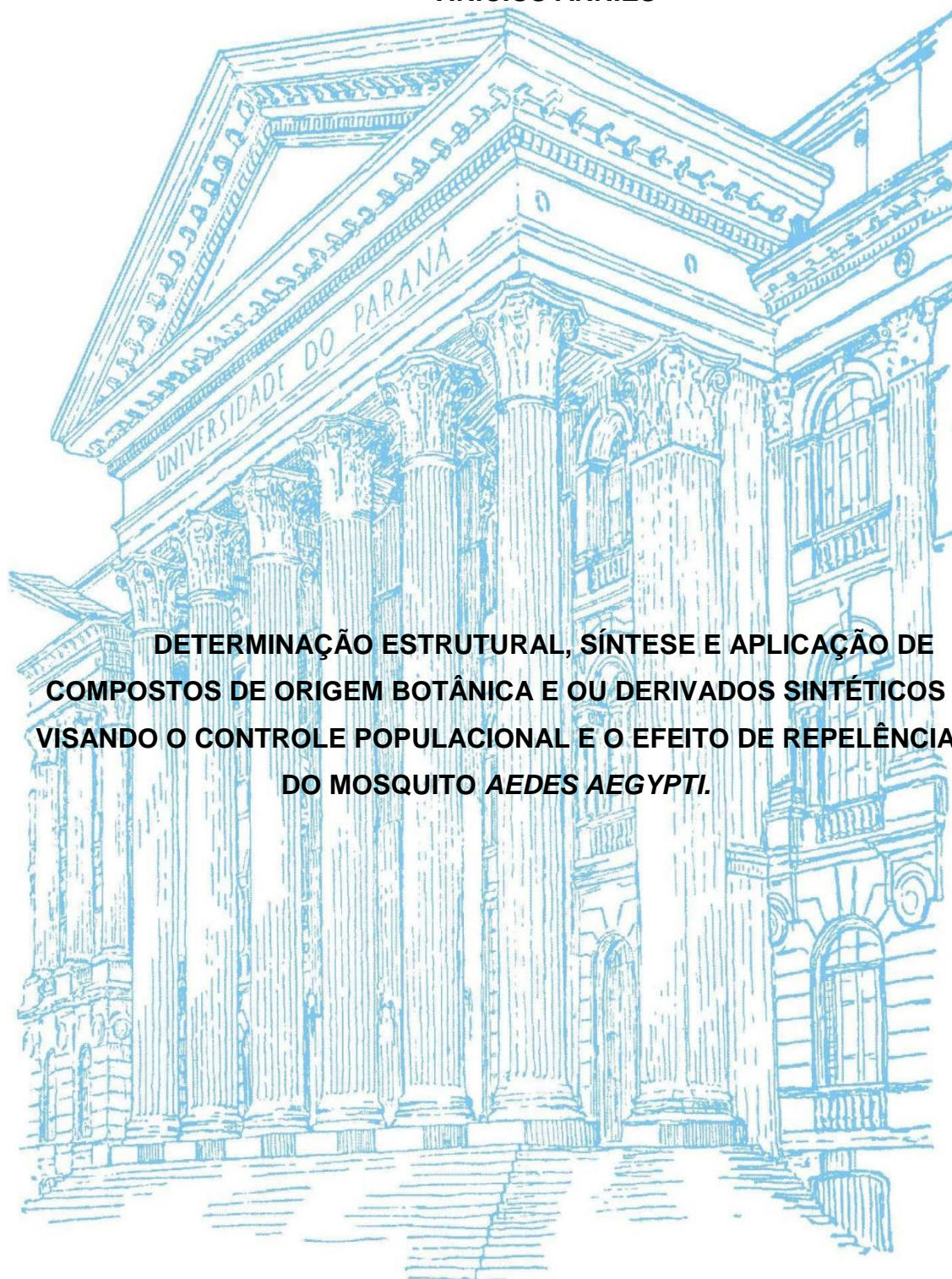


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VINÍCIUS ANNIES



DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL, SÍNTESE E APLICAÇÃO DE COMPOSTOS DE ORIGEM BOTÂNICA E OU DERIVADOS SINTÉTICOS VISANDO O CONTROLE POPULACIONAL E O EFEITO DE REPELÊNCIA DO MOSQUITO *Aedes Aegypti*.

CURITIBA

2012

VINÍCIUS ANNIES

**DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL, SÍNTESE E APLICAÇÃO DE
COMPOSTOS DE ORIGEM BOTÂNICA E OU DERIVADOS SINTÉTICOS
VISANDO O CONTROLE POPULACIONAL E O EFEITO DE REPELÊNCIA
DO MOSQUITO *Aedes aegypti*.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Química do Departamento de
Química, Setor de Exatas da Universidade
Federal do Paraná, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador Prof. Dr. Francisco de Assis Marques

CURITIBA – PR

2012

A615d

Annies, Vinicius

Determinação estrutural, síntese e aplicação de compostos de origem botânica e ou derivados sintéticos visando o controle populacional e o efeito de repelência do mosquito *Aedes aegypti* / Vinicius Annies. – Curitiba, 2012. 88 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química , 2012.

Orientador: Francisco de Assis Marques .
Bibliografia: p. 80-88.

1. *Aedes aegypti*. 2. Dengue. 3. Mosquitos – Controle. 4. Inseticidas vegetais. 5. Manjerição. 6. Testes de Toxicidade. I. Universidade Federal do Paraná. II. Marques, Francisco de Assis. III. Título.

CDD: 614.4323

TERMO DE APROVAÇÃO

**DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL, SÍNTESE E APLICAÇÃO DE COMPOSTOS DE ORIGEM
BOTÂNICA E OU DERIVADOS SINTÉTICOS VISANDO O CONTROLE POPULACIONAL
DO MOSQUITO *Aedes Aegypti***

por

VINÍCIUS ANNIES

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:



Prof. Dr. Francisco de Assis Marques
Dep. de Química – UFPR



Profª Drª Rose Maria Carlos
Dep. de Química – UFSCar



Profª Drª Beatriz Helena L. de Noronha Sales Maia
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 31 de outubro de 2012.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pela educação e oportunidades que me deram.

Ao Professor Dr. Francisco de Assis Marques, pela orientação, motivação, paciência e auxílio.

À Professora Dra. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia, pela ajuda durante o trabalho, na correção dos relatórios, pelas contribuições na qualificação e pelo aceite para participar da banca examinadora.

À Professora Dra. Rose Maria Carlos, pela ajuda durante o trabalho, pelo aceite para participar da banca examinadora e futuras contribuições.

Ao Professor Mário Antônio Navarro da Silva, pela ajuda, orientação e também por ter me recebido em seu laboratório durante todo o trabalho realizado.

Aos amigos de laboratórios Dr. Celso Luiz Wosch, Me. Gustavo Frensch e Me. Ricardo Labes pela amizade e companheirismo no laboratório.

Aos professores Dr. Eduardo N. Ramires, Dr. Wesley M. Souza e Dr. Emmanoel Vilaça Costa pelas contribuições no trabalho.

Ao Professor Ronilson Vasconcelos Barbosa, pelas significativas contribuições na qualificação.

A Lígia Barizon e ao Rodrigo F. Chitolina pela ajuda no laboratório e na criação dos insetos.

Aos demais colegas de LECOSIN e LEMV pela ajuda no laboratório.

Ao ex-colega de laboratório Kahlil Salomé, pelas análises de RMN.

Aos funcionários do PPGQ UFPR pelos serviços prestados.

Ao Departamento de Química da UFPR, bem como aos professores e funcionários.

A todos que, de uma forma ou de outra, me ajudaram a fazer este trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DEET N, N-dietil-3-metilbenzamida

AChE acetilcolinesterase

DDT 1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano

MIP Manejo integrado de pragas

CDC Center of Disease Control

OMS Organização Mundial de Saúde

CG-EM Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

CCD Cromatografia em camada delgada

RMN de ¹H Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênios

RMN de ¹³C Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

J Constante de acoplamento (Hz)

CDCl₃ Clorofórmio deuterado

δ Deslocamento químico (ppm)

TMS Tetrametilsilano

DMSO Sulfóxido de dimetila

RESUMO

A fêmea do mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor responsável pela transmissão do vírus da dengue. Enquanto não existe uma vacina eficaz para controle dessa doença, a única forma de reduzir sua incidência se restringe ao controle do *A. aegypti*.

Tendo em vista à necessidade da busca por novos métodos de controle que reduzam o impacto ambiental e que não permitam o desenvolvimento de resistência por parte do mosquito, a utilização de extratos vegetais como alternativa para se encontrar substâncias com propriedades inseticidas para o controle de mosquitos em geral, podendo atuar como um método alternativo aos inseticidas sintéticos de amplo espectro de ação.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade larvicida de compostos sintéticos, pouco tóxicos ao ser humano e ao meio ambiente, para o controle do *A. aegypti* bem como buscou-se determinar a atividade repelente de compostos de origem vegetal frente a adultos de *A. aegypti*.

Os resultados do estudo nos levaram a descobrir um composto com forte ação larvicida, pertencente a uma classe de compostos ainda não empregada para o controle de pragas a nível mundial. Também foi possível determinar quais os compostos identificados do extrato de *Ocimum basilicum* que são os responsáveis pela ação de repelência já descrita em literatura para o óleo essencial desta planta.

Uma surpreendente ação adulticida de uma mistura de compostos presentes no óleo essencial de *Ocimum basilicum* foi observada durante os testes de repelência. Os estudos nos possibilitaram determinar os compostos responsáveis por essa ação adulticida bem como a relação entre os compostos, necessária para que se observe o efeito adulticida.

Esses resultados abrem perspectivas para que se trabalhe no sentido de desenvolver um novo larvicida para substituir o temefós, pesticida com amplo espectro de atuação e que deverá ser banido do mercado em poucos anos, bem como para o desenvolvimento de um novo adulticida, baseado na presença de compostos naturais, de baixa toxicidade ao ser humano, que poderá ser usado para substitui os piretróides que também deverão ser retirados do mercado mundial em poucos anos.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Larvicida. Repelente. Adulticida.

ABSTRACT

The female mosquito *Aedes aegypti* is the main vector responsible for transmission of dengue virus. While there is no effective vaccine to control the disease, the only way to reduce their incidence is restricted to the control of *A. aegypti*.

Given the need to search for new control methods that reduce environmental impact and not allow the development of resistance in the mosquito, the use of plant extracts are an alternative to find substances with insecticidal properties to control mosquitoes in general, can act as an alternative method to chemical insecticides broad spectrum of action.

This study aimed to evaluate the larvicidal activity of synthetic compounds, some toxic to humans and the environment, for the control of *A. aegypti* and we sought to determine the repellent activity of compounds of plant origin against adults of *A. aegypti*.

The study results led us to discover a compound with strong larvicidal action, belongs to a class of compounds not used to control pests worldwide. It was also possible to determine which of the identified compounds *Ocimum basilicum* extract that are responsible for the repellent action already described in the literature for the essential oil of this plant.

A surprising adulticide action of a mixture of compounds in the essential oil of *Ocimum basilicum* was observed during testing repellency. The studies allowed us to determine the compounds responsible for this action adulticide well as the relationship between the compounds necessary to note that the adulticide effect.

These results open perspectives in order to work towards developing a new larvicide temephos to replace pesticide with broad spectrum of activity and should be banned from the market in a few years, as well as for the development of a new adulticide, based on the presence of natural compounds of low toxicity to humans, which can be used to replace pyrethroids which should also be removed from the world market in a few years.

Key-words: *Aedes aegypti*. Larvicida. Repellent. Adulticide

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 INSETICIDAS E REPELENTES BOTÂNICOS DA FAMÍLIA Lamiaceae....	15
1.1.1 <i>Ocimum spp.</i>	18
1.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS PRINCIPAIS ÓLEOS ESSENCIAIS DA FAMÍLIA <i>Lamiaceae</i> QUE APRESENTARAM ATIVIDADE DE REPELÊNCIA CONTRA O MOSQUITO <i>Aedes Aegypti</i>	19
1.3 INSETICIDAS NATURAIS E SINTÉTICOS.....	22
1.3.1 Piretróides.....	22
1.3.2 Atividade larvicida	23
1.3.3 Atividade repelente.....	24
1.3.4 Atividade adulticida.....	25
1.4 QUIRALIDADE E ATIVIDADE BIOLÓGICA	26
2. OBJETIVOS.....	32
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS NA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCAR)	34
3.1.1 Preparo das soluções dos complexos e ligantes	34
3.2 BIOENSAIOS	34
3.2.1 Criação das Larvas	34
3.2.2 Determinação da Atividade Larvicida.	35
3.3 OBTENÇÃO DO ÓLEO DE MANJERICÃO <i>Ocimum basilicum L. (Lamiaceae)</i>	37
3.3.1 Identificação dos compostos presentes no óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i>	37
3.5 PROCEDIMENTO PARA SÍNTESE DO ESTRAGOL.....	38
3.6 PROCEDIMENTO PARA HIDROGENAÇÃO DO LINALOL.....	38
3.7 TESTE DE REPELÊNCIA.	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS NA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCar)	41
4.1.1. Atividade larvicida do composto C7 frente a população silvestre de <i>Aedes aegypti</i> de procedência de Foz do Iguaçu (F3).	57

4.2 ANÁLISES DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Ocimum basilicum</i>	59
4.3 SÍNTESE DO ESTRAGOL	60
4.4 TESTES DE REPELÊNCIA COM <i>Aedes aegypti</i>	63
4.5 EFEITO DE REPELÊNCIA DO LINALOL	66
4.6 HIDROGENAÇÃO DO (R)-LINALOL	69
4.7 TESTES DE REPELÊNCIA COM A MISTURA RACÊMICA, COM OS ESTEREOISÔMEROS DO LINANOL E COM A MISTURA CONTENDO O LINALOL HIDROGENADO COMO MAJORITÁRIO.....	74
4.8 TESTES INSETICIDAS	75
5. CONCLUSÃO	78
6. PERSPECTIVAS	79
7. REFERÊNCIAS	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas dos ácidos crisantêmico e pirétrico.	22
Figura 2. Estrutura piretrina.	22
Figura 3. O, O, O', O'-tetrametil-O, O'-tiodi-p-fenilenofosforotioato (temefós).....	23
Figura 4. N, N-dietil-3-metilbenzamida (DEET).	24
Figura 5. 1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano (DDT).	25
Figura 6. Estereoisômeros do limoneno.....	26
Figura 7. Talidomida sem estereoquímica definida.	27
Figura 8. (R)-Mecoprope.....	30
Figura 9. (R)-Metalaxil.	30
Figura 10. (S) – Indoxacarbe.	30
Figura 11. Larvas do mosquito <i>A. aegypti</i>	35
Figura 12. Soluções dos complexos C1 a C7 na concentração de 40 µM.....	35
Figura 13. Copos plásticos descartáveis com capacidade para 330 mL.	36
Figura 14. Posicionamento da mão na gaiola durante os testes realizados.	40
Figura 15. Mortalidade larval não acumulada por composto, por réplica e por dia (em horas), referente ao bioensaio preliminar realizado com os compostos C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7. (n) = número total de larvas expostas por produto.....	43
Figura 16. Mortalidade larval não acumulada por composto e subunidades e por réplica em 48 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente ao bioensaio de efetividade realizado com os compostos C1 e C7 e suas subunidades. (n) = número total de larvas expostas por produto.....	45
Figura 17. Porcentagem de mortalidade larval, emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7 sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , nas concentrações de 200 µM, com duração total de 96 horas (quatro dias). (n) = número total de larvas expostas por produto.	47
Figura 18. Porcentagem de mortalidade larval, emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7 sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , nas concentrações de 30 µM, com duração total de 168 horas (sete dias). (n) = número total de larvas expostas por produto.	48
Figura 19. Porcentagem de mortalidade larval, emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade	

realizado para avaliação da atividade larvicida do composto C7 sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , nas concentrações de 20 µM, com duração total de 216 horas (nove dias)...	49
Figura 20. Porcentagem de mortalidade larval, emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7 sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , nas concentrações de 18 µM, com duração total de 240 horas (dez dias). (n) = número total de larvas expostas por produto.	50
Figura 21. Porcentagem de mortalidade larval, emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7 sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , nas concentrações de 15 µM, com duração total de 240 horas (dez dias). (n) = número total de larvas expostas por produto.	51
Figura 22. Porcentagem de mortalidade larval, emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do composto C7 sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , nas concentrações de 13 µM, com duração total de 240 horas (dez dias). (n) = número total de larvas expostas por produto.	53
Figura 23. Porcentagem de mortalidade larval, emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7 sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , nas concentrações de 10 µM, com duração de 288 horas (doze dias). (n) = número total de larvas expostas por produto.	54
Figura 24. Porcentagem de mortalidade larval, emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7 sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , nas concentrações de 5 µM, com duração total de 288 horas (doze dias). (n) = número total de larvas expostas por produto.	56
Figura 25. Porcentagem de mortalidade larval, emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7 sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , nas concentrações de 1 µM, com duração total de 288 horas (doze dias). (n) = número total de larvas expostas por produto.	57
Figura 26. Porcentagem de mortalidade larval, emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7 sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> da população de Foz do Iguaçu, na concentração de 40 µM, com duração total de 192 horas (oito dias). (n) = número total de larvas expostas por produto.	58

