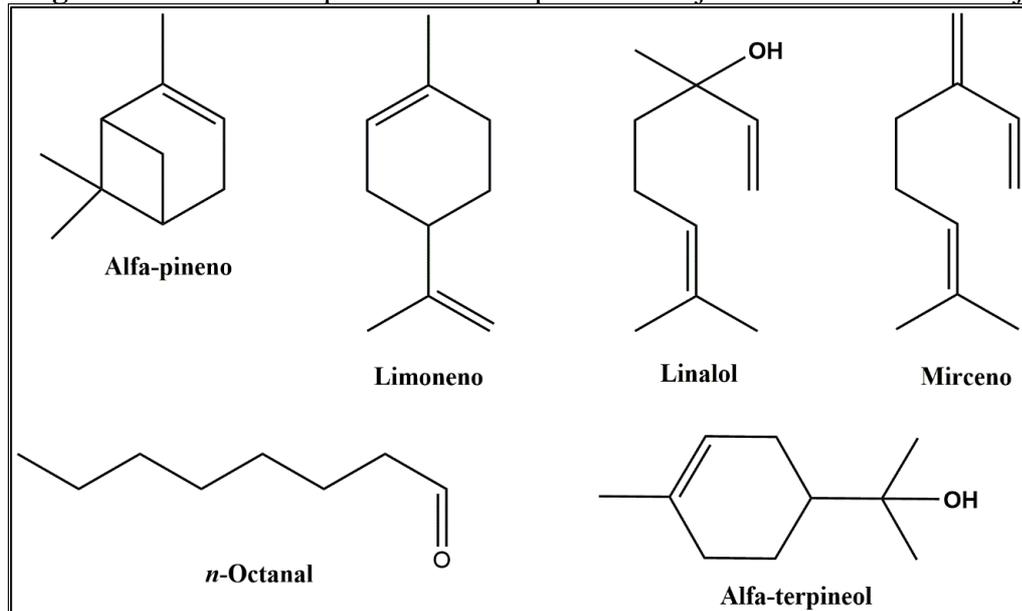
detector de ionização de chama (CG-FID) ou acoplado à espectrometria de massa como método analítico. A técnica da cromatografia gasosa é empregada para a separação de gases ou substâncias orgânicas voláteis, como óleos essenciais. Na técnica, um gás quimicamente inerte, denominado gás de arraste elui os componentes constituintes da mistura da coluna (fase estacionária). Os compostos que possuem menor interação com a fase estacionária são inicialmente removidos pela ação desse gás, alcançando o detector. Posteriormente, são eluídos os compostos que apresentam maior afinidade com a fase estacionária. A escolha do detector varia de acordo com o analito que será analisado. O detector de ionização em chama (do inglês, *Flame Ionization Detector* - FID) consiste na queima do analito em estado gasoso em uma chama de hidrogênio e oxigênio, produzindo íons e elétrons. Esses íons são coletados e formam uma corrente, gerando o sinal que é traduzido em uma resposta gráfica. Desta maneira é possível interpretar e quantificar os componentes da amostra. (NASCIMENTO *et al.*, 2018)

No entanto, por fatores técnicos a análise dos óleos não foi concluída no presente estudo e, por isso, os dados referentes a caracterização dos componentes dos óleos essenciais estudados aqui são um compilado de informações levantadas mediante busca na literatura e comparação entre os estudos que elucidam sobre a composição química, a fim de se obter informações sobre os componentes majoritários de cada um desses óleos e as funções atreladas a eles. A Tabela 7 apresenta os compostos majoritários encontrados em amostras de óleos essenciais das amostras estudadas neste trabalho.

