



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS CURSO DE  
LICENCIATURA EM QUÍMICA**

**NATALI EDUARDA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DO  
ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus latifolia* (TANAKA) FRENTE AO *Aedes aegypti***

**MACAPÁ  
2022**

**NATALI EDUARDA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DO  
ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus latifolia* (TANAKA) FRENTE AO *Aedes aegypti***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Licenciatura em Química da  
Universidade Federal do Amapá, como requisito  
para obtenção do título de licenciado em química

Orientador: Prof. Dr. Alex Bruno Lobato  
Rodrigues

**MACAPÁ  
2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca Central/UNIFAP-Macapá-AP  
Elaborado por Aline Farias Bandeira Couto – CRB-2 0017/O

---

S586a Silva, Natali Eduarda da  
Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *Citrus latifolia* (TANAKA) frente ao *Aedes aegypti*. [recurso eletrônico] / Natali Eduarda da Silva - Macapá, 2022.  
40 f.

Orientador: Alex Bruno Lobato Rodrigues  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Amapá – UNIFAP,  
Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas, Curso Licenciatura em Química. 2024.

Modo de acesso: World Wide Web.  
Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).

1. Óleos cítricos. 2. Citrus latifolia Tanaka 3. Lima acida taiti 4. Limão taiti. 5. Aedes aegypti. I.  
Rodrigues, Alex Bruno Lobato. II. Universidade Federal do Amapá - UNIFAP. III. Título.

CDD 23. ed. – 668.54

---

SILVA, Natali Eduarda da. **Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *Citrus latifolia* (TANAKA) frente ao *Aedes aegypti*.** Orientador: Alex Bruno Lobato Rodrigues. 2022. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2022.

**NATALI EDUARDA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DO  
ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus latifolia* (TANAKA) FRENTE AO *Aedes aegypti***

Monografia apresentado ao Curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal do Amapá, com objetivo de obter o título de licenciado em química.

Data de Aprovação \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

**Dr. Alex Bruno Lobato Rodrigues**  
**Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas - DCET**

---

**Dr. Ryan da Silva Ramos**  
**Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas - DCET**

---

**Dra. Lizandra Lima dos Santos**  
**Universidade do Estado do Amapá**

## **AGRADECIMENTOS**

Início agradecendo aos meus familiares, principalmente a minha mãe (Aldenici Ferreira) e irmã (Natália Silva), que estiveram comigo no decorrer da minha graduação e puderam suportar meus choros e surtos, muito obrigada por conseguirem. Gostaria de agradecer também minhe irmane (gosta de usar o gênero neutro e eu vou respeitar aqui) Alexis Solari, obrigada por ficar do meu lado e por acreditar em mim, mesmo quando eu não tinha forças para seguir a minha jornada, você foi lá e me ajudou a levantar. Um outro agradecimento é ao meu namorado Cristiano Warley Rabelo, ele que subiu na árvore para coletar as folhas porque eu não sei subir e obrigada por me motivar também. Não posso esquecer do namorado da minha Felipe Ferreira pois ele que me levou para fazer a minha matricula no curso que nem eu mesma estava sabendo que ia acontecer, foi tudo nas pressas para conseguir a documentação.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Dr. Alex Bruno Lobato Rodrigues, pois ele que me acolheu e se tornou um melhor orientador que o universo me trouxe, paciente e tranquilo. Por fim, obrigada ao universo por me trazer energias positivas.

## RESUMO

Dengue é uma doença viral, transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti*, além de ser o principal vetor do vírus da Chikungunya e da Zika. Nenhuma vacina foi validada pelo Anvisa, por consequente, a forma de combate da proliferação do *A. aegypti* é através de controle vetorial. Desta forma, existe a necessidade de desenvolvimento de novos produtos larvicidas e, uma das alternativas, é utilização de produtos naturais. Neste sentido, o presente trabalho possui o objetivo de avaliar a ação larvicida do das folhas secas da espécie *Citrus latifolia* (TANAKA) frente as larvas do terceiro estado do mosquito *A. aegypti*, em condições de laboratório. O bioensaio foi seguiu o World Health Organizations com modificações no recipiente teste e a extração das folhas secas foi feita através de hidrodestilação em aparelho Clevenger. O estudo concluiu que a espécie *C. latifolia* apresentou  $CL_{50} = 197,93 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  frente a larvas L3 de *A. aegypti* em 24 horas de exposição, mostrando-se moderadamente ativo.

**Palavras-Chave:** *Aedes aegypti*; *Citrus latifolia*; óleo essencial;

## ABSTRACT

Dengue is a viral disease, transmitted by the *Aedes aegypti* mosquito, in addition to being the main vector of the Chikungunya and Zika viruses. No vaccine has been validated by Anvisa, therefore, the way to combat the proliferation of *A. aegypti* is through vector control. In this way, there is a need to develop new larvicidal products and, one of the alternatives, is the use of natural products. In this sense, the present work has the objective of evaluating the larvicidal action of the dry leaves of the species *Citrus latifolia* (TANAKA) against the larvae of the third state of the mosquito *A. aegypti*, under laboratory conditions. The bioassay was followed by the World Health Organizations with modifications in the test container and the extraction of the dry leaves was done through hydrodistillation in a Clevenger apparatus. The study concluded that the species *C. latifolia* presented  $CL_{50} = 197.93 \mu\text{g.mL}^{-1}$  against *A. aegypti* L3 larvae in 24 hours of exposure, showing to be moderately active.

**Keyword:** *Aedes aegypti*; *Citrus latifolia*, essential oil

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - limeira Thaiti.	14
<b>Figura 2</b> - Fruto de <i>Citrus latifolia</i> (TANAKA).	15
<b>Figura 3</b> - Ácido Ascórbico.	16
<b>Figura 4</b> - Estrutura da p-sinefrina.	17
<b>Figura 5</b> - <i>Aedes aegypti</i>	18
<b>Figura 6</b> - Ciclo do <i>Aedes aegypti</i>	19
<b>Figura 7</b> - a) Papilas anais e b) Sifão respiratório	20
<b>Figura 8</b> - Larvas de <i>A. aegypti</i> nos estádios L3 e L4.	20
<b>Figura 9</b> - Tubo digestório.	21
<b>Figura 10</b> - Concentrações em Triplicatas.	26
<b>Figura 11</b> - Reação de hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase.	26
<b>Figura 12</b> - Flavonoides com atividade larvicida	27
<b>Figura 13</b> - Limonoides com atividade larvicida	28
<b>Figura 14</b> - Análise de morfológica do abdômen de larvas do 3 estágio de <i>Aedes aegypti</i> em contato com óleo essencial de <i>Citrus latifolia</i> (B) e com controle positivo (A) 48 horas após ensaio larvicida.	31
<b>Figura 15</b> - Análise de morfológica do sifão de papila anal de larvas do 3 estágio de <i>Aedes aegypti</i> em contato com óleo essencial de <i>Citrus latifolia</i> (B) e com controle positivo (A) 48 horas após ensaio larvicida.	31

## LISTA DE TABELA

**Tabela 1** - Análise da atividade larvicida do óleo essencial de *Citrus latifolia* em 24 e 48 horas de exposição.

29

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>13</b>
3.1 TAXONOMIA VEGETAL	13
<b>3.1.1. Família</b>	<b>13</b>
<b>3.1.2. Gênero Citrus</b>	<b>13</b>
<b>3.1.3. Espécie</b>	<b>14</b>
3.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA DO GÊNERO <i>CITRUS LATIFÓLIA</i> (TANAKA)	15
3.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA	16
3.4 LARVICIDA	17
<b>3.4.1 Larvas</b>	<b>20</b>
3.6 EDUCAÇÃO EM QUÍMICA PARA A SAÚDE E MEIO AMBIENTE	21
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>23</b>
4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL	23
4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>CITRUS LATIFÓLIA</i>	23
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOCIDA EM <i>A. AEGYPTI</i>	23
<b>4.4.1 Avaliação da atividade larvicida</b>	<b>23</b>
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>25</b>
5.1 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>CITRUS LATIFÓLIA</i>	25
5.2 ANÁLISE DE ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>CITRUS LATIFÓLIA</i>	26
5.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE LARVAS DE <i>Aedes Aegypti</i>	31
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>34</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As doenças como dengue, chikungunya e zika, transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*\*, afetam principalmente países de clima tropical, onde as condições ambientais, como temperatura elevada e alta umidade, são ideais para a proliferação desse vetor (NASCIMENTO et al., 2022). Nesse contexto, Ferreira (2003) propõe três abordagens principais para definir as doenças tropicais: a primeira enfatiza fatores ambientais, como temperatura e umidade; a segunda correlaciona essas doenças ao subdesenvolvimento; e a terceira combina ambos os critérios, valorizando os aspectos geográficos regionais. Considerando esses elementos, pode-se afirmar que a dengue é, de fato, uma doença tropical, pois prolifera em maior escala em regiões quentes e úmidas. Isso reforça a necessidade urgente de estudos que explorem formas eficazes de prevenção e controle dessa epidemia, particularmente em países tropicais.

A influência do clima na distribuição geográfica do *A. aegypti* tem sido amplamente documentada, com pesquisas indicando um impacto significativo de fatores meteorológicos no aumento da população de mosquitos (SILVA et al., 2008). Além disso, a dengue se destaca entre as doenças tropicais por ter se tornado um grave problema de saúde pública em diversos países, incluindo o Brasil, onde cerca de 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão do vírus. Para combater essa ameaça, o Ministério da Saúde, por meio da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), é responsável pela implementação de ações de vigilância, prevenção e controle das doenças transmissíveis, desempenhando um papel central na saúde pública brasileira (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Contudo, os desafios permanecem, como evidenciado pelo boletim epidemiológico de 2017, que relatou mais de 1.600.000 casos notificados de dengue e 863 óbitos confirmados, além de casos expressivos de febre amarela e chikungunya (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

O comportamento alimentar do mosquito também desempenha um papel crucial na disseminação dessas doenças. Apenas as fêmeas de *A. aegypti* são hematófagas, alimentando-se de sangue para completar seu ciclo reprodutivo. Essa característica, associada ao fato de que os artrópodes desse gênero possuem maior atividade diurna e preferem ambientes abertos, torna o controle desse vetor um desafio contínuo. Ao longo das décadas, inúmeras abordagens foram exploradas para reduzir a transmissão de doenças transmitidas por mosquitos, desde métodos naturais até intervenções artificiais (STEFANI, 2009). Contudo, a ausência de vacinas ou quimioprofilaxias disponíveis para todas as doenças transmitidas por mosquitos ressalta a importância de se buscar novas estratégias de controle vetorial.