Figura 27. Análise cromatográfica do óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i>	59
Figura 28. (a) espectro de fragmentação de massas do produto da reação. (b) espectro de fragmentação de massas do estragol obtido na literatura. ⁸⁷	61
Figura 29. Espectro de RMN de ¹ H do estragol.	62
Figura 30. Regiões expandidas do espectro de RMN de ¹ H do estragol.	62
Figura 31. Espectro RMN de ¹³ C estragol.	63
Figura 32. Estruturas do estereoisômeros linalol.	66
Figura 33. Cromatogramas obtido em cromatógrafo gasoso com coluna quiral CHIRASIL-DEX CB-β-ciclodextrina. (a) linalol quase racêmico; (b) mistura (<i>R</i> + <i>S</i>)-linalol.	68
Figura 34. Cromatogramas obtido em cromatógrafo gasoso com coluna quiral CHIRASIL-DEX CB-β-ciclodextrina. (a) óleo de <i>Ocimum basilicum</i> ; (b); <i>Ocimum basilicum</i> + (<i>R</i>)-linalol; (c); <i>Ocimum basilicum</i> + mistura contendo (<i>S</i>)-linalol como majoritário; (d) <i>Ocimum basilicum</i> + linalol quase racêmico.....	69
Figura 35. Análise cromatográfica da reação de hidrogenação do linalol.....	70
Figura 36. (a) espectro de fragmentação de massas do produto majoritário da reação de hidrogenação do linalol; (b) espectro de fragmentação de massas do 3,7 dimetil-octan-3-ol obtido da literatura. ⁸⁷	71
Figura 37. Espectro de RMN de ¹ H (a) do linalol (b) da mistura obtida da hidrogenação do linalol.	72
Figura 38. Espectro de RMN de ¹³ C (a) do linalol (b) da mistura obtida da hidrogenação do linalol.	73

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Retrosíntese do composto (+)-nootkatona	31
Esquema 2. Síntese do estragol.	60
Esquema 3. Hidrogenação do linalol.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tempo de proteção e percentagem de repelência para cada óleo testado frente ao mosquito <i>A. aegypti</i>	17
Tabela 2. Principais constituintes dos óleos de plantas da família Lamiaceae que apresentam atividade de repelência frente ao <i>A. aegypti</i>	20
Tabela 3. Principais constituintes dos óleos do gênero <i>Ocimum</i> que apresentam atividade de repelência frente ao <i>A. aegypti</i>	21
Tabela 4. Alguns exemplos de atividades biológicas exercidas por formas enantioméricas puras.....	29
Tabela 5. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante o bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida dos compostos C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> da colônia Rockefeller, na concentração de 40 µM, com duração de 96 horas (quatro dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e foto período (12:12) controlados em câmara climatizada.	42
Tabela 6. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios preliminares realizados para avaliação da atividade larvicida dos compostos C1 e C7 e suas subunidades (SB 2, SB 3, SB4, SB 5 e SB6), na concentração de 40 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> da colônia Rockefeller, com duração total de 264 horas (onze dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e foto período (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.	44
Tabela 7. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 200 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , com duração total de 96 horas (quatro dias).	46
Tabela 8. Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 200 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , com duração de 96 horas (quatro dias).	47
Tabela 9. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 30 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , com duração total de 168 horas (sete dias).	48
Tabela 10. Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 30 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , com duração total de 168 horas (sete dias).	48
Tabela 11. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 20 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , com duração total de 216 horas (nove dias).	49
Tabela 12. Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 20 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , com duração total de 216 horas (nove dias).	49

Tabela 13. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 18 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , com duração total de 240 horas (dez dias).	50
Tabela 14. Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 18 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , com duração total de 240 horas (dez dias).	50
Tabela 15. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 15 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , com duração total de 240 horas (dez dias).	51
Tabela 16. Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 15 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , com duração total de 240 horas (dez dias).	51
Tabela 17. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 13 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , com duração total de 240 horas (dez dias).	52
Tabela 18. Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término do bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 13 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , com duração total de 240 horas (dez dias).	52
Tabela 19. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 10 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , com duração total de 288 horas (doze dias).....	53
Tabela 20. Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 10 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , com duração total de 288 horas (doze dias).....	54
Tabela 21. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 5 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , com duração total de 288 horas (doze dias).....	55
Tabela 22. Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 5 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , com duração total de 288 horas (doze dias).....	55
Tabela 23. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 1 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , com duração total de 288 horas (doze dias).....	56
Tabela 24. Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 1 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> , com duração total de 288 horas (doze dias).....	57

Tabela 25. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 40 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> da população de Foz do Iguaçu (F3), com duração total de 192 horas (oito dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada,	58
Tabela 26. Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 40 µM, sobre imaturos de <i>Aedes aegypti</i> da população de Foz do Iguaçu, com duração total de 192 horas (oito dias).	58
Tabela 27. Principais substâncias identificadas do óleo de <i>Ocimum basilicum</i>	60
Tabela 28. Resultados preliminares de repelência com o óleo de <i>Ocimum basilicum</i> e com os componentes majoritários do óleo diluídos em etanol a um volume final de 1,5 mL.	64
Tabela 29. Melhores resultados de repelência para os componentes do óleo em um volume de 100 µL, frente ao mosquito <i>Aedes aegypti</i>	64
Tabela 30. Repelência dos principais componentes do óleo, frente ao mosquito <i>Aedes aegypti</i>	64
Tabela 31. Tempos de repelência das diferentes combinações feitas com os compostos especificados mais o composto 2, frente ao mosquito <i>Aedes aegypti</i>	65
Tabela 32. Tempos de repelência das diferentes combinações dos dois principais constituintes do óleo, frente ao mosquito <i>Aedes aegypti</i>	65
Tabela 33. Valores de rotação específica e de excessos enantioméricos do extrato de <i>Lippia alba</i> , do (<i>R</i>)-linalol comercial e da mistura racêmica do linalol em solução de etanol (10%, v/v).	67
Tabela 34. Resultados dos testes de repelência de soluções etanólicas (1,5 mL volume final) dos estereoisômeros e da mistura racêmica do linalol bem como da mistura reacional obtida na hidrogenação do linalol.	74
Tabela 35. Testes de repelência com combinações dos compostos variando a proporção e/ou a quantidade.	76

1. INTRODUÇÃO

As razões para o ressurgimento global de epidemias de dengue não estão completamente compreendidas, mas estão relacionadas às mudanças demográficas e sociais, incluindo o aumento do fluxo populacional.¹ O crescimento populacional, a migração rural-urbana, infraestrutura urbana básica inadequada e o crescimento exponencial do consumo, são alguns dos fatores responsáveis pelas condições que favorecem a transmissão da dengue.²

Enquanto se aguarda a disponibilidade de uma vacina eficaz ou drogas antivirais, específicas contra os quatro sorotipos da dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3, e DEN-4), a única forma de reduzir a incidência desta doença se restringe ao controle do vetor *Aedes aegypti*,^{3,4} que frequentemente depende de aplicações de inseticidas sintéticos convencionais.⁵

Pesticidas químicos organofosforados e piretróides são uma poderosa ferramenta contra vetores e continuarão desempenhando papel importante no controle integrado. No entanto, eles têm desvantagens, como o custo elevado, riscos à saúde humana e a organismos não alvo, bioacumulação e seleção de organismos resistentes.⁶ Estes problemas têm justificado a necessidade de estratégias alternativas usando produtos de origem natural, especialmente os derivados de plantas, minimizando a dependência aos inseticidas químicos sintéticos como os organofosforados e piretróides.

Produtos de origem botânica são amplamente reconhecidos por sua diversidade química, como por suas consideráveis aplicações na área farmacêutica.⁷ Logo, as plantas oferecem uma fonte alternativa de controle porque contêm uma série de bioativos químicos. Muitas pesquisas têm direcionado esforços para a busca e o desenvolvimento de substâncias derivadas de plantas para o controle de mosquitos.⁸⁻

19

A busca por novos compostos com forte atividade larvicida, reduzindo o impacto ambiental e que não permitam o desenvolvimento de resistência por parte do mosquito vetor da dengue é uma necessidade que pode ser orientada pelas atividades biocidas apresentadas por plantas de algumas famílias.

1.1 INSETICIDAS E REPELENTES BOTÂNICOS DA FAMÍLIA Lamiaceae

Os extratos vegetais são fontes naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas utilizadas em mecanismos de defesas contra uma série de organismos, inclusive insetos e pragas. Entre as classes de compostos utilizadas para tal finalidade destacam-se os alcaloides, terpenóides e derivados de fenilpropanóides os quais resultam do metabolismo secundário das plantas e podem estar envolvidos nas interações planta-inseto.²⁰

Devido a grande diversidade de plantas existentes no Brasil, estudos a partir de extratos vegetais, surgem como alternativa de encontrar substância com propriedades inseticidas sobre *A. aegypti*.²¹

Lamiaceae é uma família botânica relativamente comum, cujos membros são encontrados nas regiões temperadas em todo o mundo.²² Incluem cerca de 220 gêneros e de 3.500 a 4.000 espécies.²³ Inúmeros trabalhos envolvendo a atividade repelente de óleos essenciais da família Lamiaceae são descritos em literatura.^{24,25} Algumas espécies da família, pertencentes aos gêneros *Ocimum*, *Cunila*, *Mentha* e *Glechon* são encontrados no Sul do Brasil. Alguns gêneros da família Lamiaceae que apresentaram atividade de repelência frente a mosquitos em geral foram *Hyptis*, *Hyssopus*, *Lavandula*, *Mentha*, *Nepeta*, *Ocimum*, *Origanum*, *Perilla*, *Pogostemon*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Thymus*.^{24,25}

Entre as plantas da família Lamiaceae, apenas alguns gêneros são citados contendo alguma substância com atividade de repelência contra o mosquito *A. aegypti*. Estudos anteriores mostram que óleos essenciais, bem como componentes isolados, têm sido utilizados em formulações como repelentes naturais.^{24,25}

Em trabalho já descrito na literatura os resultados mostram que o óleo essencial de *Nepeta cataria* foi indicado como um repelente alternativo para proteção contra picada de artrópode,²⁶ sendo menos eficaz do que o DEET para impedir a picada de mosquitos.^{26,27}

Em um estudo com 38 óleos essenciais de plantas em três concentrações diferentes, foi testado a atividade de repelência contra o mosquito *A. aegypti* em laboratório.²⁸ Foi aplicada uma quantidade de 0,1 mL do óleo puro, em 30 cm² na região do antebraço de um voluntário. O braço tratado foi exposto durante 1 min com

250 fêmeas do mosquito, 4-5 dias de idade. A cada 30 min após tratamento, o braço tratado foi exposto novamente, o tempo foi gravado no qual a primeira picada ocorreu. Quando os óleos testados foram aplicados a uma concentração de 10% (m/m) ou 50%(m/m), diluídos em álcool, nenhum deles impediu a picada de mosquito durante o tempo de 2 h. Dentre os óleos estudados seis são pertencentes à família Lamiaceae, *Lavandula angustifolia*, *Mentha arvensis*, *M. piperita*, *M. spicata*, *Ocimum basilicum* e *O. sanctum*. Quando os óleos essenciais dessas seis espécies foram aplicados sem diluição (0,1 mL), apresentaram uma média de proteção de 10, 50, 50, 30, 70 e 60 minutos respectivamente.²⁸

Em outro trabalho os óleos essenciais extraídos de 10 plantas medicinais foram avaliados para estudos visando determinação das atividades larvicida, adulticida, ovicida e de repelência frente a três espécies de mosquitos *Anopheles stephensi*, *A. aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.²⁹ Para os testes de repelência o autor utilizou um aparato específico, onde os mosquitos entravam em contato apenas com o repelente sem um voluntário humano. Os óleos essenciais foram dissolvidos (10, 20, 40, 80, e 160 mg) de cada óleo em aproximadamente 0,50 mL de acetona . Cinquenta fêmeas adultas do mosquito foram introduzidas no sistema. Os resultados dos testes de repelência foram analisados estatisticamente, para a dose repelente (RD₉₅), ou seja, a que repeliu 95% dos adultos em 1 h. Para o mosquito *A. aegypti* determinou-se que o valor de RD₉₅ dos óleos de *O. basilicum* e *Rosmarinus officinalis* foi de 82,4 e 57,9 mg, respectivamente.²⁹

O efeito repelente de óleos essenciais de 18 plantas encontradas na Tailândia contra quatro mosquitos vetores: *A. aegypti*, *Aedes albopictus*, *Anopheles dirus* e *C. quinquefasciatus*, foi avaliado em laboratório, usando voluntários humanos.³⁰ Soluções dos óleos foram preparadas a 10% (m/m) em etanol absoluto juntamente com a presença de aditivos (vanilina, propileno glicol e polietileno glicol) visando prolongar o efeito de repelência. Essas soluções foram aplicadas em um antebraço de cada voluntário. O tempo entre a aplicação da solução repelente e a segunda picada sucessiva foi registado como o tempo de proteção. Para o óleo de *O. sanctum* e para o de *Vitex trifolia*, pertencentes à família Lamiaceae, os tempos de proteção frente ao mosquito *A. aegypti* foram em média de 1,3 e 1,8 horas respectivamente.³⁰

Em outro estudo 41 extratos de plantas e 11 misturas de óleos essenciais, foram testados para se avaliar a atividade de repelência frente aos mosquitos da febre amarela, o *A. aegypti*, o vetor da malária, *Anopheles stephensi* e o vetor da filariose e encefalite, *C. quinquefasciatus*.³¹ Foram usadas soluções a 20% (v/v) de cada óleo e extrato em uma mistura de solventes composta por genapol (20%, v/v), polietileno glicol (10%, v/v), etanol (20%, v/v) e água (50% v/v). Para o ensaio, 0,1 mL da solução repelente foram aplicadas sobre uma área marcada (30 cm²) de um antebraço de um voluntário humano. O voluntário expôs o seu braço por 2 min, a cada intervalo de 30 min, a 250 fêmeas entre 5 e 15 dias de idade, contidas no interior de uma gaiola. O período máximo do teste foi de até 8 h, dependendo da eficácia do produto, ou até a observação de duas picadas foi considerado como tempo de proteção. Dentre os óleos pesquisado 7 pertencem a família Lamiaceae. O período de proteção e percentagem de repelência para cada óleo testado frente ao mosquito *A. aegypti* estão descritos na Tabela 1.³¹

Tabela 1. Tempo de proteção e percentagem de repelência para cada óleo testado frente ao mosquito *A. aegypti*.