Tabela 8-Componentes majoritários dos óleos essenciais encontrados na literatura

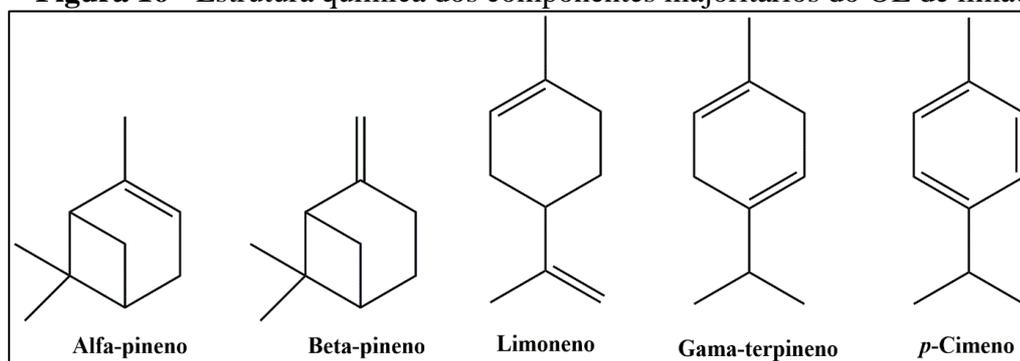
Óleo Essencial	Compostos Majoritários	Referências
laranja pera	limoneno, linalol, mirceno, α -pineno, n-octanal e α -terpineol	(RUBERTO <i>et al.</i> , 1997; ZAREIYAN; KHAJEHSHARIFI, 2021)
limão taiti	limoneno, γ -terpineno, β -pineno, α -pineno e p-cimeno	(KUMMER <i>et al.</i> , 2013; SELVARAJ; PRASAD; VENKATESHWARLU, 2002)
folhas de erva cidreira	geranial, citral, limoneno, carvona e β -sesquifelandreno	(LÓPEZ; STASHENKO; FUENTES, 2011; P SANTIAGO <i>et al.</i> , 2006)
folhas de limão siciliano	limoneno, geranial, neral, mirceno e linalool	(PETRETTO <i>et al.</i> , 2023)
folhas de jabuticaba	α -cadinol, apiol, α -terpineol, cubenol, espatulenol, óxido de cariofileno, β -cariofileno, globulol e epi-globulol.	(APEL <i>et al.</i> , 2006; LAGO <i>et al.</i> , 2011)

As estruturas químicas de alguns destes compostos são mostradas na Figura 15, 16, 17, 18 e 19.

Figura 15 – Estrutura química dos componentes majoritários do OE de laranja pera.

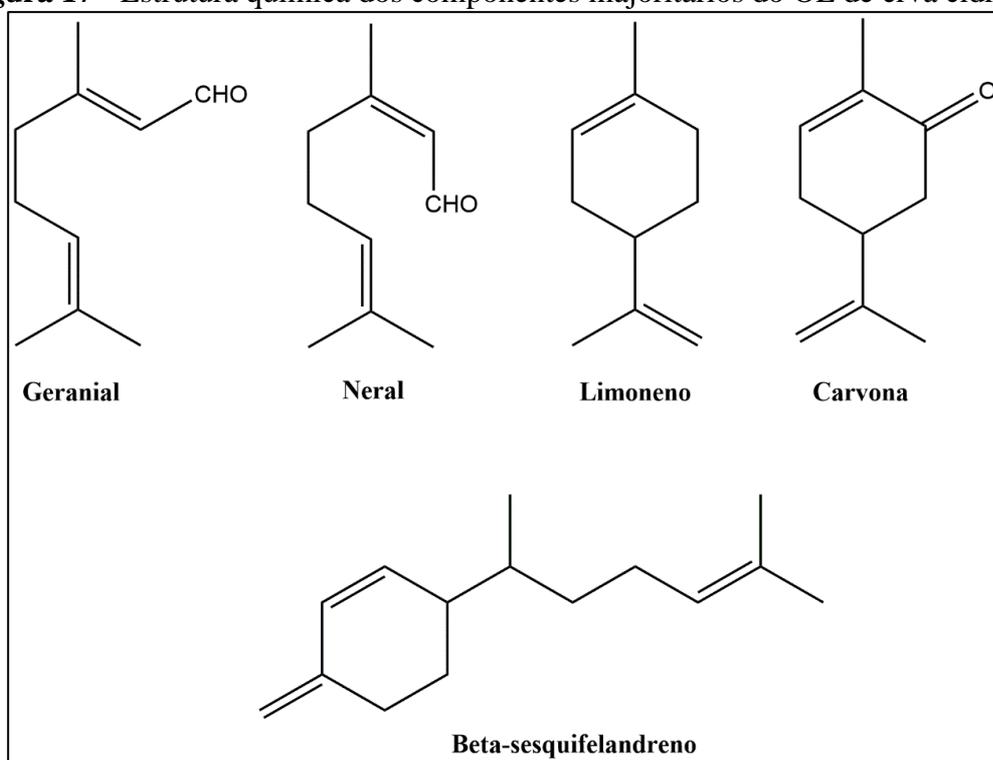
Fonte: Imagem do autor

Figura 16 - Estrutura química dos componentes majoritários do OE de limão taiti.