O aumento da urbanização e as mudanças climáticas têm favorecido a proliferação do *A. aegypti*, elevando a transmissão de doenças como dengue, chikungunya e zika. A capacidade adaptativa do mosquito em ambientes urbanos tornou-se um fator crítico de saúde pública (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Fatores como temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade exercem influência direta na população de mosquitos, sendo os altos índices de chuva registrados, especialmente no primeiro semestre do ano, determinantes para o aumento da proliferação do vetor (VIANA, 2010). Nesse cenário, estratégias de controle mais eficazes e sustentáveis são necessárias.

Atualmente, o controle biológico do *A. aegypti* é realizado, em grande parte, por meio do uso de inseticidas químicos. No entanto, o aumento da resistência do mosquito a esses produtos e os danos ambientais causados pelos pesticidas têm motivado a busca por alternativas mais seguras e sustentáveis (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Nesse sentido, os larvicidas derivados de produtos naturais vêm ganhando relevância devido à sua menor toxicidade ao meio ambiente. Estudos sugerem que os óleos essenciais de plantas possuem propriedades larvicidas, inseticidas e repelentes, sendo promissores no combate ao *A. aegypti* (GOVINDARAJAN, 2010). Compostos presentes nesses óleos, como terpenos, álcoois e aldeídos, são apontados como os principais responsáveis por sua atividade larvicida (LUCIA et al., 2006).

Diante dessa perspectiva, o presente estudo visa avaliar o potencial larvicida do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus latifolia* (TANAKA) sobre as larvas de terceiro estágio de *A. aegypti*. Se comprovada a atividade biológica do extrato, ele pode representar uma alternativa eficaz para o controle vetorial desse mosquito, contribuindo para a redução dos impactos ambientais causados pelos inseticidas convencionais e abrindo novas possibilidades para o manejo sustentável dessa espécie.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade larvicida do óleo essencial *Citrus latifolia* frente ao *A. aegypti*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o rendimento da extração do óleo essencial.
- Avaliar a atividade larvicida do óleo essencial de *Citrus latifolia* em *A. aegypti*.
- Avaliar o mecanismo de ação larvicida do óleo essencial através de análises morfológica das larvas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 TAXONOMIA VEGETAL

##### 3.1.1. Família

Borges (2012) aborda que a família *Rutaceae* é formada por 160 gêneros e mais de 2000 espécies espalhadas por todo mundo. No Brasil, a família é representada por aproximadamente 29 gêneros e 182 espécies e cerca de 50 espécies são encontradas na Amazônia. Possuem uma característica importante no desenvolvimento de glândulas produtoras de óleo fortemente aromático, cujo papel ecológico, segundo Haberlandt (1928), é provavelmente de protegê-las contra a ação de predadores. O gênero *Citrus*, entretanto, se destaca dentro da família pois são cultivados por causa dos seus frutos e do seu valor nutricional (CARVALHO, 2010).

Calixto (2000) diz que o *Citrus limon* é utilizado como anti-inflamatório, bactericida, antidepressivo, no tratamento de febre e tosse. Já Esperandim (2013), comprovou em seu estudo *in vitro* que o *Citrus medica* possui ação antialérgica em rinite alérgica sazonal. A partir dos os óleos essenciais da casca de seus frutos, Esperandim (2013) observou que possuíam propriedades biológicas sedativa, atividade antibacteriana, se deve ao fato das atribuições a  $\beta$ -adrenérgica da *p*-sinefrina, um glicosídeo encontrado em espécies de *Citrus*.

##### 3.1.2. Gênero Citrus

O gênero *Citrus* apresenta um conjunto de espécies em que sua taxonomia se torna bem complexa. Por conta dessa complexidade, existem vários estudos para determinar a quantidade de espécies que estariam relacionadas ao gênero. Dentre esses estudos, estaria a visão de Swingle e Reece (1967) em que classificou o gênero *Citrus* em apenas quatro espécies, enquanto que Engler 1931, propôs 11 espécies para o gênero. Swingle que não considerava espécie os híbridos. Tanaka, por sua vez, acreditava que esses híbridos eram espécies do gênero *Citrus*, por conta disso, ele propôs 159 espécies.

O gênero *Citrus* originou-se na região sudeste do continente Asiático, sendo um grupo de plantas referente à família *Rutaceace*, representado por laranjas (*Citrus senensis*), tangerinas (*Citrus reticulata*), limões (*Citrus limon* e *Citrus limonia*), limas ácidas, como tahiti (*Citrus aurantifolia*), pomela (*Citrus paradise*).

Frost e Scoost (1968) destaca que maioria das cultivares de *Citrus* e dos gêneros afins, tais como *Poncirus*, *Fortunella*, *Severinia*, *Microcitrus* e *Eremocitrus*, são diploides, com nove pares de cromossomos ( $2n = 18$ ). Em *Citrus*, também existem materiais triploides e tetraploides,

os quais, geralmente, apresentam meiose irregular com conseqüente comprometimento da fertilidade dos óvulos e/ou dos grãos de pólen.

### 3.1.3. Espécie

A espécie *Citrus latifolia* Tanaka (limão tahiti) é um fruto de origem tropical e seus frutos são considerados precoces (IZUMI, 2012). De acordo com Leite (2010), a espécie é cultivada tanto em argila como em terras de areia, não possuem sementes e sua produção concentrada é entre janeiro e julho. Este trabalho abordara estudos envolvendo a espécie *Citrus latifolia*.

A lima ácida Tahiti está relacionada com a família *Rutaceae*, subfamília *Aurantioideae*, tribo *Citreae*, subtribo *Citrineae*, gênero *Citrus* e espécie *C. latifolia* (LUCHETTI *et al.*, 2003), tendo possivelmente originado Califórnia, Estados Unidos, onde surgiram, a partir de sementes de limão introduzidas do Tahiti, por volta de 1870. De acordo Machado (2004), a limeira Tahiti é desenvolvida por meio de enxertia, pois apresenta vantagens na produção, na qualidade dos seus frutos e, principalmente, na tolerância das condições adversas.

De acordo com Machado (2004), o sistema radicular do porta-enxerto é formado por uma ou duas raízes pivotantes, de onde saem as raízes pioneiras. Das pioneiras, iniciam-se as raízes fibrosas e destas, as raízes secundárias, que são flexíveis, maleáveis, como as fibrosas. As raízes fibrosas e raízes secundárias são as responsáveis pelo processo de absorção de solução do solo. Junqueira (2009) relata que, a limeira Tahiti (Figura 1) pode chegar a quatro metros de altura, essa espécie apresenta uma forma densa e robusta, suas folhas estão sendo sempre redistribuída, fazendo com que permaneçam nas plantas por até 3 anos.

**Figura 1-** limeira Thaiti.



Fonte: Viana (2009).

Além disso, são consideradas mesofíticas, produzidas no campo cerrado, contudo possuem características xeromórficas por viverem em regiões com pouca água, sem atividade

estomática na parte adaxial das folhas, com uma camada de cera e em muita água ocorre o murchamento de suas folhas maduras (GUARDIOLA, 1992).

Os frutos da lima Tahiti são grandes, ovais, alongados ou levemente elípticos e, praticamente com ausência de semente (FIGURA 02). Essa ausência de sementes ocorre porque a lima Tahiti se tratar de um híbrido triploide ( $3n = 27$ ), do qual o pólen e o óvulo não são viáveis, formando, assim, frutos partenocárpicos (MATTOS JUNIOR et al, 2005).

**Figura 2** - Fruto de *Citrus latifolia* (TANAKA).



Fonte: Lorenzi *et al.* (2006).

Segundo Coelho (1993), os frutos pesam, em média, 70 a 100 g. De acordo com Barboza (2007), a lima Tahiti é a de maior precocidade, apresentando uma produção significativa, já a partir do terceiro ano, todavia, é a partir do quinto em diante é que começa a expressar rendimentos econômicos.

A lima Tahiti gosta de solos mais arraigados e bem drenados, por não suportarem excesso de umidade, porém adapta-se bem às diversas formas de solo (MATOS JÚNIOR et al, 2005). A lima ácida é rica em vitamina C, ácido fólico, niacina e piridoxina, além de possuir, em sua constituição, compostos fenólicos, entre outros compostos bioativos, o que caracteriza o grande interesse de diferentes grupos de pesquisa (CARVALHO, 2008).

### 3.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA DO GÊNERO *CITRUS LATIFÓLIA* (TANAKA)

Alguns estudos destacam o gênero *Citrus latifolia* (tanaka) possui diversas propriedades biológicas como, por exemplo, ação inseticida, antimicrobiana, antioxidante e na redução do fluxo menstrual.

Canzi (2018) em seu estudo, avaliou os perfis de diferentes flavonoides presente no suco de limão Tahiti (*Citrus latifolia*) e seus os efeitos durante o período menstrual, além da atividade

de inibição enzimática de ciclo-oxigenases 1 e 2. Ainda segundo o autor, os frutos de citros apresentam diferentes perfis de flavonoides em diferente concentração, sendo as flavanonas, flavonas e flavonóis as principais classes

Os flavonoides glicosilados são responsáveis pelo sabor típico de citros. Os compostos de rutinoses, como hesperidina, narirutina e didimina, em limão e também na lima ácida, são majoritárias e consideradas sem gosto. Enquanto que na toranja os neohesperidoses, como naringina, neohesperidina e neoeriocitrina, são atribuídos o gosto amargo (KHAN et al., 2014).