Óleo	Tempo	%
<i>Lavandula angustifoli</i>	120 min	24,3 %
<i>Nepeta cataria</i>	480 min	83,8 %
<i>Thymus serpyllum</i>	150 min	56,7 %
<i>Salvia sclarea</i>	120 min	45,9 %
<i>Mentha piperita</i>	120 min	59,4 %
<i>Rosmarinus officinalis</i>	330 min	43,2 %
<i>Ocimum basilicum</i>	120 min	81,1 %

O período de duração entre a aplicação de um repelente e as duas primeiras picadas sucessivas foi registrado como o tempo de proteção. A percentagem de repelência foi calculada no final de cada teste, usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Repelência: } \frac{C - P}{C} \times 100$$

Onde:

- C é o número total de mosquitos que pousaram na mão;
- P é o número de mosquitos que picaram a mão;

1.1.1 *Ocimum spp.*

Dentre todas as espécies da família Lamiaceae o gênero que possuem maior destaque como óleos essenciais com atividade repelente é o gênero *Ocimum* que é composto por aproximadamente 150 espécies de ervas e arbustos distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e América Central e do Sul.

Em trabalho descrito na literatura avaliou-se a capacidade de proteção de óleos essenciais de *O. gratissimum* e *O. basilicum* contra o mosquito *A. aegypti*. Foi utilizada parafina líquida para a diluição, porque de acordo com o resultado de teste preliminar, segundo os autores, esta substância é neutra, não atuando como repelente ou atraente para o *A. aegypti*.³³ Para os ensaios foram utilizadas fêmeas de *A. aegypti* com idade entre 3-5 dias.

O óleo essencial de *O. gratissimum* apresentou melhor proteção do que o de *O. basilicum* contra o *A. aegypti*. A melhor proteção do óleo essencial de *O. gratissimum* atingiu 79,7%, protegendo menos de uma hora após a aplicação de uma solução de concentração de 20% (m/m), enquanto proteção do *O. basilicum* atingiu 22,9% na mesma concentração e no mesmo período de tempo.³³

Em trabalho de Dekker e colaboradores foram identificados, do óleo essencial de *Ocimum forskolei*, através da análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), oito compostos: (S)-linalol, naftaleno, salicilato de metila, (S)-1-octen-3-ol, (R)- α -copaeno, (E)-ocimeno, (E)-cinamato de metila e (E)-cariofileno. Através da técnica de cromatografia gasosa acoplada à de detecção

eletroantegráfica (CG-DEA), identificou-se os possíveis compostos repelentes presentes no óleo essencial.³⁴

O salicilato de metila e (*E*)-cinamato de metila foram, pela primeira vez, relatados como tendo atividades repelentes frente ao *A. aegypti*. Os autores apresentam a possibilidade de se desenvolver repelentes a base de produtos naturais mais eficientes através da combinação de diferentes compostos.³⁴

1.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS PRINCIPAIS ÓLEOS ESSENCIAIS DA FAMÍLIA Lamiaceae QUE APRESENTARAM ATIVIDADE DE REPELÊNCIA CONTRA O MOSQUITO *Aedes Aegypti*.

Líquidos oleosos aromáticos são obtidos de partes das plantas tais como flores, sementes, folhas, galhos, entre outros.³⁵ Compostos orgânicos bioativos produzidos por vegetais incluem repelentes, larvicidas, inibidores de oviposição, inibidores de crescimento, esterilizantes e toxinas, que formam uma vasta defesa química contra insetos e microrganismos invasores.³⁶

Óleos voláteis são definidos como produtos obtidos de partes de plantas através, principalmente, da destilação por arraste a vapor d'água que é o método geralmente para produção industrial de óleos essenciais. Porém a extração por meio de CO₂ supercrítico produz um perfil organoléptico mais natural.³⁷

Na extração por arraste de vapor d'água o óleo volátil é arrastado pela água. Em pequena escala, emprega-se o aparelho Clevenger para a obtenção do óleo. O óleo obtido é facilmente separado da água devido a sua baixa solubilidade neste solvente e, depois, pode ser secado com Na₂SO₄ ou Mg₂SO₄ anidros. O método é comumente usado para extrair óleo de plantas frescas,³⁸ mas também pode ser empregado para a extração usando folhas previamente desidratadas. Os componentes majoritários dos óleos essenciais podem constituir até 85 % do óleo, outros componentes podem estar presentes em pequenas proporções.³⁹

As Tabela 2⁴⁰⁻⁴³ e Tabela 3⁴⁴ apresentam os principais constituintes dos óleos essenciais que possuem efeito de repelência frente ao mosquito *A. aegypti*.

Tabela 2. Principais constituintes dos óleos de plantas da família Lamiaceae que apresentam atividade de repelência frente ao *A. aegypti*.

	Composição (%)						
	<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>Mentha spicata</i>	<i>Mentha piperita</i>	<i>Mentha arvensis</i>	<i>Salvia sclarea</i>	<i>Thymus serpyllum</i>	<i>Nepeta Cataria</i>
limoneno	0,19	5,8	6,9	1,57	0,54		0,3
ocimeno	0,52		0,3			Tr	
linalol	44,54	nd	0,2	tr	30,43	1,80	
canfeno	3,98					1,32	
borneol	2,45				5,08	3,89	
iso-terpineol	6,75						
mircenol	0,87	2,3	0,5	0,4	1,4		0,1
geraniol	11,02				4,21		
acetato de lavandulal	10,78						
3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol	10,35						
carofileno	0,50	0,7	0,3				
cadiol	0,15						0,9
sabineno		0,7	2,5	tr			
1,8-cineole	2,30	3,0	5,6			1,13	0,7
Y-terpineno		1,4	0,3			21,90	
mentona		21,9	12,7	7,46			
mentofurano			6,8				
mentol		0,5	37,4	77,54			
carvona		49,5					
piperitone		0,6	0,8	0,24			
acetato de metila			17,4	1,12			
timol						18,73	2,3
β-bourboneno		1,3	0,4			0,19	
iso-mentona				3,56			
acetato de linalil					19,75		
acetato de neril					7,78		
acetato de geranil					12,1		
sclareol					3,53		
cimeno						21,12	
4α, 7 α, 7β, nepetalactone							70,4
4 α, 7 α, 7 α, nepetalactone							6,0
4 α, 7 β, 7 α, nepetalactone							2,5

Tabela 3. Principais constituintes dos óleos do gênero *Ocimum* que apresentam atividade de repelência frente ao *A. aegypti*.

	Composição (%)			
	<i>O. americanum</i>	<i>O. basilicum</i>	<i>O. gratissimum</i>	<i>O. sanctum</i>
(Z)-3-hexenol	0,08	0,35	0,20	0,54
1-octen-3-ol	0,44	0,52	0,29	0,17
mirreno	0,03	tr	0,17	Nd
(Z)- β -ocimeno	0,03	0,14	9,11	tr
1,8-cineol	0,09	0,47	Tr	0,01
fencona	nd	0,04	0,17	0,19
linalol	0,23	28,44	0,72	0,45
cânfora	5,95	13,08	0,17	0,02
borneol	0,68	0,29	0,03	0,26
4-terpineneol	0,25	1,33	0,04	Tr
mirtenal	0,02	0,16	tr	0,02
α -terpineol	0,07	0,34	0,22	0,11
nerol	0,08	0,21	0,05	tr
geraniol	0,10	3,84	nd	0,13
timol	0,39	0,06	nd	0,38
α -copaeno	0,19	tr	1,39	0,18
β -carofileno	0,94	0,99	3,89	16,60
α -humuleno	tr	0,22	0,47	0,65
<i>allo</i> -aromadendreno	0,02	0,38	0,57	0,14
germacreno D	0,29	0,18	8,84	5,10
β -selineno	3,43	nd	0,21	0,32
(<i>E, E</i>)- α -farneseno	0,08	0,07	2,78	0,09
δ -cadineno	0,23	0,06	1,06	0,21
carofileno epoxido	0,01	0,11	0,14	1,10
α -cadinol	0,19	0,13	0,26	1,02
metil chavicol	tr	0,93	nd	0,18
eugenol	1,12	0,13	63,36	1,66
(Z) cinamato de metila	72,05	34,49	nd	nd
(<i>E</i>) cinamato de metila	9,11	6,90	nd	nd
metil eugenol	0,02	0,29	0,28	56,18

1.3 INSETICIDAS NATURAIS E SINTÉTICOS

1.3.1 Piretróides

Tem sido descrito que compostos com estas características são encontrados em algumas plantas e que são vitais para a sua sobrevivência inibindo o ataque de pragas predadoras. Os esforços para a implementação do uso destes compostos, utilizados com grande sucesso pela natureza, têm se tornado cada vez mais intenso nos últimos anos. Apesar de muitas moléculas derivadas de plantas com estas características terem sido identificadas, apenas as piretrinas que são obtidas a partir dos extratos da planta *Chrysanthemum cinerariaefolium* pertencente à família das Asteraceae, estão disponíveis para uso comercial. As piretrinas são ésteres dos ácidos crisantêmico e pirétrico (Figura 1).⁴⁵

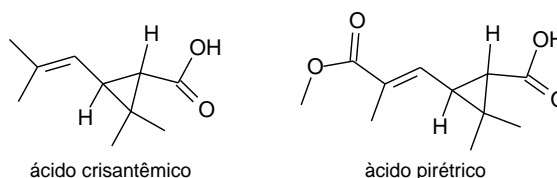


Figura 1. Estruturas dos ácidos crisantêmico e pirétrico.

A descoberta e a evolução da classe de inseticida dos piretróides tem seguido uma sequência clássica que consiste na observação da atividade num extrato natural, isoladamente seguido da identificação dos compostos de análogos mais ativos.^{46, 47}

A atividade inseticida individual dos componentes da mistura pode-se manifestar de maneiras diferentes, como ocorre nas piretrinas, onde a piretrina II (Figura 2) é responsável pelo “knockdown” (queda do inseto sem matá-lo), enquanto a piretrina I (Figura 2) é a que causa a morte do inseto propriamente dita.⁴⁸

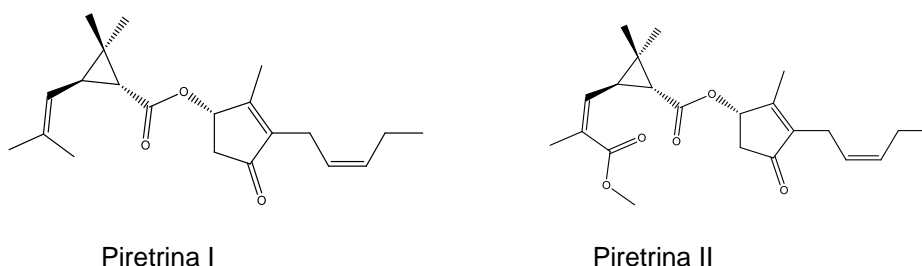


Figura 2. Estrutura piretrina.

Segundo Barlow,⁴⁹ as exigências estruturais para provocar o “knockdown”, diferem daquelas para matar. Variações na rapidez da paralisia temporária apresentadas por vários piretróides foram associadas como diferença nas suas velocidades de penetração e destoxificação. A mudança do grupo metila para metoxicarbonila, da piretrina I para piretrina II, provoca um aumento na polaridade da molécula, o que certamente afetará a velocidade de penetração, isto explica a ação de “knockdown” apresentada pela piretrina II.⁵⁰ Os efeitos mais prolongados, que matam os insetos, estariam relacionados com a maior lipofilia da piretrina I.⁵¹

1.3.2 Atividade larvicida

O temefós (O, O, O', O'-tetrametil-O, O'-tiodi-*p*-fenilenofosforotioato) (Figura 3) é um pesticida organofosforado que foi amplamente utilizado no Brasil de 1967 a 1998, para o controle do *A. aegypti*⁵² que transmite a dengue e a febre amarela, o pesticida é normalmente empregado como um larvicida em água estagnada a uma concentração de 1% (m/v), e em água para uso doméstico, a uma concentração final de 1ppm.⁵³

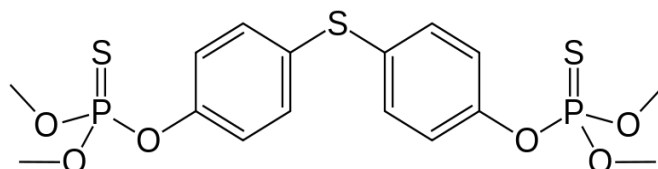


Figura 3. O, O, O', O'-tetrametil-O, O'-tiodi-*p*-fenilenofosforotioato (temefós).

O organofosforado temefós, registrado nos EUA em 1965, para utilização em agricultura e controle de mosquitos, é o único larvicida desse grupo com uso generalizado no controle de larvas de mosquitos, recomendado pela OMS para uso em água potável. Os organofosforados atuam inibindo a acetilcolinesterase (AChE), importante enzima do sistema nervoso central. Essa enzima é fosforilada pelo inseticida, ficando irreversivelmente inativada. A inibição da AChE resulta no acúmulo de acetilcolina impedindo a interrupção da propagação do impulso elétrico. Conseqüentemente, o sistema nervoso central continuará sendo estimulado, desencadeando o processo de paralisia que pode culminar com a morte do inseto.⁵⁴

O uso continuado de inseticidas, tanto na agricultura e pecuária como na área da Saúde Pública, tem provocado o aparecimento de populações resistentes e ocasionado problemas para o controle de vetores.⁵⁴

1.3.3 Atividade repelente

O repelente sintético para mosquitos mais conhecido e utilizado é a N, N-dietil-3-metilbenzamida (DEET) (Figura 4). Esta substância tem eficácia comprovada e é usada em formulações comerciais em concentrações que variam de 30% a 70% do ativo (m/m). Embora esteja presente no mercado há mais de 40 anos, o DEET, pode causar efeitos tóxicos, principalmente em crianças e gestantes.⁵⁵

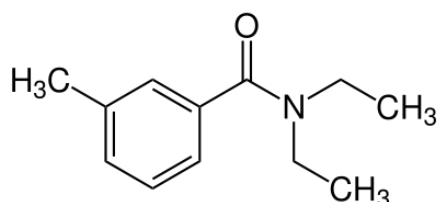


Figura 4. N, N-dietil-3-metilbenzamida (DEET).

Estima-se que cerca de 200 milhões de pessoas utilizem o DEET no mundo^{32, 55} principalmente devido a sua persistência no efeito de repelência, no entanto, ele apresentou alguns efeitos adversos, tais como toxicidade dérmica, convulsões e psicose maníaca aguda.⁵⁶

Muitos estudos têm sido realizados para identificar novas substâncias que possam ser utilizadas como agentes repelentes, já que existem controvérsias no que diz respeito à segurança no uso do DEET. Embora muitos autores defendam sua utilização, outros o consideram alvo de críticas em virtude da ocorrência de casos de encefalite associados ao seu uso.⁵⁷

Os efeitos de repelência de substâncias naturais normalmente não perduram pelo mesmo período de tempo quando comparados com o do DEET. No entanto, os efeitos de proteção prolongada têm sido relatados a partir do uso de 20% (m/m) do óleo de citronela, açafraão, e manjeriço cabeludo, especialmente com a adição de vanilina 5% como fixador, em que cada um pode repelir três espécies de mosquitos durante até 6 h.^{56, 58, 59}

1.3.4 Atividade adulticida

A partir de 1942, com a descoberta das propriedades inseticidas do 1,1,1-tricloro-2,2-bis-(*p*-clorofenil)etano (DDT) (Figura 5), uma quantidade elevada de hidrocarbonetos clorados foram utilizados em inúmeras culturas, almejando o controle de pragas. Inicialmente esta prática teve sucesso, porém, com o passar dos anos, percebeu-se que tais compostos sofriam degradação lenta por processos naturais, além de gradativamente acumular-se nos tecidos adiposos da maioria dos animais. Na década de 70 estes compostos tiveram seu uso proibido por possíveis riscos à vida humana, com suspeita de ação carcinogênica.⁶⁰

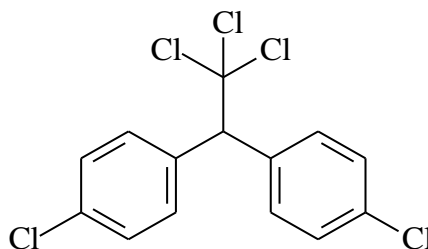


Figura 5. 1,1,1-tricloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etano (DDT).