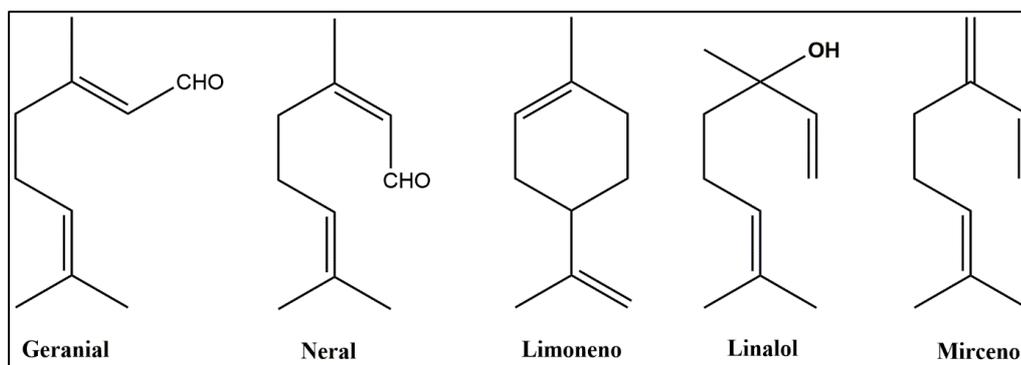
Fonte: Imagem do autor

Figura 17 - Estrutura química dos componentes majoritários do OE de erva cidreira.