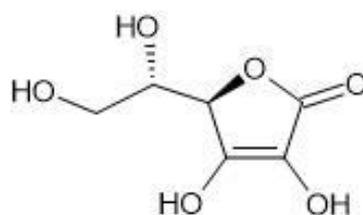
Viana (2010) analisou na sua dissertação a ação antioxidante de sucos de lima ácida (*Citrus latifolia*), na qual foram obtidos por cultivo convencional e orgânico biodinâmico, integrais e após sua clarificação por processos com membrana de microfiltração. Para isso, a autora utilizou a membrana tubular de polietersulfona (0,3 µg.m), a pressões de 0,5; 1,0 e 2,0 Bar, para estabelecer a melhor na clarificação dos sucos, na qual foram realizados análises físicas, químicas, instrumentais, microbiológicas, atividade antioxidante e polifenóis totais.

### 3.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Alguns frutos cítricos como acerola, laranja e limão apresentam concentrações elevadas de ácido ascórbico, enquanto em morango, amora e açaí predominam determinados grupos de flavonóides como as antocianinas, flavonóis e flavonas (CORDENUNSI *et al.*, entretanto, os compostos fenólicos são potentes antioxidantes, podendo agir como redutores de oxigênio singleto, atuando nas reações de oxidação lipídica (ALMEIDA *et al.*, 2006). Por outro lado, são essenciais na fisiologia e metabolismo celular, estando envolvidos em várias funções nas plantas, tais como propriedades sensoriais (cor, aroma, sabor e adstringência), estrutura, polinização e resistência às pragas, processos germinativos da semente pós-colheita, bem como crescimento, desenvolvimento e reprodução (BARBERÁN e ESPÍN, 2001).

No suco do limão tahiti apresenta um alto teor de ácido ascórbico (Figura 3) e flavonoides totais e um baixo teor de fenólicos totais.

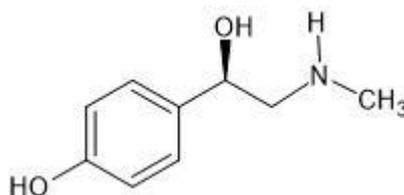
**Figura 3** - Ácido Ascórbico.



Fonte: Ciência Central (2004).

De acordo com Estevam (2016), o suco dos frutos de *C. aurantium* exibiu também atividade antimicrobiana *in vitro* e, pela presença da *p*-sinefrina (Figura 5), produziu redução do consumo de alimento e do ganho de massa corporal e reduziu a pressão portal em ratos.

**Figura 4** - Estrutura da *p*-sinefrina.



Fonte: Estevam (2007).

Além do suco da lima Tahiti, estudos indicam que estrutura química dos óleos essenciais é composta por elementos principais como o carbono, oxigênio e hidrogênio, em que torna difícil a classificação química, são formados por uma mistura de diferentes moléculas orgânicas, como: hidrocarbonetos, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis e outras. A grande maioria é constituído de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides. Os terpenóides constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo esse termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem Biosintética deriva de unidades do isopreno. Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos voláteis são os monoterpenos (90 % dos óleos) e os sesquiterpenos (KNAAK, 2010).

Pesquisas relatam que existem mais de 150 compostos encontrados em óleos essenciais de cítricos (GOMES, 2011). No limão tahiti, por sua vez, são encontradas no óleo 40 compostos tendo como principal componente aromático o limoneno, representando até 50% da sua composição (FONSECA, 2007). O limoneno é um monoterpeno que ocorre em duas formas opticamente ativas, L- e D. No óleo essencial de *citrus*, o D-limoneno está presente em maior proporção. Esse monoterpeno é classificado como um metabólito secundário, cuja função pode ser ecológica, promovendo defesas contra herbívoros e patógenos e possui atividade antibacteriana (KUMMER *et al.*, 2013).

### 3.4 LARVICIDA

Os extratos de plantas aromáticas são usados pelos homens desde a antiguidade, uma prática que existe até hoje, com mais de 2000 espécies de plantas conhecidas por suas propriedades inseticidas (VIEGAS, 2003). Pesquisas apontam que compostos com alta

bioatividade contra insetos podem ser encontrados em óleos essenciais, flavonas e compostos fenólicos.

Arruda e outros autores (2003), analisaram a toxicidade do extrato bruto etanólico da casca de *Magonia pubescens* em larvas de *Aedes aegypti* e concluíram que esse extrato apresentou alterações, principalmente, no intestino médio do inseto. E nessas alterações, incluíram que a destruição total ou parcial das células, alta vacuolização citoplasmática, aumento do espaço subperitrófico e hipertrofia das células.

### 3.5 MORFOLOGIA DO *Aedes aegypti*

Pertence ao gênero *Aedes* (*Diptera: Culicidae*), o mosquito *Aedes aegypti* (Figura 5) é natural da África, viviam em maior abundância nas florestas se alimentando de roedores e animais selvagens. Entretanto, com o crescimento populacional, seguido de migrações, a espécie tornou-se doméstica. Por conta disso, o mosquito é considerado como doméstico, antropofílico e com atividade hematofágica diurna (BRAGA *et al*, 2007).

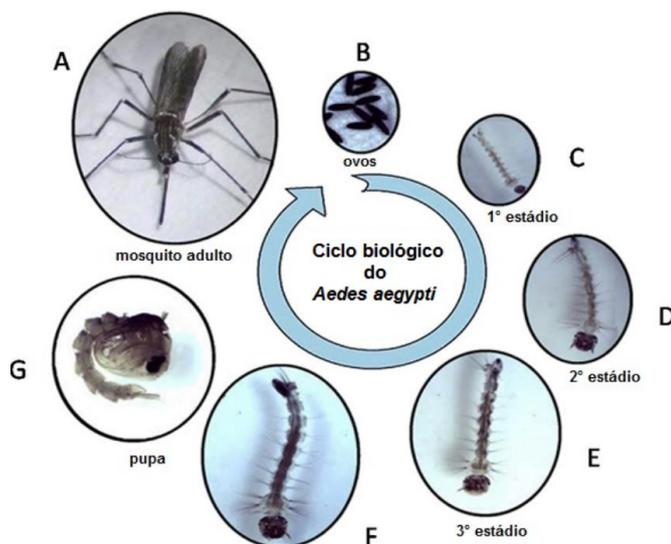
**Figura 5 - *Aedes aegypti***



Fonte: CPT (2012).

O mosquito *A. aegypti* é desenvolvido através de metamorfose completa e seu ciclo de vida possui quatro fases: ovo, larva (quatro estágios larvais), pupa e adultos (Figura 6). Os ovos são postos nas paredes de depósitos artificiais de água limpa (criadouros) e possuem alta resistência (FUNASA, 2002). É nesta fase que o mosquito é mais resistente.

**Figura 6** - Ciclo do *Aedes aegypti*



Fonte: Santos *et al.* (2015).

Na fase larval corresponde ao estágio da alimentação e do crescimento. Durante a fase das larvas compreende quatro estágios evolutivos de seu desenvolvimento, na qual vai aumentando de tamanho, até a formação da pupa. Sob condições ótimas, o período entre a eclosão do ovo e a pupação não excede cinco dias (FUNASA, 2001). Nessa fase, as larvas emergem após a embriogênese dos ovos e passam por quatro estádios larvais denominados L1, L2, L3 e L4 caracterizados pelo desprendimento do exoesqueleto, fenômeno conhecido como ecdise (BECKER *et al.*, 2010).

A fase da larval em transformação do adulto corresponde à fase de pupa. As pupas não se alimentam, e possui duração de dois a três dias. O estágio adulto do vetor representa a fase reprodutiva do inseto. O mosquito, apresenta coloração escura com faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais. As fêmeas se alimentam de sangue com maior regularidade, pois há repasto essencial para fornecer proteínas ao desenvolvimento dos ovos (FUNASA, 2002). Na natureza o *A. aegypti* dura de 30 a 35 dias (FUNASA, 2002).

O *A. aegypti* é o principal vetor da Dengue, além de transmitir o vírus da Chikungunya e da Zika. A dengue é a arbovirose de maior ocorrência no mundo, sendo endêmica em todos os continentes, exceto a Europa. Estudos apontam que cerca de dois terços da população mundial vivem em áreas infestadas com mosquito *Aedes aegypti*, onde circulam algum dos quatro sorotipos do vírus, em alguns casos, simultaneamente. A forma hemorrágica da doença surgiu nas Américas em 1981, trinta anos depois de seu aparecimento na Ásia, e tem mostrado

uma crescente ocorrência (TAUIL, 2002). O *A. aegypti* tem sofrido uma adaptação a diferentes situações ambientais desfavoráveis (TAUIL, 2002).

### 3.4.1 Larvas

O *A. aegypti* possui larvas exclusivamente aquáticas e, geralmente, são localizadas em ambientes com volume de água rasa e ambientes com pouca ou nenhuma movimentação de água como piscinas rasa, margens de riachos protegidos, pântanos ou recipiente criados pelos homens (LAIRD, 1998). As larvas aquáticas possuem mecanismos de adaptação com a finalidade de atingir equilíbrio iônico em relação com seu ecótopo natural. (SOUZA *et al.*, 2019). Além dos órgãos de regulação de íons, as larvas, possuem quatro papilas anais (FIGURA 7), localizadas na extremidade inferior do corpo, são responsáveis pelo equilíbrio osmótico (CONSOLI *et al.*, 1994). Essas estruturas absorvem íons a partir de uma solução bastante diluída para que no momento da eclosão, a larva jovem fique completamente adaptada ao ambiente aquático e apta para respirar o oxigênio atmosférico e usar as partículas em suspensão aquosa para ingestão de alimentos (CHRISTOPHERS, 1960, pág. 739).

**Figura 7-** a) Papilas anais e b) Sifão respiratório



Fonte: autora.

O sifão respiratório (Figura 7) é o último segmento abdominal localizado no lobo anal, é um órgão com formato cilíndrico tendo como principal função regulamentar as trocas gasosas entre o ambiente aquático e a superfície (CONSOLI *et al.*, 1994).