Devido aos problemas acarretados com o uso dos inseticidas organoclorados, começou-se a vislumbrar a possibilidade de controle de pragas através do manejo integrado de pragas (MIP).

Como parte destas estratégias, pode-se citar o uso de óleos essenciais, que são produtos normalmente pouco tóxicos e que podem atuar somente alterando o comportamento dos organismos alvos.

Poucas pesquisas têm sido desenvolvidas sobre o efeito de fitoquímicos em mosquitos adultos. Os resultados de um estudo com extratos de plantas sugerem que a ação adulticida é um campo de pesquisa com grande potencial e ainda pouco explorado.⁶¹ Bioensaios com extratos de várias partes de *Tagetes minuta* revelou que seus extratos florais apresentaram o maior efeito biocida sobre adultos de *A. aegypti* e *Anopheles stephensi* entre várias plantas estudadas.⁶²

É de importância singular para o Brasil deter tecnologia própria que permita aumentar o arsenal de metodologias alternativas para o controle de pragas segundo as nossas demandas, não ficando dependente de tecnologias desenvolvidas por outros países.^{63, 64}

1.4 QUIRALIDADE E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os seres vivos são formados, em grande parte, por substâncias orgânicas quirais de baixa massa molecular, e por macromoléculas constituídas de monômeros quirais. O reconhecimento da quiralidade dos sistemas biológicos se dá pela presença de unidades opticamente puras que, ao interagirem com um par de enantiômeros, formam dois complexos diastereoisoméricos com diferentes propriedades físico-químicas.^{65, 66}

Por causa da importância das relações espaciais tridimensionais estabelecidas entre uma molécula de baixa massa molecular (por exemplo, uma droga) e seu local de ação (sítio ativo de uma proteína), tornou-se necessário testar enantiômeros individuais e não a mistura das duas formas. Esta mistura de enantiômeros pode ser difícil de separar, por isso é importante controlar a formação de um dos isômeros durante a síntese de um composto com estereocentro definido.⁶⁷

A quiralidade é extremamente importante para a manutenção da natureza e dos organismos vivos, a vida está intimamente ligada à assimetria do carbono. A quiralidade resulta na especificidade dos sistemas biológicos em reconhecer moléculas quirais.⁶⁷⁻⁷⁰ Como exemplo simples é possível citar as diferenças entre o cheiro da laranja e do limão que vem do limoneno para os dois casos (Figura 6), diferindo no seu arranjo espacial. Neste caso o enantiômero (*R*) tem cheiro de laranja e o enantiômero (*S*) tem cheiro de limão, que são facilmente diferenciados pelos receptores olfativos.

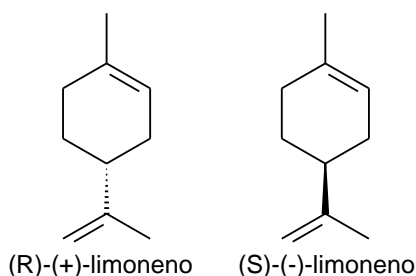


Figura 6. Estereoisômeros do limoneno.

Um outro exemplo clássico da diferenciação de resposta biológica à quiralidade é a talidomida (Figura 7). Um dos enantiômeros tem ação contra os incômodos efeitos de náuseas causados nos primeiros meses de gestação em mulheres, no

entanto o outro enantiômero foi responsável pelos defeitos congênitos em fetos, restringindo o desenvolvimento dos vasos sanguíneos que se dividem entre os tecidos, atualmente está sendo usado contra certos tipos de câncer. Em 1960 era utilizada a mistura racêmica da talidomida, levando ao nascimento de vários bebês com má formação dos membros superiores.⁶⁷

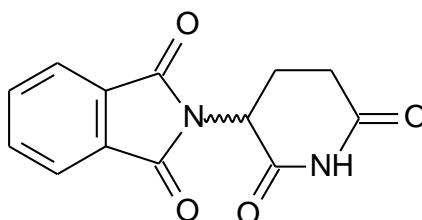


Figura 7. Talidomida sem estereoquímica definida.

A enantiodiferenciação esta baseada nas diferentes propriedades físicas dos diastereoisômeros formados a partir da interação entre os enantiômeros de um substrato e os receptores biológicos. Esta diferença dos enantiômeros de uma substância nos organismos vivos levou ao surgimento de processos industriais onde a pureza ótica é fundamental para a qualidade do produto, tais como nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de produtos agrícolas e de perfumaria.⁷¹

Estereoisômeros menos ativos na mistura podem diminuir o potencial do isômero mais ativo, e os isômeros podem diferir nas propriedades biológicas.⁷² Via de regra, a quantidade de material necessário no caso de um enantiômero puro é geralmente menor do que a quantidade necessária do racemato, o que pode ser vantajoso para o organismo em causa e para o ambiente, especialmente no caso de pesticidas.⁷³ As alterações nas conformações de estereoisômeros influenciam diretamente nas propriedades físicas^{74, 75} e nas atividades biológicas.⁷⁶

No que diz respeito aos compostos quirais em geral postula-se, de maneira resumida, que existam quatro tipos de comportamentos biológicos esperados.⁷⁷

a) a atividade biológica desejada é atribuída a apenas um dos enantiômeros, enquanto que o outro é inativo;

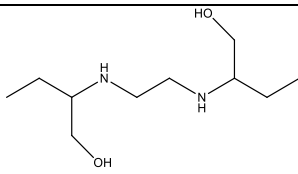
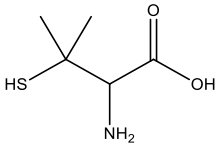
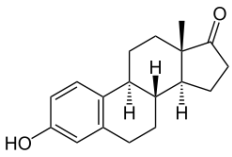
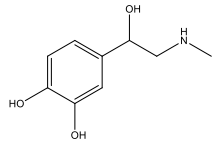
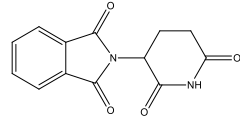
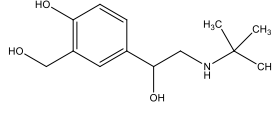
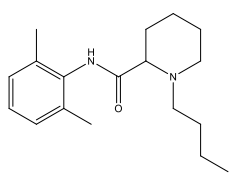
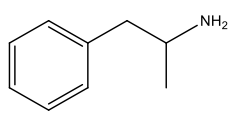
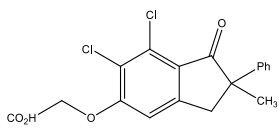
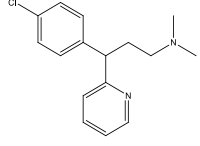
b) os enantiômeros possuem propriedades farmacológicas idênticas (ou próximas), tanto do ponto de vista qualitativo como quantitativo;

c) a atividade é qualitativamente idêntica, mas quantitativamente diferentes entre os estereoisômeros;

d) as atividades dos dois enantiômeros são qualitativamente diferentes.

Na Tabela 4 podem ser visualizados alguns exemplos de fármacos com suas diferentes atividades devido a sua estereoquímica.^{78, 79}

Tabela 4. Alguns exemplos de atividades biológicas exercidas por formas enantioméricas puras.

Fármaco	Estrutura	Efeito
etambutol		forma <i>SS</i> : tuberculostático forma <i>RR</i> : pode provocar cegueira
penicilamina		forma <i>S</i> : anti-artrítico forma <i>R</i> : extremamente tóxico
estrona		forma (+): hormônio estrogênico forma (-): inativo
adrenalina		a forma levógira é 20 vezes mais ativa e igualmente mais tóxica
talidomida		forma <i>R</i> : sedativo forma <i>S</i> : teratogênico
salbutamol		forma <i>R</i> (-) é 80 vezes mais ativo que a forma <i>S</i> (+)
bupivacaína		forma (+): ambos os isômeros possuem atividade anestésica local, mas apenas o isômero (-) apresenta ação vasoconstritora, prolongando assim a ação anestésica local.
anfetamina		a forma dextrógira é 2 vezes mais ativa que o enantiômero (-)
indacrinona		forma (+): ação diurética e retenção do ácido úrico forma (-): efeito uricosúrico
clorfeniramina		a atividade anti-histamínica é devida essencialmente à configuração <i>S</i>

Há uma necessidade constante na descoberta de novos produtos que possuam atividades herbicidas, fungicidas e inseticidas que causem poucos efeitos adversos para a saúde humana e para o meio ambiente.⁸⁰

Um exemplo de enantiômero com atividade herbicida é o (*R*)-Mecoprope, um herbicida seletivo utilizado em larga escala contra ervas daninhas que crescem conjuntamente com cereais como milho e trigo (Figura 8). Ao contrário do (*R*), o seu enantiômero (*S*), não apresentam atividade herbicida, e, ainda, neutraliza o efeito do (*R*).⁸¹

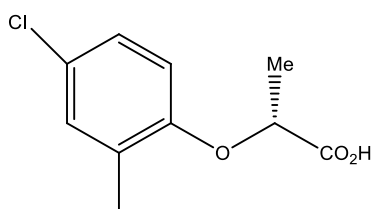


Figura 8. (*R*)-Mecoprope.

O (*R*)-metalaxil funciona como um fungicida (Figura 9), enquanto que o (*S*) é muito menos ativo.⁸²

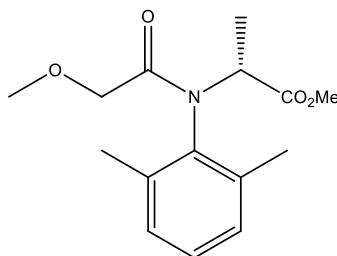


Figura 9. (*R*)-Metalaxil.

Indoxacarbe (*S*) (Figura 10) é aplicado como inseticida, enquanto o seu enantiômero (*R*) não possui nenhuma atividade relevante.⁸³

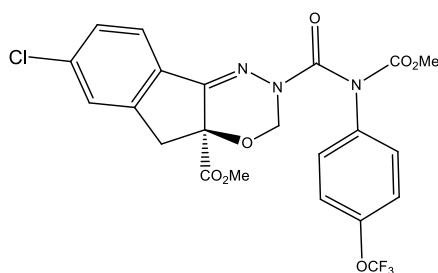
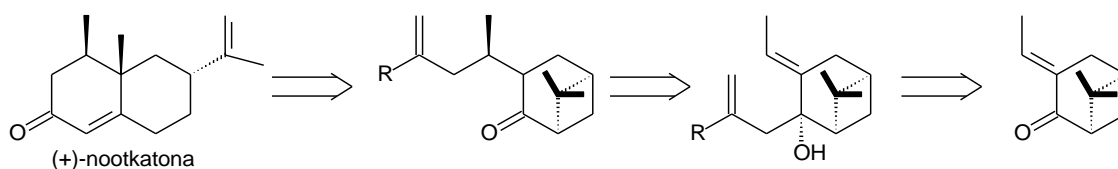


Figura 10. (*S*) – Indoxacarbe.

Outro produto que tem despertado interesse é o (+)-nootkatona por apresentar marcante atividade repelente e tóxica contra o cupim subterrâneo Formosan (*Coptotermes formosanus*). Esta molécula foi isolada pela primeira vez no cerne do cedro amarelo do Alasca, *Chamaecyparis nootkatensis* e mais tarde foi isolada da casca do *Citrus paradise* (toranja), compondo a essência de toranja. No entanto o custo atual do produto natural torna inviável qualquer aplicação industrial que não seja como aroma ou fragrância.⁸⁴

Esta molécula foi sintetizada por vários grupos de pesquisa, porém não apresentando viabilidade econômica. Como alternativa está sendo proposta pelo grupo de pesquisa de Laine, uma rota sintética assimétrica que vem apresentando resultados economicamente viáveis e podendo ser aplicada industrialmente, partindo do (-)- β -pineno (Esquema 1).⁸⁴



Esquema 1. Retrosíntese do composto (+)-nootkatona

Quando a atividade de um composto com atividade biocida é dependente da estereoquímica apresentada pelo composto, a síntese estereosseletiva pode possibilitar um caminho viável para a obtenção desses compostos em escala compatível com a necessária para a aplicação de tais em compostos como controles de pragas.^{85, 86}

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Determinação estrutural, síntese e aplicação de compostos com elevada ação larvicida e ou repelente visando tanto o controle populacional dos mosquitos *A. aegypti* como a diminuição das picadas destes mosquitos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese do composto candidato à larvicida, efetuada na UFSCar, e realização dos bioensaios para determinação de sua atividade frente a imaturos de *A. aegypti*.

- Teste da atividade do larvicida com larvas criadas em laboratório e com larvas de população silvestre proveniente de Foz de Iguaçu.

- Obtenção por hidrodestilação do óleo essencial de *Ocimum basilicum* que mostrou atividade repelente frente a *A. aegypti*.

- Identificação estrutural dos componentes do óleo essencial.

- Determinação das atividades repelentes do óleo essencial e dos componentes isoladamente e em combinações.

- Consolidar equipe multidisciplinar apta a enfrentar desafios na área de saúde pública.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As técnicas empregadas no desenvolvimento dos trabalhos experimentais foram baseadas na literatura especializada e adaptadas, quando necessário, para obtenção de melhores resultados.

As análises de compostos quirais foram realizadas em cromatógrafo Varian® 3800, equipado com coluna quiral CHIRASIL-DEX CB β -Ciclodextrina (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). A rampa de aquecimento para todas as análises foi de 40 °C a 170 °C, a 3 °C/min, utilizando He como gás de arraste.

As análises de espectrometria de massas foram realizadas em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas Shimadzu® GCMS – QP 2010 Plus equipado com coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Injetor em modo splitless a 250 °C, interface e fonte de íons a 300°C. A janela de massas analisada foi entre m/z 40 e m/z 350, utilizando He como gás de arraste.

As análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono foram efetuadas em um equipamento AVANCE 200 BRUKER utilizando-se clorofórmio deuterado como solvente e tetrametilsilano como referência.

A reação de síntese do estragol foi monitorada via cromatografia em camada delgada (CCD).

O estragol foi purificado por cromatografia flash em coluna, utilizando-se sílica gel 60 230-400 mesh ASTM Merck.

3.1 PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS NA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCAR)

3.1.1 Preparo das soluções dos complexos e ligantes

Soluções aquosas em diversas concentrações dos sete complexos sintetizados na UFSCar e de cinco ligantes utilizados na síntese dos complexos mais ativos, foram preparadas no Laboratório de Ecologia Química e Síntese de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Quando necessário adicionou-se sulfóxido de dimetila (1 mL) para facilitar a dissolução, seguida da adição, sob agitação constante, de água destilada. As soluções preparadas foram encaminhadas ao Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV) do Departamento de Zoologia da UFPR para que suas atividades larvicidas fossem avaliadas.

3.2 BIOENSAIOS

3.2.1. Criação das Larvas

Os bioensaios foram realizados com larvas de *A. aegypti* obtidas a partir de ovos da colônia “Rockefeller-CDC” (Center of Disease Control) e da colônia de população silvestre de procedência de Foz do Iguaçu (F3), ambas já previamente estabelecidas no insetário do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), trabalho em colaboração com o Prof. Mario A. Navarro-Silva.

Os ovos foram submersos em copos plásticos com capacidade para 770 mL preenchido com água desclorada e adicionado 26 mg de ração triturada a fim de induzir a eclosão de larvas. Obtida a eclosão larval, mediante visualização das larvas, e passadas 24 horas, estas foram transferidas para bandejas plásticas (35,5 cm x 21,5 cm x 6,5 cm) contendo 3 L de água, também desclorada (Figura 11). Estas larvas foram mantidas sob condições de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$), umidade ($70\% \pm 10$) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada Modelo 347 CDG. Assim

permaneceram até atingirem o estágio de 3º instar final ou 4º inicial, não sofrendo nenhum tipo de tratamento químico.