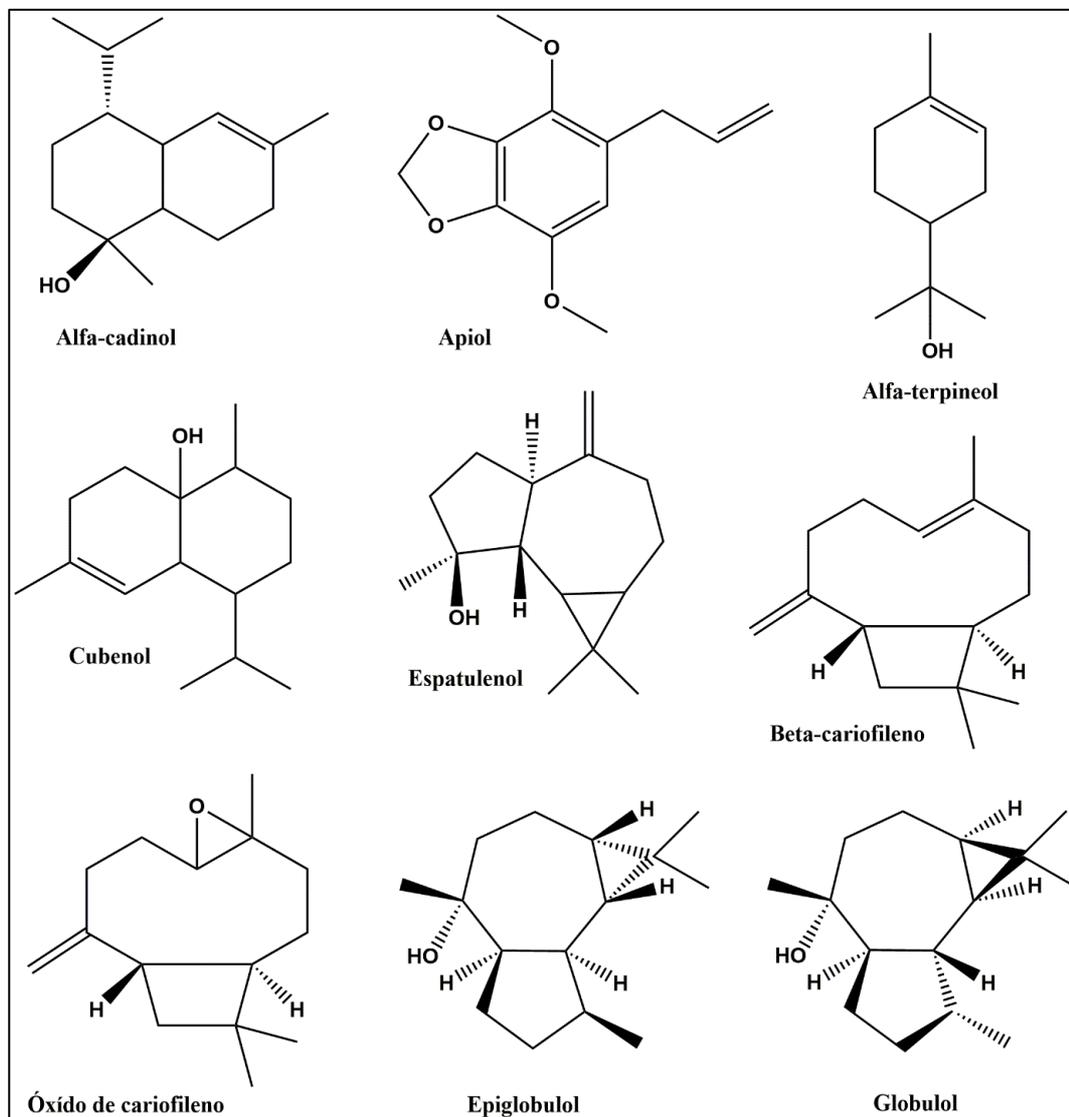
Fonte: Imagem do autor

Figura 18 - Estrutura química dos componentes majoritários do OE das folhas de limão siciliano.



Fonte: Imagem do autor

Figura 19 - Estrutura química dos componentes majoritários do OE das folhas de jabuticaba



Fonte: Imagem do autor

5 CONCLUSÕES

Neste estudo, buscou-se realizar a extração de óleos essenciais de plantas e frutos que podem ser encontradas no cotidiano das pessoas. A extração por hidrodestilação foi realizada de modo satisfatório e as amostras puderam ser usadas em testes larvicidas e fungicidas a fim de determinar potenciais biológicos para os óleos essenciais em questão.

Os testes larvicidas demonstraram que todas as amostras tiveram algum potencial larvicida, com destaque para as amostras dos frutos cítricos e das folhas de limão siciliano que obtiveram bons resultados na concentração de 62 µg/mL, enquanto as amostras de erva cidreira e das folhas de jabuticaba tiveram melhores resultados em concentrações mais altas. A relação das amostras de plantas que são do mesmo gênero *Citrus* com resultados próximos pode resultar em estudos que relacionem compostos presentes em plantas desse gênero com a ação larvicida. No entanto é necessário mais testes e um estudo complementar dos componentes químicos desses óleos para se criar uma relação de concentrações de determinado(s) composto(s) com o melhor desempenho larvicida.

Em relação ao teste fungicida, os óleos de erva cidreira, limão taiti e das folhas de limão siciliano apresentaram alguma atividade fungicida e obtiveram concentrações mínimas inibitórias. O óleo essencial da erva cidreira teve a menor concentração mínima inibitória obtida no estudo para a cepa de *Candida glabrata*, com valor de 125 µg/mL, e também apresentou atividade fungicida para a cepa *Candida tropicalis* em um valor de concentração de 250 µg/mL. O óleo das folhas do limão siciliano teve o melhor desempenho em relação a quantidade de cepas em que foi ativo, com 3 cepas e CMI de 250 µg/mL em todos os casos. Esses resultados podem revelar algum potencial fungicida a ser explorado, com o aprofundamento da composição de cada óleo.