As larvas de *A. aegypti* apresentam um aspecto vermiforme e com a coloração esbranquiçada possuindo um corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen (FIGURA 8). Sendo o tórax e a cabeça mais esféricos, enquanto o abdômen apresenta um formato alongado dividindo-se em nove tagmas semicilíndricos (SOUZA *et al.*, 2019).

**Figura 8 -** Larvas de *A. aegypti* nos estádios L3 e L4.

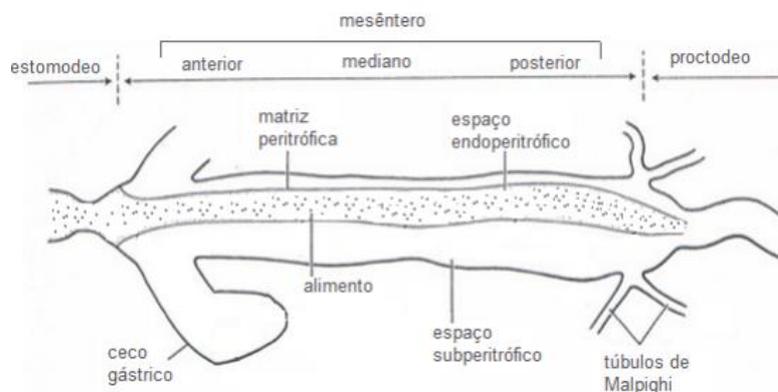


Fonte: Max Mallman (2014)

As larvas apresentam cerca de 222 pares de cerdas, alocadas de maneira simétrica que estão distribuídas ao longo do corpo (CONSOLI *et al.*, 1994).

O tubo digestório (Figura 9) é dividido em estomodeu (intestino anterior), mesêntero (intestino médio) e proctodeu (intestino posterior). Sendo revestido por uma única camada de células epiteliais apoiadas em uma membrana basal e circundado por fibras musculares estriadas, longitudinais e circulares com a função de realizar e controlar os movimentos peristálticos (CHAPMAN 1985, pág. 180).

**Figura 9** - Tubo digestório.



Fonte: Santos *et al* (2015).

O estomodeu, possui embrionária ectodérmica é constituído por células achatadas, revestido internamente por uma bainha cuticular, e não participa dos processos de secreção e absorção (BARRETO *et al.*, 2006). O proctodeu, também de origem embrionária ectodérmica, é revestido internamente por uma bainha cuticular fina e permeável, e é subdividido piloro, íleo, colón e reto (CHAPMAN, 1985).

O mesêntero tem como principal função a pelo produzir e secretar as enzimas e também absorção de nutrientes. Além disso, apresenta uma matriz peritrófica acelular, fina, transparente e semipermeável (VALOTTO *et al.*, 2014).

### 3.6 EDUCAÇÃO EM QUÍMICA PARA A SAÚDE E MEIO AMBIENTE

O mosquito da dengue, conhecido cientificamente com *Aedes Aegypti*, é um vetor que se reproduz nos recipientes acumuladores de água, encontrados facilmente nas ruas e nos lixos das cidades (MALICK *et al.*, 2017) e é o vetor de doenças com dengue, Zika vírus e Chikungunyo.

É preciso ter um olhar orgânico a respeito da educação ambiental em saúde. Carvalho (2004) identifica que a educação ambiental e em saúde contribui para a formação de um indivíduo ecológico, capaz de promover valores e atitudes na vida individual e coletiva, repensando o seu modo de vida e ressignificando a relação homem e sociedade. Desta forma, as ações de prevenção mais eficientes são fundamentais para que as pessoas tenham conhecimento sobre como combater o *Aedes aegypti*. Portanto, são necessárias ações educativas nas escolas públicas para ajudar na conscientização de adolescentes e jovens, potenciais multiplicadores nas suas comunidades (IRIGOYEN *et al.*, 2019).

Outra forma de aplicabilidade é abordar o óleo essencial no ensino de função orgânica para os alunos do terceiro ano do ensino médio. Ou abordar conteúdos sobre forças intermoleculares e a solubilidade a respeito dos óleos essenciais. Nesse aspecto, a fração coletada é uma mistura na qual a baixa polaridade, solubilidade e densidade dos constituintes dos óleos essenciais, atestam as características hidrofóbicas, o sistema heterogêneo e a fase sobrenadante ao destilado, respectivamente.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal (folhas) foi coletado da espécie *Citrus latifolia* para a obtenção do extrato. A coleta do material vegetal (folhas) ocorreu na Av. Henrique Galucio, Bairro Santa Rita, no de Macapá -AP, no mês de outubro de 2022.

A coleta do material vegetal (folhas) foi realizada nas primeiras horas da manhã e posteriormente o material vegetal será encaminhado ao Laboratório de Química Analítica da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) para secagem por 7 dias e extrato das folhas.

### 4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CITRUS LATIFÓLIA*

Os óleos essenciais presente nas folhas dos *Citrus latifolia* forão extraídos por hidrodestilação em aparelho Clevenger a 100 °C durante duas horas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010), armazenados em frascos âmbar e refrigerados a -4 °C ao abrigo da luz.

### 4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOCIDA EM *A. AEGYPTI*

#### 4.4.1 Avaliação da atividade larvicida

As larvas de *A. aegypti* utilizadas nos bioensaios foram provenientes da colônia mantida no insetário do Laboratório de Entomologia Médica do Instituto de Pesquisa Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá. Os ensaios biológicos foram conduzidos em sala (3m x 4m) com condições climáticas controladas: temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa do ar de  $75 \pm 5\%$ , fotoperíodo de 12 horas. A metodologia seguiu o protocolo padrão da World Health Organizations (2005) com modificação no recipiente teste.

Um teste foi conduzido nas concentrações de 500, 250, 125, 62.5, 31.25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em 100 mL solução aquosa de óleo essencial a 5% de DMSO com 25 larvas de *A. aegypti* para avaliara susceptibilidade das larvas ao óleo essencial. O controle positivo foi uma solução aquosa a 5% de surfactante e como controle negativo foi utilizado BTI comercial em solução aquosa na concentração de 0,37  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Os testes foram realizados em triplicatas e durante o experimento a temperatura média da água foi de 25 °C. Após 24 e 48 horas de exposição, foram contabilizadas as larvas mortas, sendo consideradas como tais todas aquelas incapazes de alcançar a superfície. Para os controles positivos em que a mortalidade ultrapassava 20%, o bioensaio foi repetido, o que apresentavam mortalidade entre 5 e 20% foram corrigidos através da fórmula de Abbot (Equação 1) (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

$$\%Mortalidade = \frac{((\%M_T - \%M_C) \times 100)}{(100 - \%M_C)} \quad (1)$$

Em que:

%MT = Percentual de Mortalidade no Teste;

%MC = Percentual de Mortalidade no Controle.

#### **7.4.2 Análise Morfológica por Microscopia de Luz**

Larvas tratadas nas maiores concentrações de cada nanoemulsão foram fixadas em formalina a 10%, analisadas através de Microscopia de Luz modelo BX41 (Olympus) e fotografada em câmera modelo MDCE 5C de acordo com Botas *et al.* (2017).

#### **4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

‘Os resultados foram tabelados em média e desvio padrão de mortalidade. Os dados foram tratados no software SPSS (Statistical Package for the Social Science) para determinar a concentração letal que mata 50% e 90% da população amostral de larvas de *A. aegyti*, CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>. A magnitude dos tratamentos foi avaliada através de Análise de Variância One-way. O limite probabilístico de erro empregado foi equivalente a 5%.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CITRUS LATIFÓLIA*

Observou-se que o rendimento do óleo essencial extraído nas condições ambiente por meio de hidrodestilação em aparelho Clevenger a 100 °C foi de  $0,86 \pm 0,07$  % (m/m), obtido com a duração de 2 horas e um volume de óleo essencial igual a 2 mL, atribuindo-se a este valor o teor de máximo de óleo extraído das folhas secas *Citrus latifolia*.

Os autores Santos *et al.* (2005) atingiram rendimentos de extração de 7,93% por meio de hidrodestilação (m/m) na extração supercrítica das amostras de *Citrus latifolia* (tanaka), enquanto Estevam *et al.* (2016), por outro lado, obtiveram rendimentos de extração por hidrodestilação de 0,8% para as folhas frescas de *Citrus latifolia* (Tanaka).

Analisando outra espécie de citrus afim de fazer uma comparação de volume, Gilson *et al.* (2013), que estudou o óleo de do *Citrus sinensis* L.Osbeck, obtiveram um rendimento de volume igual a 3,20 mL. Sousa *et al.* (2019) conseguiram um rendimento de 47 mL para *Citrus × limon* (L.) Osbeck, 2,3 mL para *Citrus sp* (L. tanja) e 1,8 mL para *Citrus × aurantiifolia*, também via hidrodestilação. Esses resultados demonstram que o rendimento encontrado neste estudo está de acordo com o reportado na literatura científica.

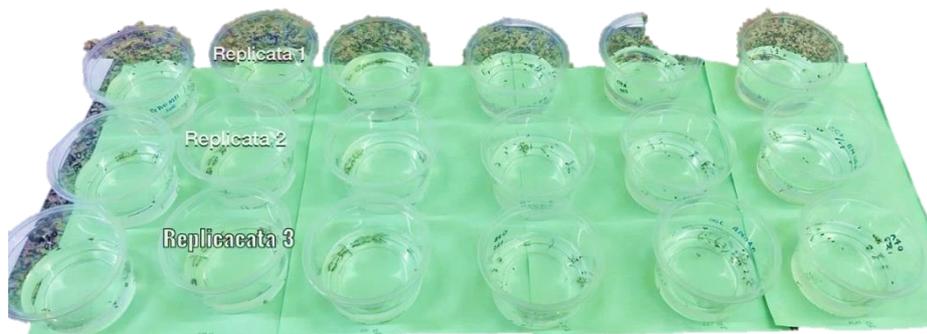
A semelhança química dos óleos essenciais de várias espécies de citrus predomina pelo monoterpeno limoneno (BOZKURT *et al.*, 2017). Cassini (2015), analisou a proporção dos componentes do óleo extraído pela casca de *Citrus latifolia* via hidrodestilação após pré-tratamento enzimático e observou aumento nos percentuais de alguns compostos, de alguns compostos, sendo que a maioria oxigenados, como  $\alpha$ -terpineno,  $\alpha$ -terpinoleno, terpinen-4-ol,  $\alpha$ terpineol, nerol e geraniol. Para a autora, esse aumento está relacionado pela maior ou menor solubilidade destes compostos em líquidos polares. Por não haver interferência direta das enzimas sobre os componentes do óleo, visto que elas agem apenas rompendo a parede celular das glândulas oleíferas durante o pré-tratamento enzimático, o rompimento pode ter permitido maior difusão dos compostos de maior polaridade em relação aos de menor polaridade para a solução, implicando no aumento da percentagem de compostos oxigenados após a hidrodestilação.