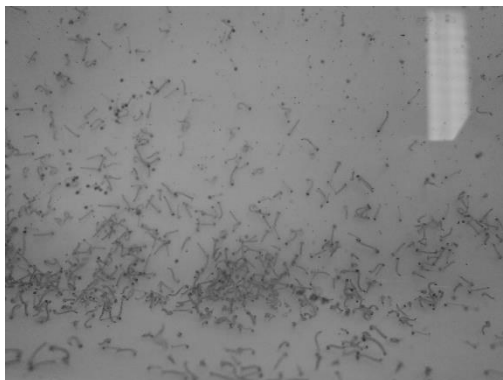


Figura 11. Larvas do mosquito *A. aegypti*.

3.2.2 Determinação da Atividade Larvicida.

Os bioensaios de atividade larvicida para os compostos provenientes da UFSCar seguiram o protocolo da Organização Mundial de Saúde (OMS), com algumas modificações. Inicialmente realizou-se apenas um bioensaio preliminar para cada um dos sete complexos (C1 a C7) em concentração de 40 μ M em quadruplicata bem como com os cinco ligantes dos dois complexos mais ativos (SB2 a SB6), Figura 12.



Figura 12. Soluções dos complexos C1 a C7 na concentração de 40 μ M.

Atingindo o estágio larval descrito acima, as larvas (20 para cada tratamento) foram contadas, separadas e transferidas, com auxílio de pipeta de Pauster, submersas em 20 mL de água desclorada, para copos plásticos descartáveis com capacidade para 330 mL (Figura 13). Juntamente com as larvas as soluções aquosas

dos diferentes compostos foram adicionadas ao recipiente, de acordo com a quantidade previamente determinada. O volume final de cada tratamento foi de 100 mL. Adicionou-se em cada tratamento ração para gato como fonte de alimento (26 mg). A cada quatro dias uma nova porção de ração foi adicionada. As condições para a manutenção dos experimentos foram as mesmas descritas para a criação das larvas, sendo que os copos foram mantidos na mesma câmara climatizada Modelo 347 CDG. As leituras foram efetuadas a cada 24 horas até o período máximo de 20 dias. Todos os tratamentos foram realizados em quadruplicata.



Figura 13. Copos plásticos descartáveis com capacidade para 330 mL.

Depois de selecionado o candidato a melhor larvicida, realizou-se testes nas mesmas condições descritas acima nas seguintes concentrações 1 μM , 5 μM , 10 μM , 13 μM , 15 μM , 18 μM , 20 μM , 30 μM , e 200 μM .

Cada tratamento foi realizado em três oportunidades diferentes, totalizando 12 bioensaios e 240 larvas para cada tratamento.

Dois tipos de controle foram efetuados, um com as larvas dispostas apenas em água (100 mL) mais a ração de gato e outro com as larvas dispostas numa solução de sulfóxido de dimetila (1 mL) em água (99 mL) mais ração para gato.

3.3 OBTENÇÃO DO ÓLEO DE MANJERICÃO *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae)

Em um balão de duas bocas de 2 L foram adicionadas 100 g folhas de manjericão secas e fragmentadas, seguido da adição de água destilada até 2/3 do volume do balão. O balão foi adaptado a um aparelho de Clevenger modificado e o sistema aquecido com auxílio de uma manta de aquecimento até a destilação do solvente. A extração foi mantida por aproximadamente 4 horas e o aquecimento foi desligado. Separou-se a fase oleosa da aquosa e extraiu-se a fase aquosa com éter etílico (3 x 30 mL). A fase orgânica foi separada e secada com sulfato de magnésio anidro. Após filtração o solvente foi removido sob pressão reduzida em evaporador rotativo obtendo-se 250 mg (0,25% m/m) do óleo essencial.

3.3.1 Identificação dos compostos presentes no óleo essencial de *Ocimum basilicum*.

A determinação da composição do óleo de manjericão (*O. basilicum*) foi feita através de análise cromatográfica acoplada à espectrometria de massas comparando os dados dos índices de Kovats e dos espectros de fragmentação de massas dos compostos com dados de literatura. Condições de análise:

Pressão: 59 kPa

Fluxo: 24,4 mL/min

Velocidade linear: 36,8 cm/s

Gás de Arraste: Hélio

Volume injetado: 1 µL

Solvente: Hexano (solução a 1 mg/mL)

Temperatura: 60°C até 250°C, a 3°C/min.

3.5 PROCEDIMENTO PARA SÍNTESE DO ESTRAGOL

A um balão de 50 mL, equipado com agitação magnética, condensador de refluxo e mantido sob atmosfera de argônio, foi adicionado magnésio (0,264 g, 11 mmol), tetraidrofurano anidro (10 mL) e 1-bromo-4-metoxibenzeno (1,87 g, 10 mmol) o qual foi adicionado gota a gota. A mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente durante uma hora. Após consumo quase total do magnésio, adicionou-se lentamente uma solução de brometo de alila (1,21 g, 10 mmol) em THF (10 mL) à temperatura de 0°C. A mistura reacional foi agitada por 30 minutos à temperatura ambiente. Água (5 mL) foi adicionada ao balão reacional o qual foi agitado por cinco minutos e o conteúdo do balão foi transferido para um funil de separação contendo éter etílico (30 mL). As fases foram separadas e a fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl (10 mL). A fase orgânica foi secada sob sulfato de magnésio anidro e filtrada. O produto foi purificado por cromatografia flash em gel de sílica usando uma mistura de hexano/acetato de etila (9:1) como eluente. Obteve-se 814 mg (55%) do produto purificado. E.M. *m/z* (abund. relativa %): 148 (M⁺, 100); 147 (M⁺-1, 60); 133 (24); 117 (46); 105 (28) e 91 (33) 77(38).

RMN de ¹H (200 MHz CDCl₃) δ (ppm): 3,32 (d, *J* = 6,83 Hz, 2H); 3,78 (s, 3H); 5,05 (m, 2 H); 5,95 (ddt, 1H); 6,85 (dd, *J* = 8,80 Hz e 1,77 Hz, 2H); 7,09 (d, *J* = 8,80 Hz, 2H).

RMN de ¹³C (200 MHz CDCl₃) δ (ppm): 39,4; 55,2; 113,8; 115,4; 129,5; 133,2; 137,9; 158.

3.6 PROCEDIMENTO PARA HIDROGENAÇÃO DO LINALOL

A um balão de 25 mL, equipado com agitação magnética e mantido sob atmosfera de hidrogênio, foi adicionado Pd/C (0,200 g), etanol (10 mL) e o linalol (0,154 g 1 mmol). A mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente durante 72 horas. O conteúdo do balão foi filtrado em celite (2,0 g) utilizando éter etílico como solvente, posteriormente o solvente foi evaporado à pressão reduzida. Obteve-se

0,135 g (86%) da mistura contendo o produto hidrogenado como majoritário. E.M. m/z (abund. relativa %): 73 (100); 69 (60) e 55 (46).

RMN de ^1H (200 MHz CDCl_3) δ (ppm): 0,87 (t, $J = 8,0$ Hz, 3H); 0,89 (d, $J = 6,8$ Hz, 6H); 1,30 (m, 2H); 1,30 (m, 2H) 1,39 (s, 3H); 1,42 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H); 1,55 (q, $J = 8,0$ Hz, 2H); 1,69 (m, 1H).

RMN de ^{13}C (200 MHz CDCl_3) δ (ppm): 8,5; 21,7; 22,5; 27,3; 28,1; 34,1; 40,2; 42,8; 74,3.

3.7 TESTE DE REPELÊNCIA.

Os testes de repelência foram realizados na sala de criação do insetário do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, situado no Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná, a uma temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 60 a 70%. Os dados de temperatura e umidade relativa, dentro da sala de criação e gaiola, foram monitorados e registrados utilizando um termo higrômetro digital durante os experimentos.

Para a realização dos testes foram utilizadas gaiolas de madeira com telas nas laterais e vidro na face superior medindo 30 cm X 30 cm X 30 cm com fêmeas do mosquito *A. aegypti*, todas copuladas sem ter passado pelo repasto sanguíneo. Os testes foram realizados no período diurno, respeitando a preferência para a atividade de hematofagia do mosquito, registrando a data e horário de realização dos testes.

Através de um cronômetro digital foi registrado o tempo máximo de 5 minutos para os testes preliminares e de 15 minutos para os demais experimentos e também registrado o tempo da primeira picada. Ocorrendo mais que duas picadas antes do tempo máximo o experimento foi interrompido. No fim de cada teste foi registrado o número de picadas observadas na mão do analisador.

Para os testes uma das mãos do analisador foi higienizada com sabão neutro e em seguida a face superior, inferior, lateral e a região entre os dedos, foram tratadas com soluções dos possíveis repelentes em etanol. A mão fechada foi introduzida na gaiola para realização dos testes conforme a Figura 14, com o analisador sentado, ou

seja, em posição de descanso, não tendo realizado esforço físico anteriormente à realização dos testes.



Figura 14. Posicionamento da mão na gaiola durante os testes realizados.

O óleo essencial de *O. basilicum* extraído, bem como os compostos isolados e combinações dos mesmos, ou variações, destes tiveram suas atividades de repelência avaliadas. Para os testes foram preparadas diferentes concentrações dos possíveis repelentes, diluídos em etanol, a um volume total final de 1,5 mL.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS NA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCar)

Inicialmente foi realizado um bioensaio piloto, em quadruplicata, com sete complexos diferentes, previamente selecionados, com apenas uma concentração de cada composto, 40 μ M. Os complexos utilizados foram denominados como C1 a C7. Tal bioensaio-piloto se fez necessário, também, para a determinação do método a ser aplicado aos futuros bioensaios com os compostos que apresentassem melhores resultados larvicidas.

Para os grupos controle, uma parcela das larvas foi exposta a uma solução aquosa de sulfóxido de dimetila (1 mL para 99 mL de água destilada), uma vez que alguns compostos precisaram ser pré-solubilizados neste solvente, e outro grupo foi exposto apenas à água destilada. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata.

A mortalidade das larvas foi verificada a cada 24 horas até a emergência completa do último adulto do grupo controle contendo água destilada. As larvas incapazes de atingir a superfície da água ou imóveis quando submetidas a estímulos, batidas sucessivas na parede dos copos com pipeta de Pauster, foram consideradas como larvas mortas. As larvas mortas foram descartadas a cada leitura de 24 horas. Ao final do experimento as larvas sobreviventes foram descartadas.

O bioensaio-piloto teve duração de 96 horas (4 dias), sem adição de ração e com reposição de água em caso de evaporação para manter sempre o volume final de 100 mL. Os resultados obtidos (em valores absolutos) podem ser observados de acordo com a Tabela 5 e Figura 15. Os compostos que apresentaram melhores resultados foram C1 e C7, com mortalidade maior que 50% das larvas em até 4 dias (96 h).

Tabela 5. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante o bioensaio preliminar realizado para avaliação da atividade larvicida dos compostos C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, sobre imaturos de *Aedes aegypti* da colônia Rockefeller, na concentração de 40 µM, com duração de 96 horas (quatro dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e foto período (12:12) controlados em câmara climatizada.

HORAS	CONTROLE H ₂ O (n= 77)		CONTROLE DMSO (n= 80)		C1 (n= 39)		C2 (n= 80)		C3 (n= 80)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	2,6	0,0	1,3	0,0	7,7	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0
42 h	3,9	0,0	1,3	0,0	20,5	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0
72 h	5,2	0,0	1,3	0,0	43,6	0,0	0,0	0,0	1,3	1,3
96 h	6,5	1,3	1,3	0,0	61,5	0,0	0,0	0,0	2,5	1,3
TOTAL	6,5	1,3	1,3	0,0	61,5	0,0	0,0	0,0	2,5	1,3

HORAS	C4 (n= 79)		C5 (n= 78)		C6 (n= 79)		C7 (n= 60)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
42 h	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0	13,3	0,0
72 h	0,0	0,0	1,3	2,6	0,0	0,0	38,3	0,0
96 h	1,3	0,0	1,3	5,1	0,0	0,0	55,0	0,0
TOTAL	1,3	0,0	1,3	5,1	0,0	0,0	55,0	0,0

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas; C1= composto 1; C2=composto 2; C3=composto 3; C4=composto 4; C5=composto 5; C6=composto 6; C7=composto.

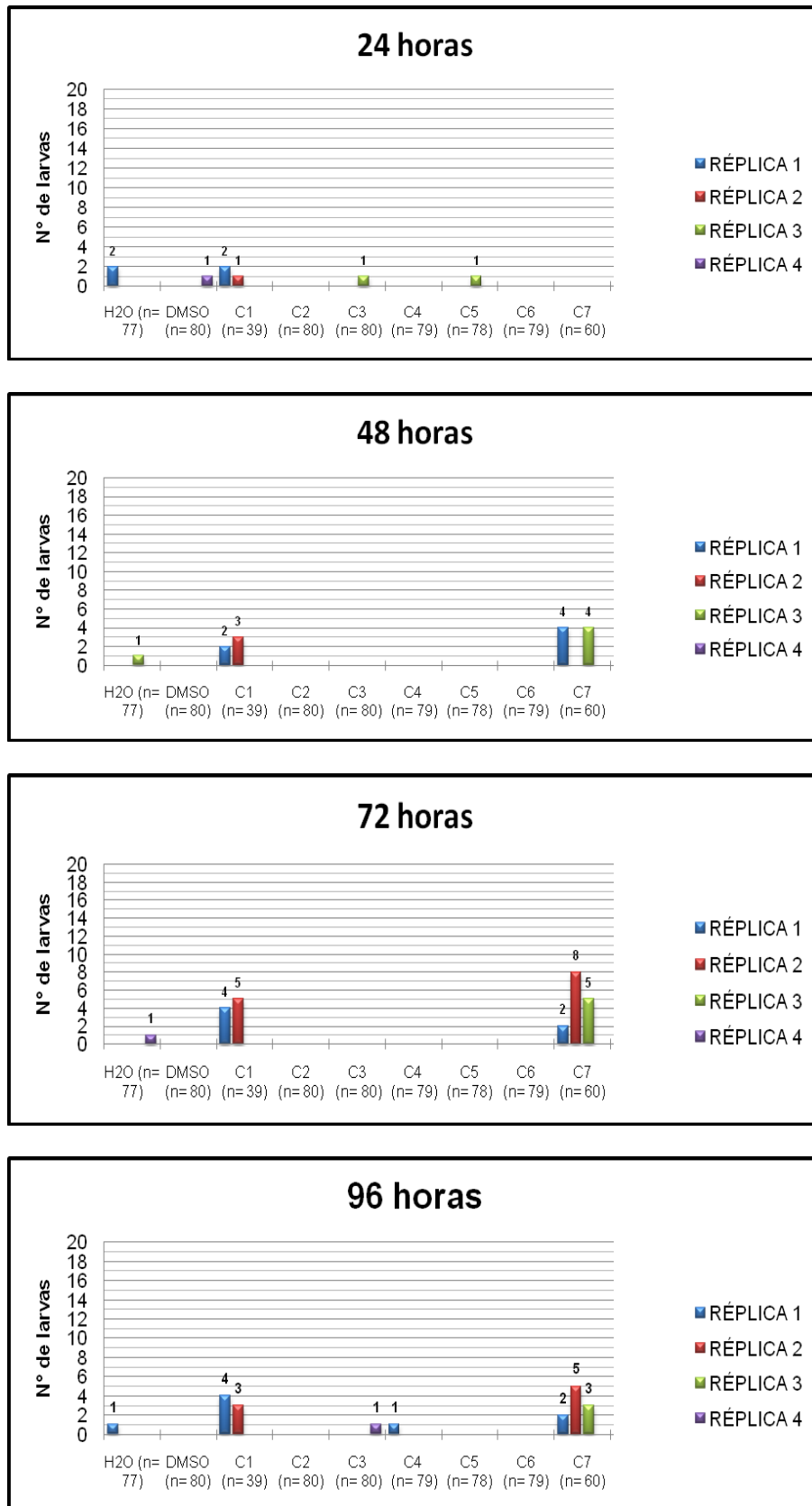


Figura 15. Mortalidade larval não acumulada por composto, por réplica e por dia (em horas), referente ao bioensaio preliminar realizado com os compostos C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7. (n) = número total de larvas expostas por produto.