A caracterização através de método analítico para os óleos é de suma importância para se entender o comportamento observado. É possível compreender através de estudos sobre composição química de óleos essenciais que muitos fatores podem alterar as características em relação a concentração dos componentes, ou até mesmo revelar quimiotipos diferentes. Neste sentido, etapas futuras deste trabalho incluem análises químicas para a caracterização dos óleos essenciais e seus componentes bem como aprofundar os estudos sobre as atividades biológicas. Além de outros estudos que podem otimizar os resultados com a exploração de frações dos óleos, sinergismo, dentre outros.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, Hebert Tadeu de Almeida; SERPA-FILHO, Arlindo. **Princípios Básicos de Entomologia Médica** / Hebert Tadeu de Almeida Andrade, Arlindo Serpa-Filho (organizadores). – Natal: EDUFRN, 2021.

APEL, Miriam A.; SOBRAL, Marcos; ZUANAZZI, José Ângelo; HENRIQUES, Amélia T. Essential oil composition of four *Plinia* species (Myrtaceae). **Flavour and Fragrance Journal**, vol. 21, nº 3, p. 565–567, 16 maio 2006. <https://doi.org/10.1002/ffj.1638>.

BARATA, Eudina AM de Freitas; COSTA, Antônio Ismael P da; CHIARAVALLI NETO, Francisco; GLASSER, Carmen M; BARATA, José Maria S; NATAL, Delsio. População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, vol. 35, nº 3, p. 237–242, jun. 2001. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102001000300004>.

BIZZO, Humberto R; HOVELL, Maria C; REZENDE, Claudia M. **Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas**. [S. l.: s. n.], 2009.

BIZZO, Humberto; REZENDE, Claudia. O MERCADO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO BRASIL E NO MUNDO NA ÚLTIMA DÉCADA. **Química Nova**, 2022. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170889>.

BONACCORSI, Ivana; SCIARRONE, Danilo; SCHIPILLITI, Luisa; DUGO, Paola; MONDELLO, Luigi; DUGO, Giovanni. Multidimensional enantio gas chromatography/mass spectrometry and gas chromatography–combustion-isotopic ratio mass spectrometry for the authenticity assessment of lime essential oils (*C. aurantifolia* Swingle and *C. latifolia* Tanaka). **Journal of Chromatography A**, vol. 1226, p. 87–95, fev. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.038>.

CARVALHO, Andrey Vinícios S.; RIBEIRO, Rafael T.; DURÁN-CARABALI, Luz Elena; MARTINI, Ana Paula R.; HOEPER, Eduarda; SANCHES, Eduardo F.; KONRATH, Eduardo Luis; DALMAZ, Carla; WAJNER, Moacir; NETTO, Carlos Alexandre. *Plinia trunciflora* Extract Administration Prevents HI-Induced Oxidative Stress, Inflammatory Response, Behavioral Impairments, and Tissue Damage in Rats. **Nutrients**, vol. 14, nº 2, p. 395, 17 jan. 2022. <https://doi.org/10.3390/nu14020395>.

CONSOLI, Rotraut A. G. B.; OLIVEIRA, Ricardo Lourenço de. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. [S. l.]: Editora FIOCRUZ, 1994. <https://doi.org/10.7476/9788575412909>.

COSTA, Danielle Cristina Machado; VERMELHO, Alane Beatriz; ALMEIDA, Catia Amancio; DIAS, Edilma Paraguai de Souza; CEDROLA, Sabrina Martins Lage; ARRIGONI-BLANK, Maria de Fátima; BLANK, Arie Fitzgerald; ALVIANO, Celuta Sales; ALVIANO, Daniela Sales. Inhibitory effect of linalool-rich essential oil from *Lippia alba* on the peptidase and keratinase activities of dermatophytes. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, vol. 29, nº 1, p. 12–17, 1 fev. 2014. <https://doi.org/10.3109/14756366.2012.743537>.

CRISEO, Giuseppe; SCORDINO, Fabio; ROMEO, Orazio. Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 111, p. 50–56, abr. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.02.004>.

DE, Lurian; RIOS, Souza; EDER, ; SILVA, Henrique; HIROSE, ; Edson; JOSÉ, ;; BARRIGOSI, Alexandre. **Determinação da diapausa pelo desenvolvimento gonadal em percevejos de importância agrícola.** [S. l.: s. n.], [s. d.].

DE MORAIS, Lilian Mirian Oliveira; JUSSIANI, Eduardo Inocente; ZEQUI, João Antonio Cyrino; DOS REIS, Paulo José; ANDRELLO, Avacir Casanova. Morphological study of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) eggs by X-ray computed microtomography. **Micron**, vol. 126, 1 nov. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2019.102734>.