## 5.2 ANÁLISE DE ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CITRUS LATIFÓLIA*

A atividade larvicida do óleo essencial extraído das folhas secas da espécie *Citrus latifolia* foi testada em seis concentrações diferentes: 500, 250, 125, 62.5, 31.25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e mais a solução de controle. Sendo que os testes foram realizados em triplicata, como mostra na figura 01.

O número de larvas *Aedes aegypti* utilizadas no bioensaio foram de 25 para cada concentração. Os dados sobre o número de larvas vivas e de larvas mortas foram encontrados através de uma média das três repetições para cada uma das seis concentrações testadas.

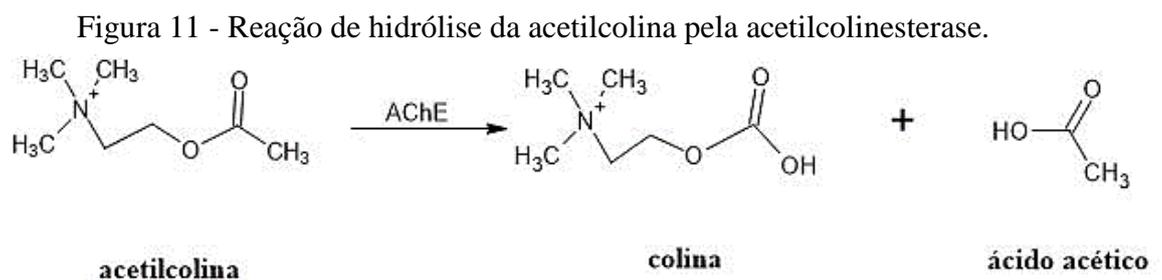
**Figura 10** - Concentrações em Triplicatas.



Fonte: Autora

No primeiro contato com o óleo essencial de *Citrus latifolia*, as larvas do *Aedes aegypti* que estavam em concentração de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentaram movimentos acelerados, tremores e movimentos lentos, mesmo quando eram estimulados artificialmente, indicando ação no sistema nervoso central.

Óleos essenciais atuam no mecanismo a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) que está presente no sistema nervoso de vertebrados e invertebrados. De acordo com Charpentier (2001) as essências atuam, principalmente, no sítio esterásico, na qual forma uma espécie de complexo enzima-inibidor (Figura 11) influenciando na estabilidade em relação a estrutura química do inseticida.



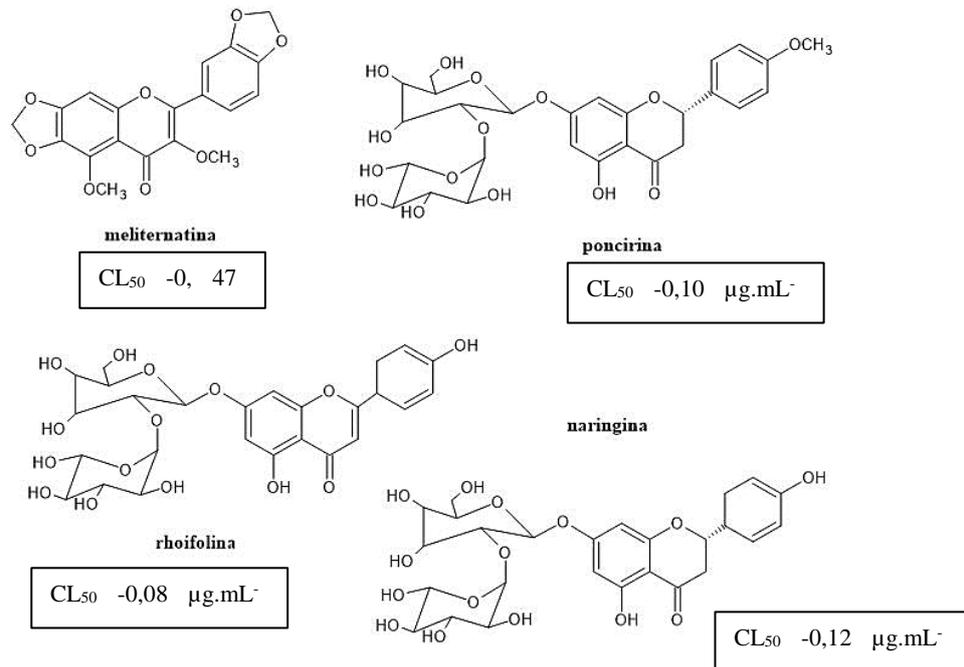
Fonte: Garcez *et al.* (2013)

A acetilcolinesterase (AChE) possui a função de hidrolisar a acetilcolina, ocasionando a formação do ácido acético e colina. A acetilcolina atua como mediador químico e é responsável pela passagem dos impulsos nervosos nas sinapses dos neurônios colinérgicos do sistema nervoso central e periférico. Quando há inibição da acetilcolinesterase, ocorre o aumento do nível de acetilcolina nas sinapses, provocando a paralisia e a morte do inseto (JOKANOVIĆ, 2018).

Borges (2004) ao trabalhar com diflubenzuron, observou que, após 6 horas, ficaram não se moviam mesmo que estimulando. De acordo com Mellon *et al* (1984) os inseticidas que apresentam diflubenzuron funcionam como inibidores da síntese de quitina durante o estágio larval. Por ser a fase mais suscetível por passar pela mudança do exoesqueleto, as larvas são incapazes de descartar a exúvia o que ocasiona a morte por ruptura da nova cutícula.

Garcez *et al* (2013, pág. 372) relatam que há, com base na literatura, quatro flavonoides bioativos (Figura 12) na família *Rutaceae* e possuem grande potencial larvicida com  $CL_{50}$  entre 0,08 e 0,47  $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Figura 12 - Flavonoides com atividade larvicida

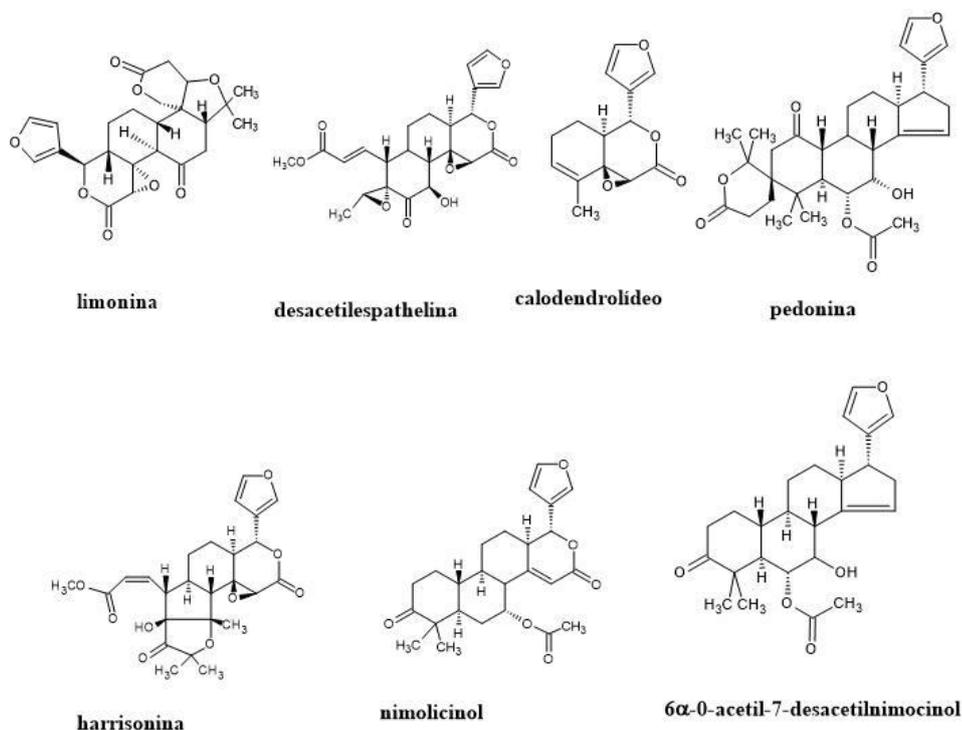


Fonte: Garcez *et al.* (2013)

Além dos flavonoides, Garcez *et al* (2013), analisou que os limonoides (Figura 13) também possuem ação larvicida frente ao mosquito *Aedes aegypti*. Os limonoides formam um anel furano através da oxidação da cadeia (GARCEZ *et al.*, 2013). Além disso, há vários

processos oxidativos que pode ocorrer como epoxidação de ligações duplas e rearranjos moleculares do tipo Baeyer-Villiger.

Figura 13 - Limonoides com atividade larvicida



Fonte: Garcez *et al.* (2013)

De acordo com a tabela 01 é possível observar que a partir da concentração de  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$  o óleo passa a provocar a morte das larvas apresentando a mortalidade de  $21,3 \pm 6,1$  e  $24,0 \pm 4$  e  $24,0 \pm 4$ , matando em média duas larvas. Enquanto que  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  o mesmo se mostrou totalmente letal às larvas, em que a mortalidade foi de 100% das 25 larvas testadas.