Os compostos C1 e C7 foram selecionados para dar continuidade a avaliação de atividade larvicida bem como suas subunidades (SB2, SB3, SB4, SB5 e SB6) (Tabela 6 e Figura 16), com duração de total de 264 horas.

Tabela 6. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios preliminares realizados para avaliação da atividade larvicida dos compostos C1 e C7 e suas subunidades (SB 2, SB 3, SB4, SB 5 e SB6), na concentração de 40 µM, sobre imaturos de *Aedes aegypti* da colônia Rockefeller, com duração total de 264 horas (onze dias), mantido sob condições de temperatura (25°C ± 1), umidade (70% ± 10) e foto período (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

HORAS	CONTROLE H2O (n= 241)		CONTROLE DMSO (n= 241)		C1 (n= 240)		C7 (n= 242)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	0,0	0,0	6,3	0,0	6,2	0,0
42 h	0,0	0,4	0,0	0,0	39,6	0,0	38,4	0,0
72 h	0,4	2,5	0,0	0,4	62,5	0,0	64,0	0,0
96 h	2,1	14,1	5,8	7,1	77,9	0,0	79,8	0,0
120 h	2,9	33,6	9,1	22,0	86,3	0,0	88,0	0,0
144 h	3,7	64,3	10,4	31,5	90,8	0,0	92,1	0,0
168 h	4,1	72,6	11,6	39,8	93,3	0,0	93,8	0,4
192 h	5,0	79,7	13,7	44,4	93,8	0,0	93,8	0,4
216 h	5,4	85,1	16,2	47,7	94,2	0,0	93,8	0,4
240 h	10,8	85,9	27,4	47,7	94,2	0,0	93,8	0,4
264 h	11,6	88,4	28,6	47,7	94,2	0,0	93,8	0,4
TOTAL	11,6	88,4	28,6	47,7	94,2	0,0	93,8	0,4

HORAS	SB2 (n= 241)		SB3 (n= 240)		SB4 (n= 219)		SB6 (n= 239)		SB5 (n= 241)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	0,8	0,0	1,8	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
42 h	0,8	0,0	18,8	0,0	5,0	0,0	0,8	0,0	0,4	0,0
72 h	0,8	0,0	43,8	0,0	5,5	0,0	0,8	0,0	0,8	0,0
96 h	2,5	10,8	62,5	0,0	6,8	3,2	2,1	13,4	2,5	14,5
120 h	4,6	27,8	72,9	0,0	9,1	17,8	3,8	36,8	4,1	40,7
144 h	8,3	49,0	82,5	0,8	12,3	30,6	6,3	49,4	4,6	52,7
168 h	9,5	56,0	82,9	1,3	16,0	41,1	6,3	56,1	4,6	59,3
192 h	10,0	62,2	85,4	1,7	21,0	46,1	7,1	59,8	5,8	63,9
216 h	10,4	63,9	87,5	2,1	23,7	50,7	7,9	62,3	7,5	68,0
240 h	14,1	63,9	87,5	2,1	25,6	51,1	10,5	62,3	10,4	70,5
264 h	14,5	63,9	87,5	2,1	26,5	51,1	11,3	62,3	10,8	71,4
TOTAL	14,5	63,9	87,5	2,1	26,5	51,1	11,3	62,3	10,8	71,4

M.L. = porcentagem da mortalidade larval; F.P. = porcentagem de formação de pupas; n = número total de larvas expostas; C1 = composto 1; C7 = compostos 7; SB2 = subunidade 2; SB3 = subunidade 3; SB4 = subunidade 4; SB5 = subunidade 5; SB6 = subunidade 6.

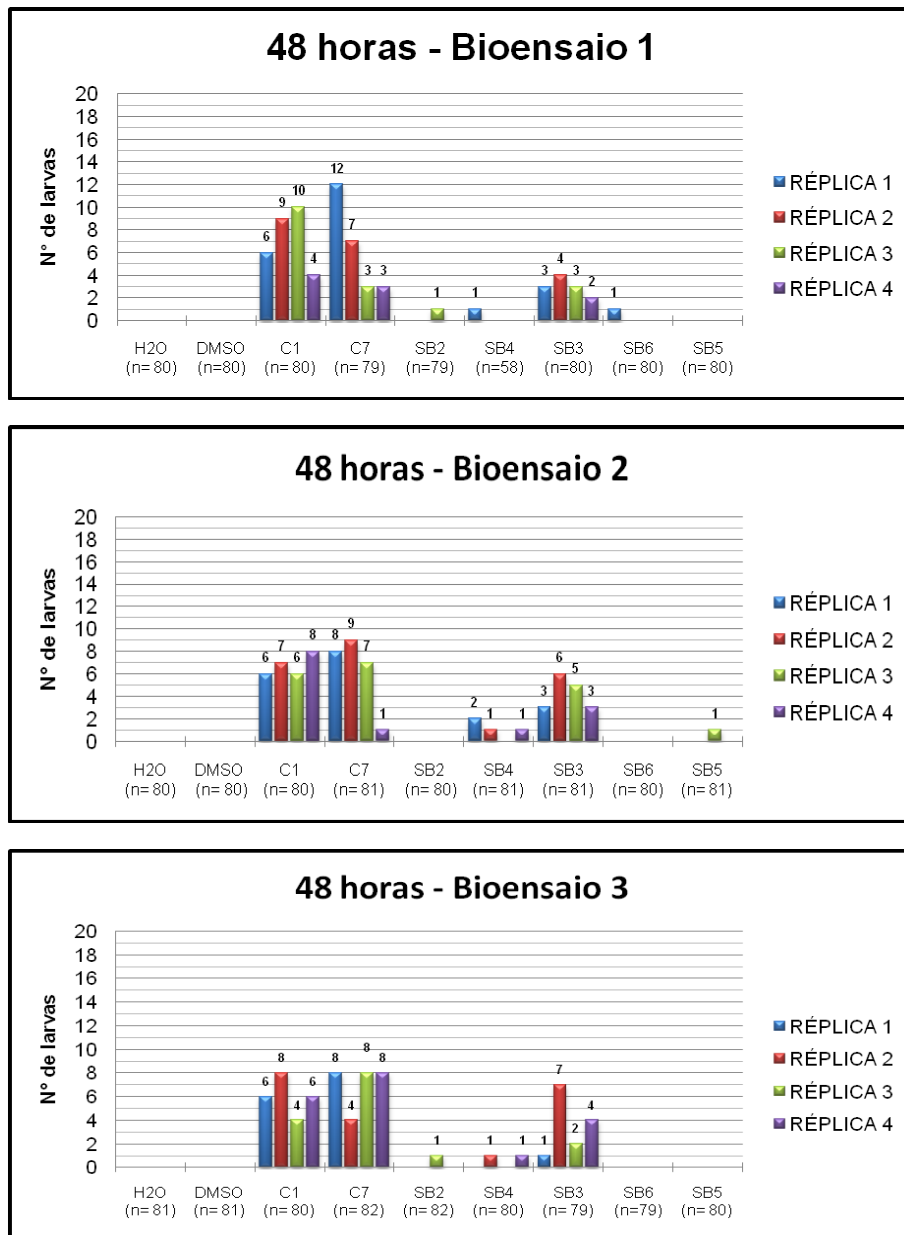


Figura 16. Mortalidade larval não acumulada por composto e subunidades e por réplica em 48 horas, horário no qual ocorreu maior mortalidade, referente ao bioensaio de efetividade realizado com os compostos C1 e C7 e suas subunidades. (n) = número total de larvas expostas por produto.

Os compostos C1 e C7 foram os que apresentaram melhores resultados, comparados aos demais, pois ambos, depois de 72 h, haviam matado mais da metade das larvas presentes nos copos.

A partir deste bioensaio piloto selecionou-se o composto C7 para a continuidade da avaliação de sua atividade larvicida, tendo em vista a facilidade de síntese, baixa toxicidade e baixo custo de produção. Nos bioensaios subsequentes adicionou-se 26 mg de ração no início dos bioensaios e a cada 24 horas sendo que houve também reposição de água, para manter o volume em 100 mL.

Nove concentrações do composto C7 foram avaliadas, sendo elas: 1 μM , 5 μM , 10 μM , 13 μM , 15 μM , 18 μM , 20 μM , 30 μM , e 200 μM . Para cada concentração foram realizados bioensaios em quadruplicata e em três dias diferentes, totalizando 12 bioensaios. Mantido sob condições de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$), umidade ($70\% \pm 10$) e foto período (12:12) controlados em câmara climatizada. Com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

Os bioensaios de efetividade realizados com composto C7 mostraram atividade larvicida de 100% para as concentração de 200 μM sob condições controladas ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$, umidade $70\% \pm 10$ e fotoperíodo (12:12) sobre populações de *A. aegypti* da colônia Rockefeller (Tabela 7 e Figura 17). Para a concentração de 200 μM deve se destacar que não houve a emergência de adultos (Tabela 8).

Tabela 7. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 200 μM , sobre imaturos de *Aedes aegypti*, com duração total de 96 horas (quatro dias).

HORAS	CONTROLE H ₂ O (n= 160)		200 μM (n= 158)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	65,8	0,0
42 h	0,0	0,0	89,2	0,0
72 h	0,0	0,6	96,2	0,0
96 h	3,8	25,0	100,0	0,0
TOTAL	3,8	25,0	100,0	0,0

n = número total de larvas expostas.

Tabela 8. Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 200 μM , sobre imaturos de *Aedes aegypti*, com duração de 96 horas (quatro dias).

COMPOSTO	Término do bioensaio (96 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H ₂ O (n= 160)	25,0	0,0	71,2
200 μM (n= 158)	0,0	0,0	0,0

n = número total de larvas expostas.

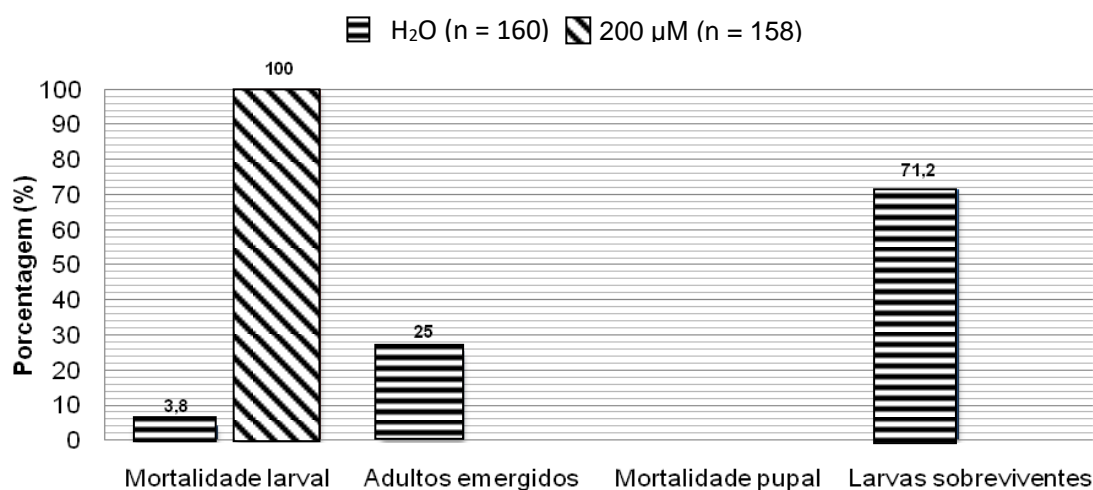


Figura 17. Porcentagem de mortalidade larval, emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7 sobre imaturos de *Aedes aegypti*, nas concentrações de 200 μM , com duração total de 96 horas (quatro dias). (n) = número total de larvas expostas por produto.

As outras oito concentrações do composto C7 foram avaliadas, sendo elas: 1 μM , 5 μM , 10 μM , 13 μM , 15 μM , 18 μM , 20 μM e 30 μM . Os resultados estão representados nas Tabelas 9 a 24 e Figuras 15 a 22. Também para cada concentração foram realizados bioensaios em quadruplicata e em três dias diferentes, totalizando 12 bioensaios. Os bioensaios foram mantidos sob condições de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$), umidade ($70\% \pm 10$) e foto período (12:12) controlados em câmara climatizada, com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas.

Tabela 9. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 30 μM , sobre imaturos de *Aedes aegypti*, com duração total de 168 horas (sete dias).

HORAS	CONTROLE H ₂ O (n= 238)		30 μM (n= 240)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,4	0	4,2	0
42 h	2,9	0	47,5	0
72 h	5	0,4	70,8	0
96 h	6,7	37	84,2	0
120 h	7,6	66,8	92,9	0,4
144 h	8,8	73,9	97,5	0,4
168 h	8,8	74,4	99,6	0,4
TOTAL	8,8	74,4	99,6	0,4

n = número total de larvas expostas.

Tabela 10. Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 30 μM , sobre imaturos de *Aedes aegypti*, com duração total de 168 horas (sete dias).

COMPOSTO	Término do bioensaio (168 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H ₂ O (n= 238)	73,1	1,3	16,8
30 μM (n= 240)	0,0	0,4	0,0

n = número total de larvas expostas.

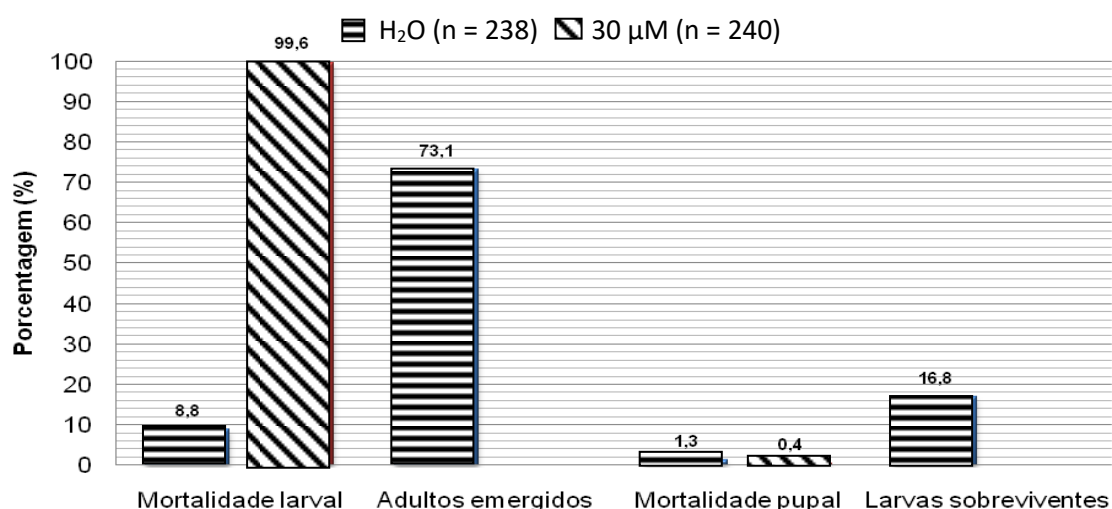


Figura 18. Porcentagem de mortalidade larval, emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7 sobre imaturos de *Aedes aegypti*, nas concentrações de 30 μM , com duração total de 168 horas (sete dias). (n) = número total de larvas expostas por produto.

Tabela 11. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 20 μM , sobre imaturos de *Aedes aegypti*, com duração total de 216 horas (nove dias).