DELRIEU, Méryl; MARTINET, Jean Philippe; O'CONNOR, Olivia; VIENNET, Elvina; MENKES, Christophe; BURTET-SARRAMEGNA, Valérie; D. FRENTIU, Francesca; DUPONT-ROUZEYROL, Myrielle. Temperature and transmission of chikungunya, dengue, and Zika viruses: A systematic review of experimental studies on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Current Research in Parasitology and Vector-Borne Diseases**, vol. 4, 1 jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2023.100139>.

DOS REIS GASPARETTO, Bruna; CHELALA MOREIRA, Rafael; PRISCILLA FRANÇA DE MELO, Rayanne; DE SOUZA LOPES, Aline; DE OLIVEIRA ROCHA, Liliana; MARIA PASTORE, Glaucia; LEMOS BICAS, Juliano; MARTINEZ, Julian; JOY STEEL, Caroline. Effect of supercritical CO₂ fractionation of Tahiti lemon (*Citrus latifolia* Tanaka) essential oil on its antifungal activity against predominant molds from pan bread. **Food Research International**, vol. 162, p. 111900, dez. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111900>.

JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. *Plinia* in Flora e Funga do Brasil. 12 dez. 2023. <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB10852>. .

JUIZ, PAULO JOSÉ LIMA; LUCCHESI, ANGELICA MARIA; GAMBARI, ROBERTO; PIVA, ROBERTA; PENOLAZZI, LETIZIA; DI CIANO, MARTINA; UETANABARO, ANA PAULA TROVATTI; SILVA, FRANCELI; AVILA-CAMPOS, MARIO JULIO. Essential oils and isolated compounds from *Lippia alba* leaves and flowers: Antimicrobial activity and osteoclast apoptosis. **International Journal of Molecular Medicine**, vol. 35, nº 1, p. 211–217, jan. 2015. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1995>.

KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ; SZOPA; EKIERT. Citrus limon (Lemon) Phenomenon—A Review of the Chemistry, Pharmacological Properties, Applications in the Modern Pharmaceutical, Food, and Cosmetics Industries, and Biotechnological Studies. **Plants**, vol. 9, nº 1, p. 119, 17 jan. 2020. <https://doi.org/10.3390/plants9010119>.

KUMMER, Raquel; FACHINI-QUEIROZ, Fernanda Carolina; ESTEVÃO-SILVA, Camila Fernanda; GRESPAN, Renata; SILVA, Expedito Leite; BERSANI-AMADO, Ciomar Aparecida; CUMAN, Roberto Kenji Nakamura. Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of *Citrus latifolia* Tanaka Essential Oil and Limonene in Experimental Mouse Models. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2013, p. 1–8, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/859083>.

LAGO, João Henrique G.; SOUZA, Elisângela Dutra; MARIANE, Bruna; PASCON, Renata; VALLIM, Marcelo A.; MARTINS, Roberto Carlos C.; BAROLI, Adriana A.; CARVALHO, Bianca A.; SOARES, Marisi G.; SANTOS, Roberta T. dos; SARTORELLI, Patricia. Chemical and Biological Evaluation of Essential Oils from Two Species of Myrtaceae — *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. **Molecules**, vol. 16, nº 12, p. 9827–9837, 25 nov. 2011. <https://doi.org/10.3390/molecules16129827>.

LOPES CAMPÊLO, Lidianne Mayra; MOURA GONÇALVES, Fabrício Custódio; FEITOSA, Chistiane Mendes; DE FREITAS, Rivelilson Mendes. Antioxidant activity of *Citrus limon* essential oil in mouse hippocampus. **Pharmaceutical Biology**, vol. 49, n° 7, p. 709–715, 3 jul. 2011. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.541924>.

LÓPEZ, Molkary Andrea; STASHENKO, Elena E.; FUENTES, Jorge Luis. Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. **Genetics and Molecular Biology**, vol. 34, n° 3, p. 479–488, 29 jul. 2011. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572011005000030>.