Os resultados demonstraram que o óleo essencial das folhas secas de *Citrus latifolia* se mostrou parcialmente ativo, pois apresentou  $CL_{50} \leq 200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em 24 e 48 horas de exposição. *Aedes aegypti*, também foram encontrados OE's com potencial larvicida.

Tabela 1 - Análise da atividade larvicida do óleo essencial de *Citrus latifolia* em 24 e 48 horas de exposição.

Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	24 horas	48 horas
	Mortalidade (%)	Mortalidade (%)
500	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
250	60 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	98,7 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>
125	21,3 $\pm$ 6,1 <sup>b</sup>	24,0 $\pm$ 4 <sup>b</sup>
31,25	0 $\pm$ 0 <sup>c</sup>	0,0 $\pm$ 0 <sup>c</sup>
Controle Negativo	0 $\pm$ 0 <sup>c</sup>	0,0 $\pm$ 0 <sup>c</sup>
Controle Positivo	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0
CL <sub>50</sub> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	197,93 (162,69 – 237,55)	150,88 (130,16 – 176,16)
CL <sub>90</sub> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	370,53 (296,26 – 567,33)	219,60 (185,69 – 315,88)
$\chi^2$	1,826	0,577

Médias aritméticas na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente distintas para Anova Dois Critérios (p-valor = 0,005 e F = 29,76).

Segundo Kiran *et al.* (2006), compostos com  $\text{CL}_{50} < 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  possuem efeito larvicida significativos. Por outro lado, Cheng *et al.* (2003) abordam que a atividade larvicida dos óleos essenciais é ativa quando a  $\text{CL}_{50} < 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , inativa para  $\text{CL}_{50} > 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e altamente ativa quando a  $\text{CL}_{50} < 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Mais detalhadamente, Komalamisra *et al.*, (2005) consideram potencias larvicidas derivadas de produtos naturais com  $\text{CL}_{50} < 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  como ativo,  $50 \mu\text{g.mL}^{-1} < \text{CL}_{50} < 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  moderado,  $100 \mu\text{g.mL}^{-1} < \text{CL}_{50} < 750 \mu\text{g.mL}^{-1}$  como efeito e  $\text{CL}_{50} > 75 \mu\text{g.mL}^{-1}$  como inativo.

Os resultados demonstraram que o óleo essencial das folhas secas de *Citrus latifolia* se mostrou parcialmente ativo, pois apresentou  $\text{CL}_{50} \leq 200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em 24 e 48 horas de exposição. Ao observar os dados na literatura e a comparar com a Tabela 01, o óleo de *Citrus latifolia* extraídos das folhas secas são considerados ativos, biologicamente, frente às larvas do terceiro estágio de *Aedes aegypti*.

Gilson *et al.* (2013), em sua dissertação, analisou o potencial larvicida das espécie *citrus sinensis* L.Osbeck e do padrão de d-Limoneno, também utilizou em seu estudo seis concentrações. Obteve o resulta de 100% na concentração de 150  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , enquanto em que seu padrão testado, foi superior em uma concentração em relação a do óleo.

Oliveira *et al* (2021) observou que o óleo essencial *Citrus reticulata* nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  resultou em 10,2, 25,1, 51,7 e 85,3% de larvas mortas, respectivamente e em 150  $\mu\text{g/mL}$  garantiram 100% de mortalidade. Para fundamentar a pesquisa, os autores utilizaram o estudo de Dias et al (2014, pág. p. 567) na qual aborda que quanto mais elevada for a concentração de limoneno maior será o efeito inseticida e larvicida.

Lahlou (2004) afirma que, a atividade biológica de óleos essenciais está diretamente relacionada com a composição química presente. Analisando a relação entre a composição e a atividade, o autor ressalta que estão diretamente interligadas, pois a atividade biológica pode ser atribuída tanto a seus componentes majoritários, quanto a componentes presentes em menor concentração, contribuindo para a toxicidade total do óleo testado.

Segundo Rattan (2010), os óleos essenciais e seus constituintes perturbam o equilíbrio endócrino afetando, assim, os processos bioquímicos das larvas. Desta forma, podem ser neurotóxicos ou atuando como reguladores de crescimento de inseto, interrompendo o processo de morfogênese. O modo de ação neurotóxica apresenta sintomas, em artrópodes, como hiperatividade seguido por hiperexcitação, levando rapidamente à queda e a imobilização.

Furtado *et al.* (2005), ao realizarem estudos da ação larvicida com óleos envolvendo limoneno, linalol e eugenol frente às larvas do *Aedes aegypti*, comprovaram que esses compostos apresentaram melhores atividade larvicida comparado aos padrões testados isoladamente. Desta forma, estudos com composição química contendo terpênicos, alcoóis e aldeídos nos óleos essenciais são os principais responsáveis pela atividade inseticida ou larvicida frente ao mosquito *Aedes aegypti* (LUCIA *et al.* (2006)).

Estudos contra o *Aedes aegypti* evidenciam que os componentes terpênicos, alcoóis e aldeídos dos óleos essenciais são os principais responsáveis pela atividade inseticida ou larvicida (LUCIA et al., 2007, pág. 295).

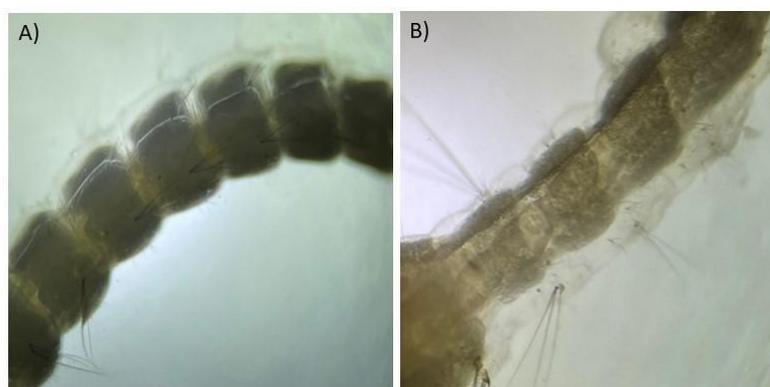
Estevam *et al.*(2016) apresenta, com base na literatura científica, compostos químicos com os seguintes percentuais do óleo essencial das folhas frescas de *C. latifolia*, indicando Limoneno (46,3%) e Nerol (10,0%) como constituintes majoritários. Os autores também citam a presença de cariofileno, carvona, citronelal e terpienol como constituintes minoritários do óleo essencial da espécie. Desse modo pode-se supor que a atividade larvicida do óleo essencial

de *C. latifolia* pode ser resultado da ação do composto majoritário ou ação sinérgica dos constituintes fitoquímicos da planta.

### 5.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE LARVAS DE *Aedes Aegypti*

Na análise morfológica das larvas de *Aedes aegypti* não foi possível encontrar alterações na cabeça, abdômen e sifão de das larvas tratadas com óleo essencial das folhas secas de *Citrus latifolia* em comparação com o controle apresentado na mostra na figura 14.

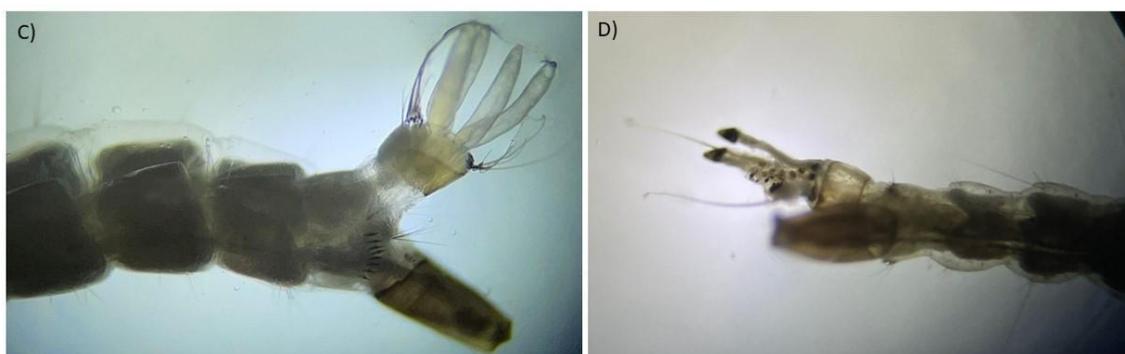
**Figura 14** - Análise de morfológica do abdômen de larvas do 3 estágio de *Aedes aegypti* em contato com óleo essencial de *Citrus latifolia* (B) e com controle positivo (A) 48 horas após ensaio larvicida.



Fonte: autora

Entretanto, na Figura 06 é possível perceber deformação morfológica e acúmulo de hemolinfa na papila anal de larvas tratadas com o óleo essencial de *Citrus latifolia*.

**Figura 15** - Análise de morfológica do sifão de papila anal de larvas do 3 estágio de *Aedes aegypti* em contato com óleo essencial de *Citrus latifolia* (B) e com controle positivo (A) 48 horas após ensaio larvicida.