HORAS	CONTROLE H ₂ O (n= 238)		20 μM (n=242)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,4	0,0	11,6	0,0
42 h	2,9	0,0	42,1	0,0
72 h	5,0	0,4	67,4	0,0
96 h	6,7	37,0	79,8	0,0
120 h	7,6	66,8	85,1	0,0
144 h	8,8	73,9	90,1	0,4
168 h	9,2	76,9	92,1	0,8
192 h	14,7	80,3	92,6	0,8
216 h	14,7	85,3	93	0,8
TOTAL	14,7	85,3	93	0,8

n = número total de larvas expostas.

Tabela 12. Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 20 μM , sobre imaturos de *Aedes aegypti*, com duração total de 216 horas (nove dias).

COMPOSTO	Término do bioensaio (216 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H ₂ O (n= 238)	84,0	1,3	0,0
20 μM (n=242)	0,4	0,4	6,2

n = número total de larvas expostas.

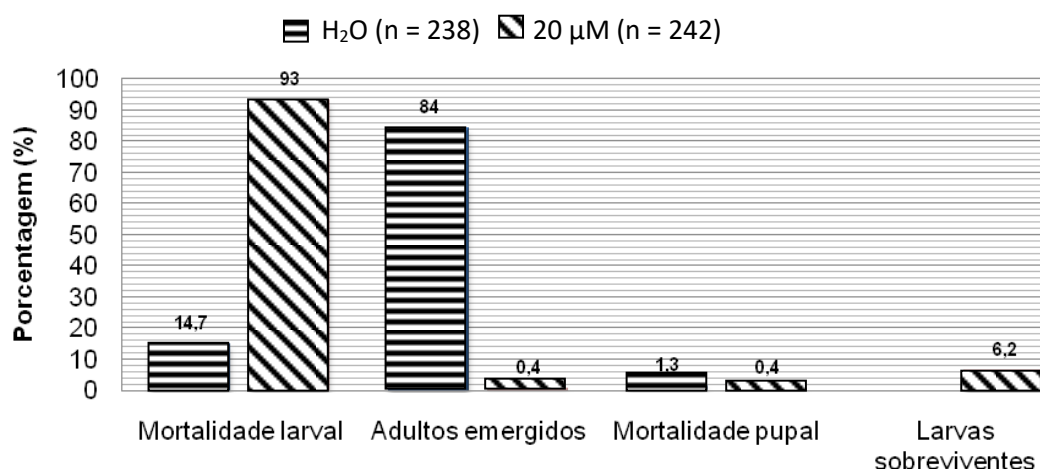


Figura 19. Porcentagem de mortalidade larval, emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do composto C7 sobre imaturos de *Aedes aegypti*, nas concentrações de 20 μM , com duração total de 216 horas (nove dias).

Tabela 13. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 18 μM , sobre imaturos de *Aedes aegypti*, com duração total de 240 horas (dez dias).

HORAS	CONTROLE H ₂ O (n= 239)		18 μM (n= 241)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	18,3	0,0
42 h	0,0	1,3	43,6	0,8
72 h	0,0	9,6	68,5	0,8
96 h	2,9	49,8	78,4	0,8
120 h	3,8	76,6	82,6	0,8
144 h	5,0	85,8	85,5	0,8
168 h	5,9	87,4	87,1	1,7
192 h	6,3	89,1	90,0	2,1
216 h	6,7	92,9	90,5	2,5
240 h	6,7	93,3	90,5	2,5
TOTAL	6,7	93,3	90,5	2,5

n = número total de larvas expostas.

Tabela 14. Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 18 μM , sobre imaturos de *Aedes aegypti*, com duração total de 240 horas (dez dias).

COMPOSTO	Término do bioensaio (240 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H ₂ O (n= 239)	90,8	2,5	0,0
18 μM (n= 241)	1,7	0,8	7,1

n = número total de larvas expostas.

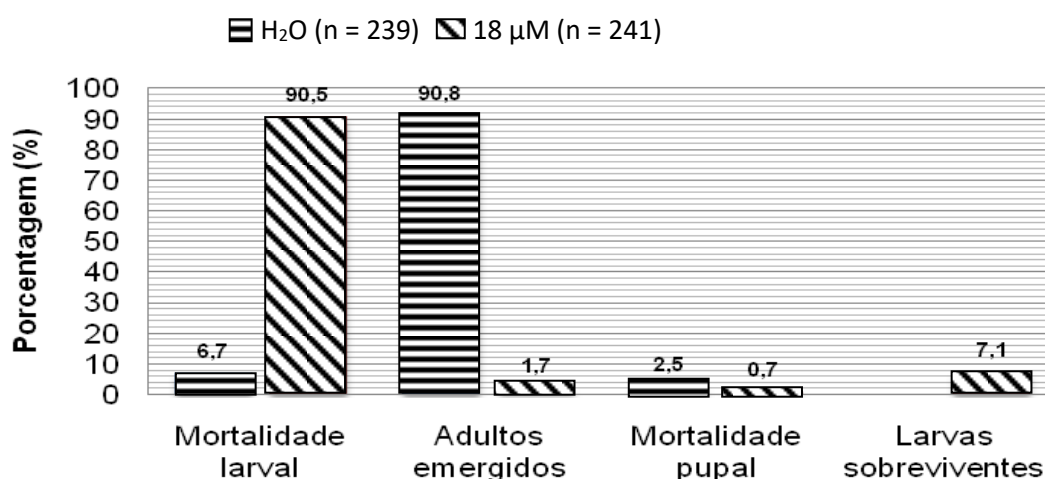


Figura 20. Porcentagem de mortalidade larval, emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7 sobre imaturos de *Aedes aegypti*, nas concentrações de 18 μM , com duração total de 240 horas (dez dias). (n) = número total de larvas expostas por produto.

Tabela 15. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 15 μM , sobre imaturos de *Aedes aegypti*, com duração total de 240 horas (dez dias).

HORAS	CONTROLE H ₂ O (n= 238)		15 μM (n= 243)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	8,6	0,0
42 h	1,7	3,8	27,6	0,0
72 h	2,1	5,9	47,3	0,0
96 h	6,3	61,3	59,3	0,0
120 h	6,3	71,8	72,4	0,0
144 h	7,6	79,8	80,7	0,0
168 h	8,4	81,1	86,8	0,4
192 h	8,8	83,6	89,3	0,4
216 h	9,2	87,0	89,3	2,1
240 h	9,2	90,8	89,3	2,5
TOTAL	9,2	90,8	89,3	2,5

n = número total de larvas expostas.

Tabela 16. Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 15 μM , sobre imaturos de *Aedes aegypti*, com duração total de 240 horas (dez dias).

COMPOSTO	Término do bioensaio (240 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H ₂ O (n= 238)	85,7	5,0	0,0
15 μM (n= 243)	1,2	1,2	8,6

n = número total de larvas expostas.

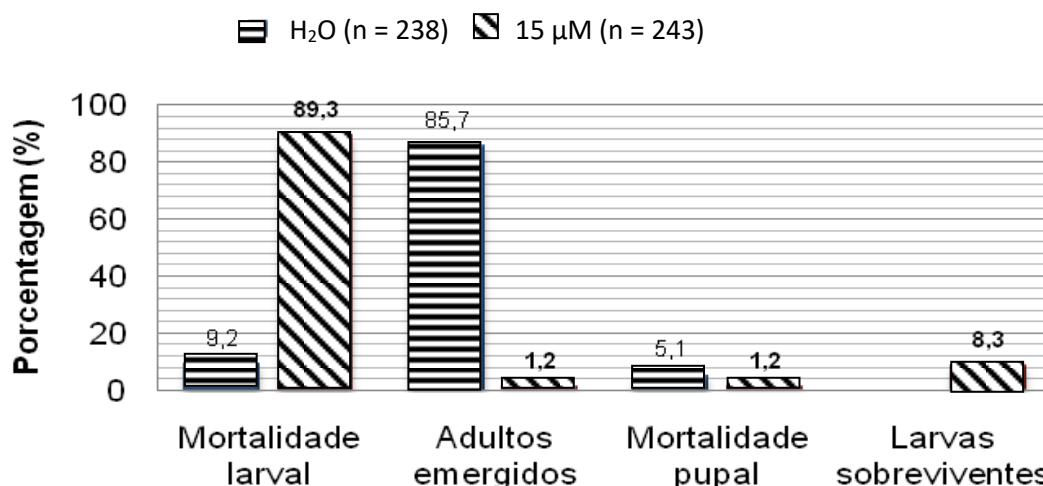


Figura 21. Porcentagem de mortalidade larval, emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7 sobre imaturos de *Aedes aegypti*, nas concentrações de 15 μM , com duração total de 240 horas (dez dias). (n) = número total de larvas expostas por produto.

Tabela 17. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 13 μM , sobre imaturos de *Aedes aegypti*, com duração total de 240 horas (dez dias).

HORAS	CONTROLE H ₂ O (n= 239)		13 μM (n= 238)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	16,4	0,0
42 h	0,0	1,3	34,9	0,8
72 h	0,0	9,6	48,7	1,3
96 h	2,9	49,8	62,2	1,7
120 h	3,8	76,6	65,5	2,9
144 h	5,0	85,8	68,1	4,2
168 h	5,9	87,4	71,8	6,7
192 h	6,3	89,1	77,7	7,1
216 h	6,7	92,9	78,6	7,6
240 h	6,7	93,3	78,6	7,6
TOTAL	6,7	93,3	78,6	7,6

n = número total de larvas expostas.

Tabela 18. Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término do bioensaio de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 13 μM , sobre imaturos de *Aedes aegypti*, com duração total de 240 horas (dez dias).

COMPOSTO	Término do bioensaio (240 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H ₂ O (n= 239)	90,8	2,5	0,0
13 μM (n= 238)	5,0	2,5	13,8

n = número total de larvas expostas.

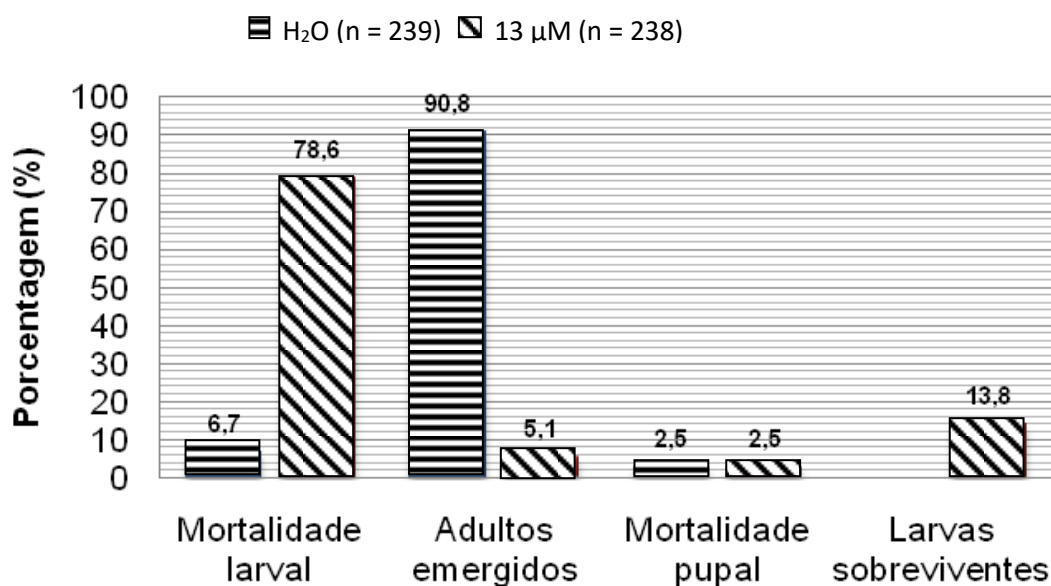


Figura 22. Porcentagem de mortalidade larval, emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizado para avaliação da atividade larvicida do composto C7 sobre imaturos de *Aedes aegypti*, nas concentrações de 13 µM, com duração total de 240 horas (dez dias). (n) = número total de larvas expostas por produto.

Tabela 19. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 10 µM, sobre imaturos de *Aedes aegypti*, com duração total de 288 horas (doze dias).

HORAS	CONTROLE H ₂ O (n= 240)		10 µM (n= 220)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	8,2	0,0
42 h	1,3	3,3	18,6	0,5
72 h	2,9	4,2	26,4	0,9
96 h	2,9	50,8	40,0	1,4
120 h	3,3	72,5	50,0	4,5
144 h	4,2	75,4	56,4	5,9
168 h	4,2	77,1	65,9	7,7
192 h	4,2	80,4	70,5	10,5
216 h	4,6	85	71,4	11,8
240 h	5,8	91,7	72,3	16,4
264 h	6,3	91,7	72,3	16,4
288 h	7,5	92,5	72,7	16,8
TOTAL	7,5	92,5	72,7	16,8

n = número total de larvas expostas.

Tabela 20. Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 10 μM , sobre imaturos de *Aedes aegypti*, com duração total de 288 horas (doze dias).

COMPOSTO	Término do bioensaio (288 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H ₂ O (n= 240)	88,8	3,8	0,0
10 μM (n= 220)	10,9	5,9	10,4

n = número total de larvas expostas.

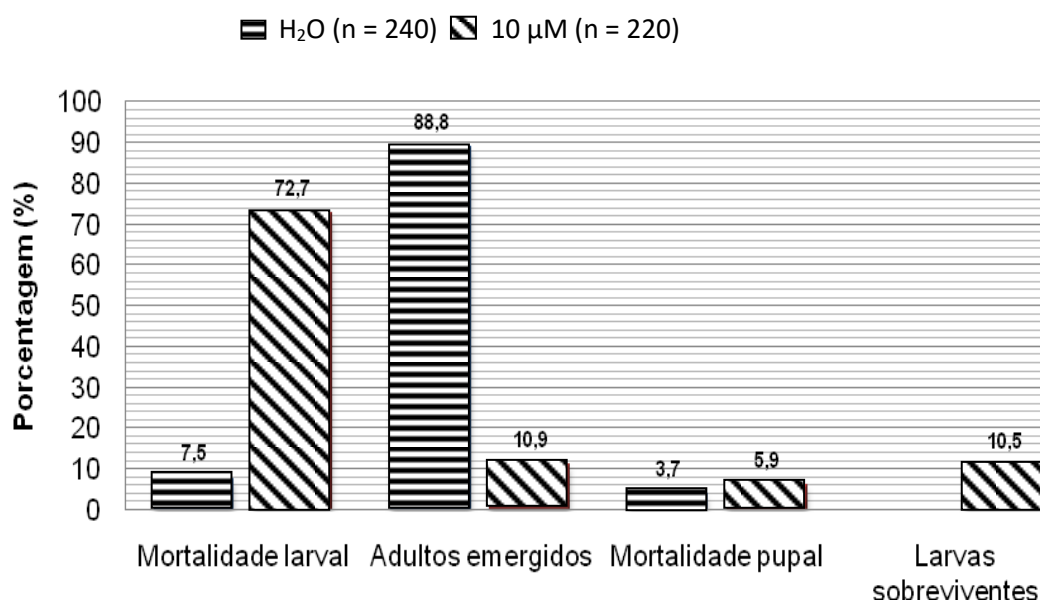


Figura 23. Porcentagem de mortalidade larval, emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7 sobre imaturos de *Aedes aegypti*, nas concentrações de 10 μM , com duração de 288 horas (doze dias). (n) = número total de larvas expostas por produto.

Tabela 21. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 5 μ M, sobre imaturos de *Aedes aegypti*, com duração total de 288 horas (doze dias).

HORA S	CONTROLE H ₂ O (n= 240)		5 μ M (n= 238)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	2,3	0,0
42 h	1,3	3,3	4,6	1,8
72 h	2,9	4,2	6,5	4,1
96 h	2,9	50,8	10,1	18,9
120 h	3,3	72,5	14,3	35,5
144 h	4,2	75,4	19,8	43,3
168 h	4,2	77,1	28,6	46,1
192 h	4,2	80,4	30,0	49,3
216 h	4,6	85,0	30,9	53,0
240 h	5,8	91,7	31,8	60,8
264 h	6,3	91,7	31,8	63,1
288 h	7,5	92,5	31,8	63,1
TOTAL	7,5	92,5	31,8	63,1

n = número total de larvas expostas.