MAHDANI, Fatma Yasmin; PARMADIATI, Adiastruti Endah; ERNAWATI, Diah Savitri; HUSAIN, Hasrul; EKAPERDANA, Sekar Alifa Putri; RACHMANINGAYU, Ulyasari; HADI, Priyo; HENDARTI, Hening Tuti; SURBOYO, Meircurius Dwi Condro. *Citrus limon* Peel Essential Oil–Induced Type IV Hypersensitivity Reaction. **Journal of Experimental Pharmacology**, vol. Volume 12, p. 213–220, jul. 2020. <https://doi.org/10.2147/JEP.S256139>.

NASCIMENTO, Ronaldo; LIMA, Ari; BARBOSA, Pablo; SILVA, Vítor. **Cromatografia gasosa Aspectos teóricos e práticos**. [S. l.: s. n.], 2018.

OCAK, Ijlal; ÇELIK, Ali; ÖZEL, M. Zafer; KORCAN, Elif; KONUK, Muhsin. Antifungal Activity and Chemical Composition of Essential Oil of *Origanum Hypericifolium*. **International Journal of Food Properties**, vol. 15, n° 1, p. 38–48, jan. 2012. <https://doi.org/10.1080/10942911003687249>.

OLIVEIRA, Antônio Luís de; BRUNINI, Maria Amalia; SALANDINI, Cleyton Alberto Ramos; BAZZO, Flavio Rodrigo. Caracterização tecnológica de jabuticabas “Sabará” provenientes de diferentes regiões de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol. 25, n° 3, p. 397–400, dez. 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452003000300009>.

P SANTIAGO, Gilvandete M; G LEMOS, Telma L; L PESSOA, Otilia D; C ARRIAGA, Ângela M; A MATOS, Francisco J; ANNE LIMA, Mary S; SANTOS, Hécio S; DA CONCEIÇÃO LIMA, Maria L; BARBOSA, Francisco G; S LUCIANO, João H; SILVEIRA, Edilberto R; A DE MENEZES, Gustavo H. **Larvicidal Activity Against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) of Essential Oils of *Lippia* Species from Brazil**. [S. l.: s. n.], 2006.

PETRETTO, Giacomo Luigi; VACCA, Giuseppe; ADDIS, Roberta; PINTORE, Giorgio; NIEDDU, Mariella; PIRAS, Franca; SOGOS, Valeria; FANCELLO, Francesco; ZARA, Severino; ROSA, Antonella. Waste Citrus limon Leaves as Source of Essential Oil Rich in Limonene and Citral: Chemical Characterization, Antimicrobial and Antioxidant Properties, and Effects on Cancer Cell Viability. **Antioxidants**, vol. 12, n° 6, p. 1238, 8 jun. 2023a. <https://doi.org/10.3390/antiox12061238>.

PETRETTO, Giacomo Luigi; VACCA, Giuseppe; ADDIS, Roberta; PINTORE, Giorgio; NIEDDU, Mariella; PIRAS, Franca; SOGOS, Valeria; FANCELLO, Francesco; ZARA, Severino; ROSA, Antonella. Waste Citrus limon Leaves as Source of Essential Oil Rich in Limonene and Citral: Chemical Characterization, Antimicrobial and Antioxidant Properties, and Effects on Cancer Cell Viability. **Antioxidants**, vol. 12, n° 6, p. 1238, 8 jun. 2023b. <https://doi.org/10.3390/antiox12061238>.

PINO, Jorge A.; ROSADO, Arístides. Comparative Investigation of the Distilled Lime Oils (*Citrus aurantifolia* Swingle and *Citrus latifolia* Tanaka) from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, vol. 13, nº 3, p. 179–180, maio 2001. <https://doi.org/10.1080/10412905.2001.9699653>.

POLKE, Melanie; HUBE, Bernhard; JACOBSEN, Ilse D. Candida Survival Strategies. [*S. l.: s. n.*], 2015. p. 139–235. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.12.002>.

PUCCI, Marzia; RAIMONDO, Stefania; ZICHITTELLA, Chiara; TINNIRELLO, Vincenza; CORLEONE, Valeria; AIELLO, Gioacchino; MOSCHETTI, Marta; CONIGLIARO, Alice; FONTANA, Simona; ALESSANDRO, Riccardo. Biological Properties of a Citral-Enriched Fraction of Citrus limon Essential Oil. **Foods**, vol. 9, nº 9, p. 1290, 14 set. 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9091290>.