Fonte: autora

As quatro papilas anais que circundam o ânus têm grande importância na adaptação das larvas às condições de salinidade do ambiente. Essas papilas consistem em expansões da

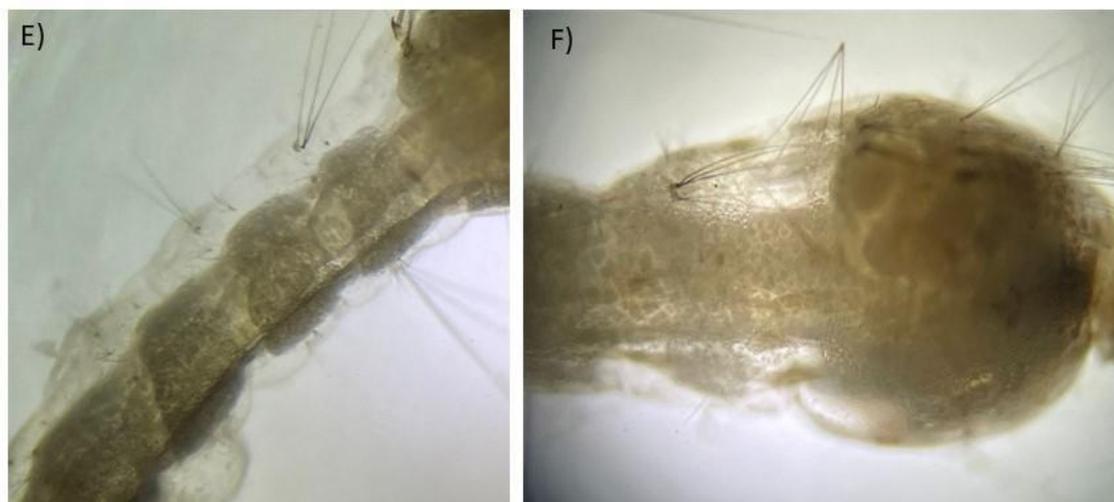
superfície do corpo, possuindo lúmen contínuo com a hemocele e influência no processo de osmorregulação (WIGGLESWORTH, 1933). Mosquitos de água salobra usualmente possuem papilas anais muito reduzidas. As papilas anais (que surgem de uma extensão do segmento terminal) igualmente contribuem tal manutenção osmótica absorvendo íons do meio aquoso externo, como  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (; LEE *et. al.*, 2017). Neste sentido, foi observado que as quatro papilas anais foram deformadas devido as alterações do meio com a presença do óleo essencial em solução.

O estudo de Valotto et al (2010), destacou a extrusão da matriz peritrófica após seis horas de tratamento mostrou o mecanismo de defesa das larvas de *A. aegypti* com a eliminação de todo o alimento para evitar a intoxicação.

Gomes (2020) descreveu que, ao utilizar *piper cubeba* l.(piperaceae) após o tratamento de (-)- hinoquinina, ocorreu alterações em larvas de *A. aegypti* no tórax, abdômen e papila anal. Além disso, autora destaca que essas as alterações afetam toda a integridade dos indivíduos em relação ao controle negativo DMSO.

Na figura 7 ocorre a perda de células ectodérmicas (cutículas), nas regiões como tórax e o abdômen

A Figura 7 Tórax e o abdômen de larvas tratadas com óleo essencial em comparação com o controle.



Fonte: autora

Nos insetos em geral, a digestão e a absorção de alimentos ocorrem no trato digestório. Este órgão, por outro lado, é dividido em três regiões como: intestino anterior (IA), também chamado de estomodeu; o intestino médio (IM), chamado de mesêntero; e intestino posterior

(IP), chamado de proctodeu. Sendo que estes três órgãos são de origem ectodérmica (CHAPMAN, 1985). De origem ectodérmica, as células epiteliais do IA e IP secretam constantemente uma camada cuticular não esclerotizada composta principalmente por quitina, um polissacarídeo que possui uma cadeia de polímeros alongada de N-acetilglicosamina (FERREIRA, 2005).

Borges (2004) observou que o diflubenzuron frente ao *Aedes aegypti*, as larvas apresentavam alterações morfológicas nas 3 regiões do trato digestório. Segundo a autora, o diflubenzuron interfere na síntese de reabsorção da quitina, na fisiologia do processo de muda e no sistema nervoso da larva. Influenciando assim o seu desenvolvimento.

Panbangred *et al.* (1979), que tiveram resultados similares ao estudo de Borges, detectaram que os primeiros sinais de infecção da larva foram a perda da atividade normal e uma letargia. As larvas mortas ficaram pretas e o meio de cultura mais transparentes que as do grupo controle. Os autores analisaram que quando larvas de *A. aegypti* foram expostas a várias dosagens de *B. thuringiensis*, descobriu-se que quanto maior o número de bactérias adicionadas, mais cedo as larvas morram. Os autores notaram o escurecimento das larvas, como foi o caso de Oliveira *et al.* (2021) na qual trabalhou com óleo essencial *Citrus reticulata*.

Nesse sentido, é possível concluir que a mortalidade das larvas em contato com óleo essencial de *C. latifolia* é resultado da ação no sistema de regulação osmótica e no comprometimento da atividade normal de mobilidade e locomoção com a perda de células epiteliais.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o óleo essencial de *C. latifolia* apresentou uma moderada atividade larvicida contra as larvas de *Aedes aegypti*, com uma CL50 de 197,93  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em 24 horas de exposição. A atividade larvicida observada está relacionada ao comprometimento da regulação osmótica das larvas e à perda de mobilidade, sugerindo um mecanismo de ação eficaz.

Apesar da eficácia moderada, esses achados destacam o potencial do uso de produtos naturais no controle da população de *Aedes aegypti* especialmente por sua menor agressividade ao meio ambiente em comparação aos inseticidas sintéticos. O uso de alternativas menos prejudiciais ao ecossistema é crucial, principalmente em áreas equatoriais, onde esse mosquito representa um grande problema de saúde pública.

A pesquisa reforça a necessidade de novos estudos que explorem técnicas nanobiotecnológicas para otimizar a eficácia de substâncias naturais no controle do mosquito, além de abrir caminhos para o desenvolvimento de soluções mais seguras e sustentáveis. Assim, o estudo cumpre seu papel de sugerir novas abordagens para o combate ao *Aedes aegypti*, com menores impactos ambientais e riscos à saúde humana.

## REFERÊNCIAS

- ARRUDA, Walquíria; OLIVEIRA, Gláucia Maria Cavasin; SILVA, Ionizete Garcia da. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 17-25, 2003.
- ASSUNÇÃO, Gilson Vitorino de *et al.* CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA FRENTE AO *Aedes aegypti* DO ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE *Citrus sinensis* L. Osbeck (LARANJA DOCE). 2013.
- ATTI-SANTOS, Ana Cristina *et al.* Extraction of essential oils from lime (*Citrus latifolia* Tanaka) by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 155-160, 2005.
- BARBOZA JÚNIOR, Cícero RA *et al.* Coeficiente de cultura da lima-ácida tahiti no outono-inverno determinado por lisimetria de pesagem em Piracicaba-SP. **Engenharia Agrícola**, v. 28, p. 691-698, 2008.
- BARRETO, Cleyde Ferreira *et al.* ESTUDO das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (DIPTERA, CULICIDAE) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (SAPINDACEAE). **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 35, n. 1, p. 37-58, 2006.
- BORGES, Andrezza Raposo *et al.* Atividade tripanocida e citotóxica de óleos essenciais de plantas medicinais do Nordeste do Brasil. **Parasitologia Experimental**, v. 132, n. 2, pág. 123-128, 2012.
- BORGES, Rosana Alves *et al.* Mortalidade e alterações morfológicas provocadas pela ação inibidora do diflubenzuron na ecdise de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 33, n. 1, p. 91-104, 2004.
- BOZKURT, Taner; GÜLNAZ, Osman; KAÇAR, Yıldız Aka. Chemical composition of the essential oils from some citrus species and evaluation of the antimicrobial activity. **Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, v. 11, n. 10, p. 29-33, 2017.
- BRASIL, Ministério da Saúde; FUNDAÇÃO, N. d S. Dengue. In: **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília: FUNASA, 2002. p. 201-230.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de vigilância em Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de vigilância em saúde**. Volume único, 3ª edição. Brasília. 2019. Disponível em: <[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude\\_3ed.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf)>. Acesso em 28 de novembro de 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico, Brasília, DF, v. 47, n. 2, 2016
- CALIXTO, JB Eficácia, segurança, controle de qualidade, comercialização e diretrizes regulatórias para medicamentos fitoterápicos (fitoterapêuticos). **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CANZI, Edione Fátima. **Avaliação do potencial biológico do suco de limão tahiti (*Citrus latifolia*) no controle do fluxo menstrual**. Orientadora: Profa Dra Beatriz Helena L. N. Sales Maia. 2018. 160 p. Tese (Doutorado no Programa Pós-Graduação em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

CARVALHO, I. C. M. Educação ambiental crítica: nomes e endereçamentos da educação. In: BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Identidades da educação ambiental brasileira**. Brasília, 2004. p.13-24.

CASSINI, Juliana. **Utilização de enzimas para a obtenção de óleos essenciais e cumarinas da casca de *Citrus latifolia* Tanaka**. Orientador: Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon. 2010. 78 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2010.

CHARPENTIER, Alice; FOURNIER, Didier. Níveis de acetilcolinesterase total em *Drosophila melanogaster* em relação à resistência a inseticidas. **Bioquímica e Fisiologia de Pesticidas**, v. 70, n. 2, pág. 100-107, 2001.

CHENG, Sen-Sung *et al.* Bioatividade de óleos essenciais de plantas selecionadas contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti* da febre amarela. **Tecnologia de Biorecursos**, v. 89, n. 1, pág. 99-102, 2003.

CHRISTOPHERS, S. Rickard. Mosquito repellents: being a report of the work of the mosquito repellent inquiry, Cambridge 1943-5. **Epidemiology & Infection**, v. 45, n. 2, p. 176-231, 1947.

COCKE, J. *et al.* Efeitos morfológicos de compostos reguladores do crescimento de insetos sobre larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Ciências da vida**, v. 24, n. 9, pág. 817-831, 1979.

CONSOLI, Rotraut AGB; OLIVEIRA, Ricardo Lourenço de. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. SciELO Books: Editora FioCruz, 1994. 228 p. ISBN 85-85676-03-5

CORDENONSI, L. M. *et al.* Simultaneous separation and sensitive detection of naringin and naringenin in nanoparticles by chromatographic method indicating stability and photodegradation kinetics. **Biomedical Chromatography**.

CORDENONSI, Letícia Malgarim *et al.* Estudo dos flavonóides presentes no Pomelo (*Citrus máxima*) por DSC, UV-VIS, IV, RMN 1H e 13C e MS. **Pesquisa Analítica de Medicamentos. Porto Alegre. Vol. 1, n. 1 (2017), p. 31-37**, 2017.

COSTA, Gabriela da. **Rendimento e composição de óleo essencial de lima ácida Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka) enxertada em 16 variedades de porta-enxertos**. Orientador: Prof.(a.) Dr.(a.) Mariângela Cristofani-Yaly. 2021. 52 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos) - Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2021-08-26.