RUBERTO, Giuseppe; RENDA, Agatino; PIATTELLI, Mario; RAPISARDA, Paolo; STARRANTINO, Angelo. Essential Oil of Two New Pigmented Citrus Hybrids, *Citrus clementina* × *Citrus sinensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 45, nº 2, p. 467–471, 1 fev. 1997. <https://doi.org/10.1021/jf960109j>.

SANTOS, Nara; PASCON, Renata; VALLIM, Marcelo; FIGUEIREDO, Carlos; SOARES, Marisi; LAGO, João; SARTORELLI, Patricia. Cytotoxic and Antimicrobial Constituents from the Essential Oil of Lippia alba (Verbenaceae). **Medicines**, vol. 3, nº 3, p. 22, 12 ago. 2016. <https://doi.org/10.3390/medicines3030022>.

SELVARAJ, Y.; PRASAD, M. B. N. V.; VENKATESHWARLU, G. Profiles of Essential Oils of Peel and Leaf of a New Citrus Hybrid, *Citrus latifolia* Tanaka x *Citrus aurantifolia* Swingle. **Journal of Essential Oil Research**, vol. 14, nº 5, p. 369–371, 8 set. 2002. <https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699887>.

SILVA, Sónia; NEGRI, Melyssa; HENRIQUES, Mariana; OLIVEIRA, Rosário; WILLIAMS, David W.; AZEREDO, Joana. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, vol. 36, nº 2, p. 288–305, mar. 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>.

SOUSA, D.G.; SOUSA, S.D.G.; SILVA, R.E.R.; SILVA-ALVES, K.S.; FERREIRA-DASILVA, F.W.; KERNTOPF, M.R.; MENEZES, I.R.A.; LEAL-CARDOSO, J.H.; BARBOSA, R. Essential oil of Lippia alba and its main constituent citral block the excitability of rat sciatic nerves. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, vol. 48, nº 8, p. 697–702, ago. 2015. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20154710>.

TASCA, Gabriela de Mello; SCHABAT, Francis Maira; ORTH RIPKE, Marcia; KONFLANZ, Alexandre Lazzari; BAUERMAN, Adriana Carolina; BUSATO, Maria Assunta; ROMAN JÚNIOR, Walter Antonio; LUTINSKI, Junir Antônio. Extratos vegetais para controle de larvas do mosquito Aedes Aegypti. **Boletim do Museu Integrado de Roraima (Online)**, vol. 15, nº 1, p. 56–69, 14 ago. 2023. <https://doi.org/10.24979/bmirr.v15i1.1048>.

TEIXEIRA, João Paulo Feijão; MARQUES, Marcia Ortiz Mayo; FIGUEIREDO, José Orlando. Composição química de óleos essenciais de quinze genótipos de limão em duas épocas de colheita. **Citrus Research & Technology**, vol. 34, nº 2, 2013. <https://doi.org/10.5935/2236-3122.20130008>.

VELLA, Filomena Monica; CALANDRELLI, Roberto; CAUTELA, Domenico; FIUME, Immacolata; POCSFALVI, Gabriella; LARATTA, Bruna. Chemometric Screening of Fourteen Essential Oils for Their Composition and Biological Properties. **Molecules**, vol. 25, n° 21, p. 5126, 4 nov. 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25215126>.

YANG, H. M.; MACORIS, M. L.G.; GALVANI, K. C.; ANDRIGHETTI, M. T.M.; WANDERLEY, D. M.V. Assessing the effects of temperature on the population of *Aedes aegypti*, the vector of dengue. **Epidemiology and Infection**, vol. 137, n° 8, p. 1188–1202, 2009. <https://doi.org/10.1017/S0950268809002040>.

ZAREIYAN, Faraneh; KHAJEHSHARIFI, Habibollah. Analyzing Bioactive Compounds in Essential Oil of *Citrus maxima* and *Citrus sinensis* Peel. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, vol. 24, n° 4, p. 677–682, 4 jul. 2021. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2021.1958702>.