DIAS, Clarice Noletto; MORAES, Denise Fernandes Coutinho. Óleos essenciais e seus compostos como larvicidas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Pesquisa em parasitologia**, v. 113, n. 2, pág. 565-592, 2014.

DO NASCIMENTO, Éshylla Myllene Santos; DA SILVA, Aldeni Barbosa. Aplicativo para dispositivos móveis para divulgar a biologia e as formas de transmissão do *Aedes Aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Revista Informação em Cultura**, v. 4, n. 1, 2022.

DUARTE-ALMEIDA, Joaquim Maurício et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 446-452, 2006.

ESPERANDIM, Viviane Rodrigues *et al.* Atividade antiparasitária in vitro e composição química do óleo essencial obtido dos frutos de *Piper cubeba*. **Planta Medica**, v. 79, n. 17, pág. 1653-1655, 2013.

ESTEVAM, Elisângela Barbosa Borges *et al.* **Composição química e atividades biológicas do óleo essencial das folhas de *Citrus limonia* e *Citrus latifolia* e dos frutos verdes e folhas de *Protium ovatum***. Orientador: Dra. Cássia Cristina Fernandes Alves. 2017. 91 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – GO, Rio Verde - GO, 21-02-2017.

FONSECA, R. B. F. **Identificação das substâncias voláteis em limão (*Citrus latifolia*, Tanaka), cv. tahiti, obtida por cultivo convencional e cultivo biodinâmico**. 2007. 66 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituição de Nutrição Josué de Castro, Rio de Janeiro, 2007.

FURTADO, Roselayne F. et al. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 843-847, 2005.

GAMBHIR, Shalini; MALIK, Sanjay Kumar; KUMAR, Yugal. Modelo de diagnóstico baseado em PSO-ANN para a detecção precoce da dengue. **Novos Horizontes em Medicina Translacional**, v. 4, n. 1-4, pág. 1-8, 2017.

GARCEZ, Walmir Silva *et al.* Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

GARCEZ, Walmir Silva et al. Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

GOMES, Ana Caroline da Silva. **Estudo sobre a atividade larvicida dos extratos dos frutos da *piper cubeba* l. (piperaceae) e de suas principais lignanas contra *aedes aegypti* l. (díptera: culicidae)**. Orientador: Dra. Rosângela da Silva de Laurentiz. 2020. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Engenharia do Campus de Ilha Solteira – UNESP, Ilha Solteira, 2020-11-27.

GOVINDARAJAN, M. Larvicidal and repellent activities of *Sida acuta* Burm. F. (Family: *Malvaceae*) against three important vector mosquitoes. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.691-695, 2010.

GUARDIOLA, J. L. Frutificação e crescimento. **SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS**, v. 2, p. 1-26, 1992.

IRIGOYEN, Alice Peres et al. *Aedes Adventure*: jogo de realidade aumentada criado por adolescentes para reflexão sobre a importância do combate ao mosquito *Aedes aegypti*. **Anais da 71ª Reunião Anual da SBPC**. 2019, acessado em 21 de Campo Grande,

MS. <[http://reunioessbpc.org.br/campogrande/inscritos/resumos/3765\\_1124989d08bfff84ee8686a59ffab3496](http://reunioessbpc.org.br/campogrande/inscritos/resumos/3765_1124989d08bfff84ee8686a59ffab3496). p df>, novembro de 2022.

IZUMI, Erika *et al.* Terpenos de Copaifera demonstraram atividade antiparasitária e sinérgica in vitro. **Jornal de química medicinal**, v. 55, n. 7, pág. 2994-3001, 2012.

JOKANOVIĆ, Milão; KOSANOVIĆ, Melita. Efeitos neurotóxicos em pacientes intoxicados com pesticidas organofosforados. **Toxicologia e farmacologia ambiental**, v. 29, n. 3, pág. 195-201, 2010.

JUNIOR, Jorgino Pompeu; BLUMER, Silvia. Citrandarins e outros híbridos de trifoliata como porta-enxertos para laranjeira Valência. **Citrus Research & Technology**, v. 32, n. 3, p. 133-138, 2017.

JUNQUEIRA, Livia Pereira. **Fenologia e características físicas da lima ácida 'Tahiti' cultivada sob irrigação no Distrito Federal**. Orientador: José Ricardo Peixoto. 2009. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2009.

KHAN, Sabaz Ali *et al.* Flavonóides cítricos: sua biossíntese, funções e melhoramento genético. **Filogenia molecular, propriedades antioxidantes e usos medicinais**, p. 31 de 2014.

KIRAN, S. Ravi *et al.* Composição e atividade larvicida de óleos essenciais de folhas e caules de *Chloroxylon swietenia* DC contra *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi*. **Tecnologia de biorrecursos**, v. 97, n. 18, pág. 2481-2484, 2006.

KNAAK, Neiva; FIUZA, Lidia Mariana. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology & Conservation**, v. 5, n. 2, 2010.

KOMALAMISRA, Narumon *et al.* Triagem para atividade larvicida em algumas plantas tailandesas contra quatro espécies de mosquitos vetores. **Revista do Sudeste Asiático de Medicina Tropical e Saúde Pública**, v. 36, n. 6, pág. 1412, 2005.

LAHLOU, Mouhssen. Métodos de estudo da fitoquímica e bioatividade dos óleos essenciais. **Phytotherapy Research: An International Journal Dedicado à Avaliação Farmacológica e Toxicológica de Derivados de Produtos Naturais**, v. 18, n. 6, pág. 435-448, 2004.

LEITE, Ana C. *et al.* Atividade tripanocida de flavonoides e limonoides isolados de extratos vegetais ativos de *Myrsinaceae* e *Meliaceae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 01-06, 2010.

LUCHETTI, M. A. *et al.* Aspectos gerais e distribuição de cultivo. **Lima ácida Tahiti**, v. 1, p. 1-12, 2003.

LUCIA, Alejandro e cols. Efeito larvicida do óleo essencial de *Eucalyptus grandis* e terebintina e seus principais componentes em larvas de *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, n. 3, pág. 299-303, 2007.

MACHADO, Carmello Crisafulli; NETO, Ithamar Prado; COELHO, Rubens Duarte. Consumo de soluções fertilizantes em plantas adultas de lima ácida ‘tahiti’ sobre limão ‘cravo’ nas condições de irrigação localizada. **Irriga**, v. 9, n. 3, p. 235-247, 2004.

MATTOS JUNIOR, D. de *et al.* Citros: principais informações e recomendações de cultivo. **Boletim técnico**, v. 200, 2005.

MATTOS JÚNIOR, Dirceu *et al.* Disponibilidade de nutrientes no solo e seu impacto na qualidade dos frutos de lima ácida Tahiti. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 335-342, 2010.

MELLON, RB; GEORGHIOU, GP Uso rotativo de inseticidas em programas de controle de mosquitos. In: **Proceedings and papers of the Annual Conference of the California Mosquito and Vector Control Association (USA)**. 1984.

OLIVEIRA, A. C. S. D. et al. Composição química, atividades larvicida e leishmanicida in vitro do óleo essencial da casca do fruto de *Citrus reticulata* Blanco. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 2021.

PANBANGRED, Watanalai; PANTUWATANA, Somsak; BHUMIRATANA, Amaret. Toxicidade de *Bacillus thuringiensis* para larvas de *Aedes aegypti*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 33, n. 3, pág. 340-347, 1979.

RATTAN, Rameshwar Singh. Mecanismo de ação dos metabólitos secundários inseticidas de origem vegetal. **Proteção de cultivos**, v. 29, n. 9, pág. 913-920, 2010.

SAMPAIO, Antonio Hélder Rodrigues *et al.* Déficit hídrico e secamento parcial do sistema radicular em pomar de lima ácida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 1141-1148, 2010.

SAÚDE divulga primeiro balanço com casos de Zika no país. Gov.br, 26 abr. 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2016/abril/saude-divulga-primeiro-balanco-com-casos-de-zika-no-pais>. Acesso em: 3 dez. 2022.

SOUSA, Dionney Andrade de *et al.* **Avaliação da atividade larvicida de óleos essenciais de espécies de citrus frente às larvas de *Aedes aegypti***. Orientador: Dr. Victor Elias Mouchrek Filho. 2019. 60 p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 23-Jul-2019.

SOUZA, Raquel Santos *et al.* Caracterização bioquímica e funcional dos genes glicosídeos hidrolase família 16 em larvas de *Aedes aegypti*: Identificação da principal  $\beta$ -1, 3-glucanase digestiva. **Fronteiras em fisiologia**, v. 10, p. 122, 2019.

STEFANI, Germana Pimentel et al. Repelentes de insetos: recomendações para uso em crianças. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 27, p. 81-89, 2009.

SWINGLE, Walter T. *et al.* botânica dos citros e seus parentes silvestres da subfamília da laranja (família *Rutaceae*, subfamília *Aurantioideae*). 1943.

TANAKA, Tyozaburo; TANAKA, Chōzaburō. **Species problem in citrus: a critical study of wild and cultivated units of *Citrus*, based upon field studies in their native homes**. Japanese Society for the Promotion of Science, 1954.

TAUIL, Pedro Luiz. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, p. 867-871, 2002.

VALOTTO, Cleyde Ferreira Barreto *et al.* Alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pelo tanino catéquico isolado da planta do cerrado *Magonia pubescens* (Sapindaceae). **Repositório da Universidade Federal de Goiás**. Acesso em <<http://repositorio.bc.ufg.br/handle/ri/182>>, v. 39, p. 309-321, 26 nov. 2010.

VIANA, DANIELA SOARES. **Lima ácida (*Citrus latifolia*, Tanaka), cv. Tahiti, de cultivos convencional e orgânico biodinâmico: avaliação da capacidade antioxidante dos sucos in natura e clarificados por membranas de microfiltração**. 2010. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

WIGGLESWORTH, VB et al. A adaptação das larvas do mosquito à água salgada. **Jornal de biologia experimental**, v. 10, n. 1, 1933.