Tabela 22. Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 5 μ M, sobre imaturos de *Aedes aegypti*, com duração total de 288 horas (doze dias).

COMPOSTO	Término do bioensaio (288 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H ₂ O (n= 240)	88,8	3,8	0,0
5 μ M (n= 238)	58,1	5,1	5,1

n = número total de larvas expostas.

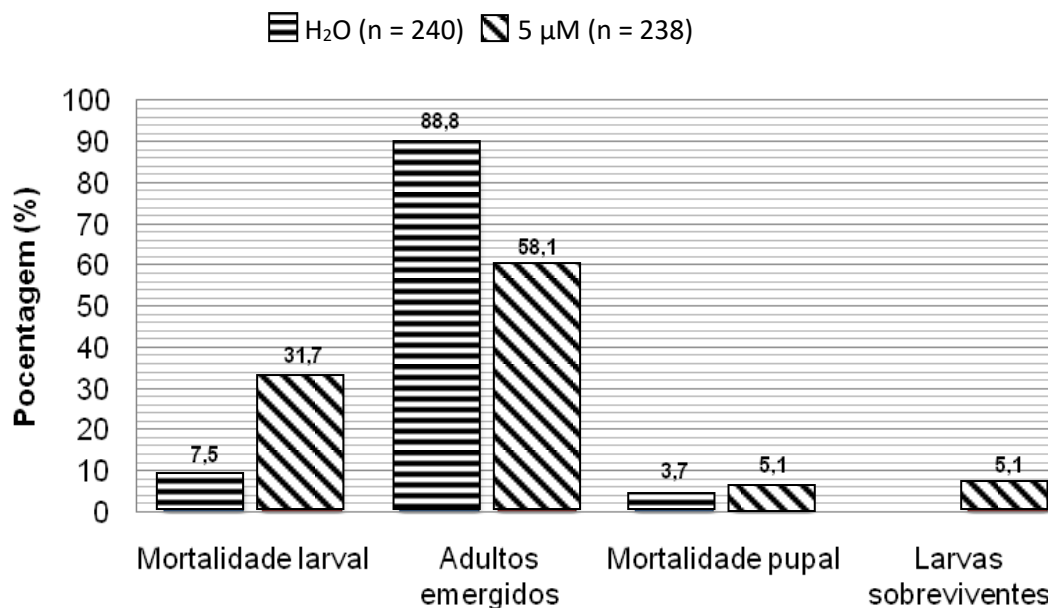


Figura 24. Porcentagem de mortalidade larval, emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7 sobre imaturos de *Aedes aegypti*, nas concentrações de 5 μ M, com duração total de 288 horas (doze dias). (n) = número total de larvas expostas por produto.

Tabela 23. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 1 μ M, sobre imaturos de *Aedes aegypti*, com duração total de 288 horas (doze dias).

HORAS	CONTROLE H ₂ O (n= 240)		1 μ M (n= 240)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	0,0	0,0
42 h	1,3	3,3	0,4	2,5
72 h	2,9	4,2	1,7	6,7
96 h	2,9	50,8	2,1	42,9
120 h	3,3	72,5	2,5	77,1
144 h	4,2	75,4	3,8	80,8
168 h	4,2	77,1	4,6	82,1
192 h	4,2	80,4	5,8	82,9
216 h	4,6	85,0	5,8	86,3
240 h	5,8	91,7	7,5	90
264 h	6,3	91,7	8,3	90,4
288 h	7,5	92,5	8,8	90,8
TOTAL	7,5	92,5	8,8	90,8

n = número total de larvas expostas.

Tabela 24. Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 1 μM , sobre imaturos de *Aedes aegypti*, com duração total de 288 horas (doze dias).

COMPOSTO	Término do bioensaio (288 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H ₂ O (n= 240)	88,8	3,8	0,0
1 μM (n= 240)	89,2	1,7	0,4

n = número total de larvas expostas.

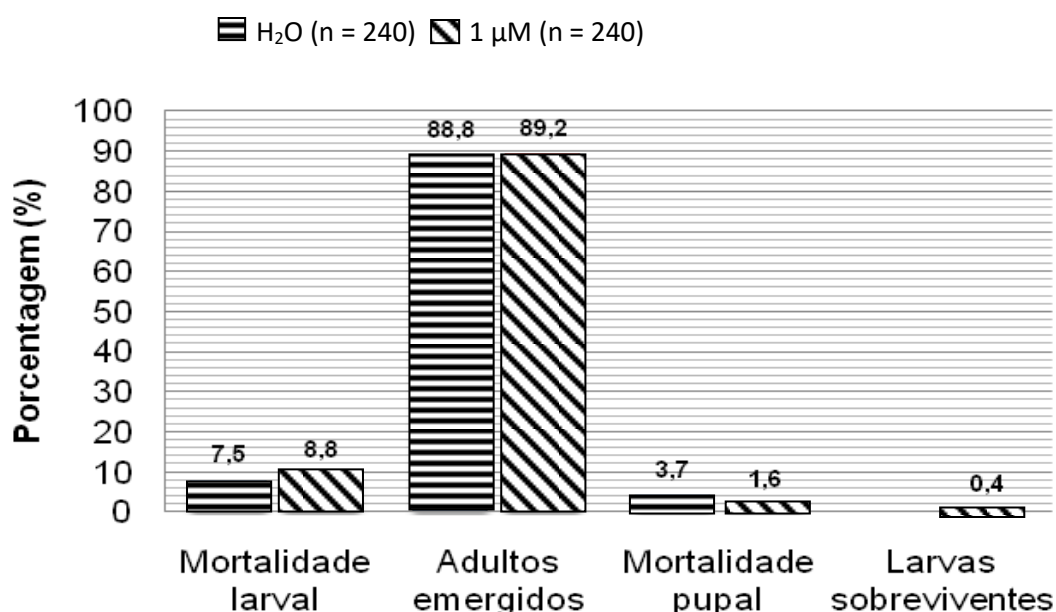


Figura 25. Porcentagem de mortalidade larval, emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observada ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7 sobre imaturos de *Aedes aegypti*, nas concentrações de 1 μM , com duração total de 288 horas (doze dias). (n) = número total de larvas expostas por produto.

4.1.1. Atividade larvicida do composto C7 frente a população silvestre de *Aedes aegypti* de procedência de Foz do Iguaçu (F3).

Bioensaios de efetividade com o composto C7 sobre populações de *A. aegypti* da terceira geração (F3) da população de Foz do Iguaçu apresentou mortalidade de 78,6% na concentração de 40 μM sob condições controladas ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$, umidade $70\% \pm 10$ e fotoperíodo 12:12), com adição de 0,026g de ração a cada 96 horas. Observou-se 0,41% de emergência de adultos para tal concentração (Tabela 25 e Tabela 26, Figura 26).

Tabela 25. Porcentagem de mortalidade larval e formação de pupas representada de forma acumulada observada durante os bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 40 μM , sobre imaturos de *Aedes aegypti* da população de Foz do Iguaçu (F3), com duração total de 192 horas (oito dias), mantido sob condições de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$), umidade ($70\% \pm 10$) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada,

HORAS	CONTROLE H ₂ O (= 238)		CONTROLE DMSO (n= 243)		40 μM (n= 243)	
	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)	M. L. (%)	F. P. (%)
24 h	0,0	0,0	0,0	0,0	5,3	0,0
42 h	0,0	7,1	2,1	4,9	17,3	0,8
72 h	0,0	27,7	3,7	17,7	30,5	0,8
96 h	1,7	76,5	8,6	61,7	43,6	0,8
120 h	2,5	88,2	8,6	77,8	61,3	0,8
144 h	2,5	92,0	8,6	81,1	71,2	0,8
168 h	2,5	92,9	8,6	84,4	77,4	0,8
192 h	2,5	97,5	8,6	85,2	78,6	0,8
TOTAL	2,5	97,5	8,6	85,2	78,6	0,8

n = número total de larvas expostas.

Tabela 26. Porcentagem de emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7, na concentração de 40 μM , sobre imaturos de *Aedes aegypti* da população de Foz do Iguaçu, com duração total de 192 horas (oito dias).

COMPOSTO	Término do bioensaio (192 h)		
	Adultos emergidos (%)	Mortalidade pupal (%)	Larvas sobreviventes (%)
H ₂ O (= 238)	97,5	1,7	0,0
DMSO (n= 243)	85,2	1,6	6,2
40 μM (n= 243)	0,4	0,4	20,6

n = número total de larvas expostas.

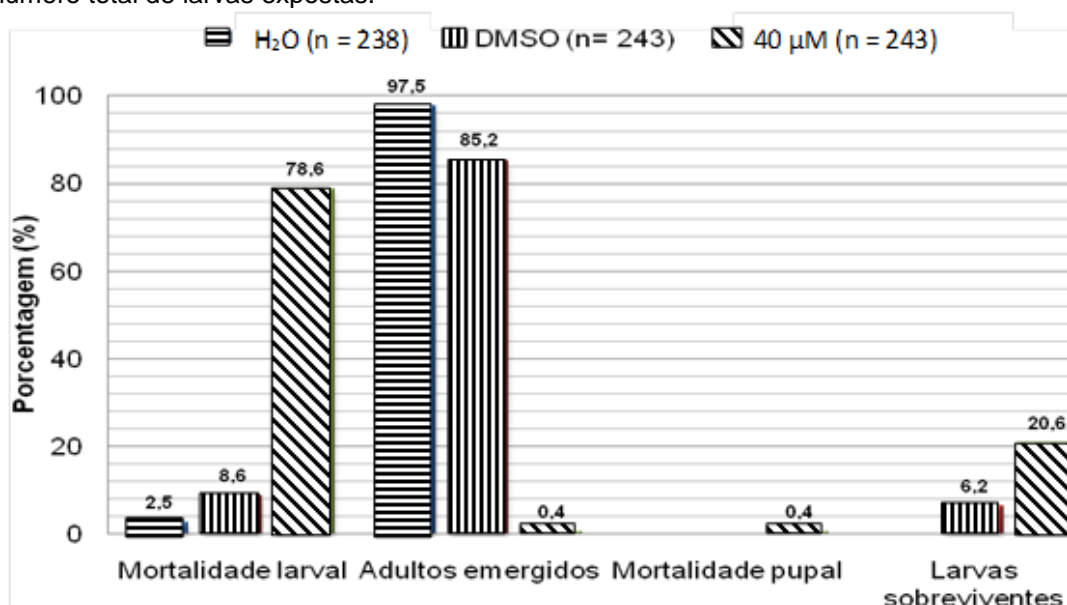


Figura 26. Porcentagem de mortalidade larval, emergência de adultos, mortalidade pupal e larvas sobreviventes observadas ao término dos bioensaios de efetividade realizados para avaliação da atividade larvicida do composto C7 sobre imaturos de *Aedes aegypti* da população de Foz do Iguaçu, na concentração de 40 μM , com duração total de 192 horas (oito dias). (n) = número total de larvas expostas por produto.

4.2 ANÁLISES DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ocimum basilicum*

O óleo essencial de *O. basilicum* foi obtido por hidrodestilação em um rendimento de 0,25% (m/m).

Em um primeiro momento foi feita a análise do óleo para verificar a composição e identificar os principais constituintes. A Figura 27, a seguir, mostra o cromatograma do óleo de *O. basilicum*.

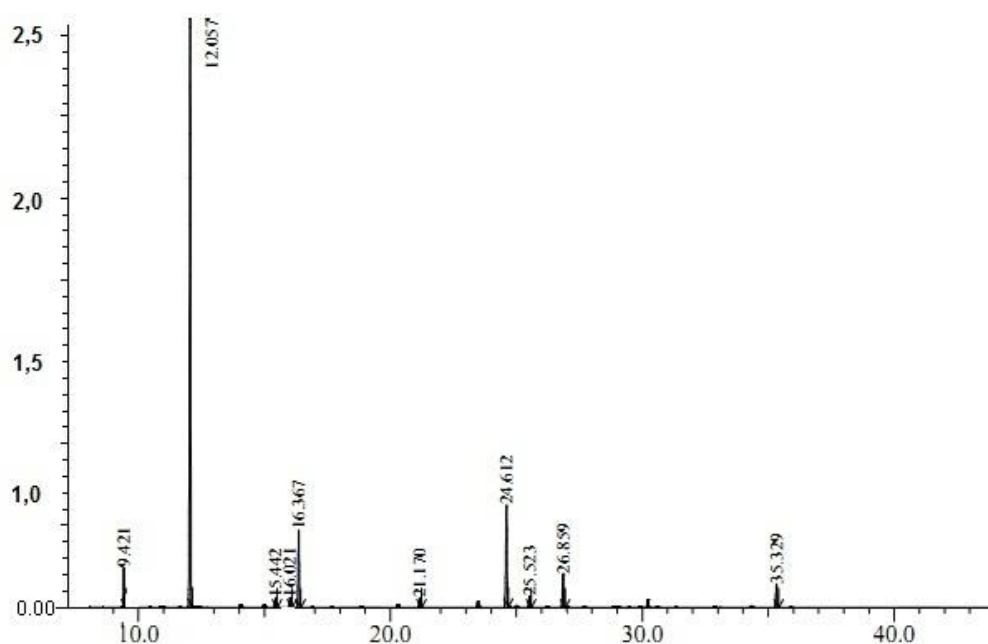


Figura 27. Análise cromatográfica do óleo essencial de *Ocimum basilicum*.

A partir dos tempos de retenção de cada constituinte do óleo, foram calculados seus índices de Kovats e analisados o padrão de fragmentação que os mesmos apresentaram quando submetidos à análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, visando suas determinações estruturais. Foram identificados os compostos que se apresentavam em mais de 1% na mistura. A Tabela 27 mostra os índices calculados e as porcentagens dos principais componentes do óleo.

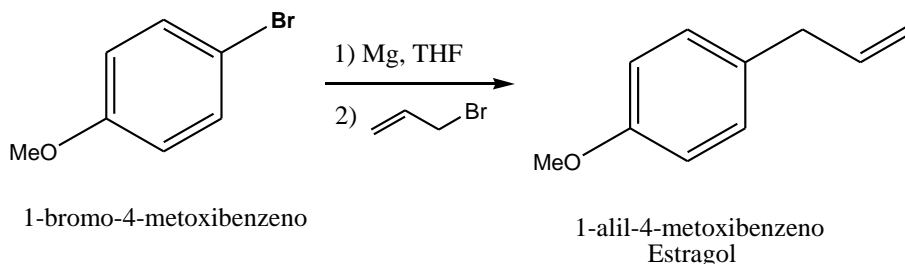
Tabela 27. Principais substâncias identificadas do óleo de *Ocimum basilicum*.

Tempo de retenção	Kovats Calculado	[%]	Compostos
9,421	1031	3,79	Composto 1
12,057	1100	59,13	Composto 2
15,44	1178	1,11	Composto 3
16,02	1191	1,23	Composto 4
16,367	1199	8,17	Composto 5
21,17	1306	1,14	Composto 6
24,612	1384	11,79	Composto 7
26,859	1436	4,11	Composto 8
30,23	1517	1,14	Composto 9
35,33	1644	3,00	Composto 10

Embora a identificação de todos os compostos presentes no óleo tenha sido realizada, neste trabalho os mesmos serão identificados com códigos, tendo em vista que uma patente está em fase de redação. Apenas a identificação do estragol e do linalol serão apresentadas como exemplos.

4.3 SÍNTESE DO ESTRAGOL

Tendo em vista o custo relativamente elevado do estragol, foi planejada a síntese desse composto a partir de materiais de partida disponíveis em nosso laboratório, conforme demonstrado pelo Esquema 2.



Esquema 2. Síntese do estragol.

O estragol foi obtido pela reação do 1-bromo-4-metoxibenzeno com magnésio, gerando assim um intermediário reacional conhecido como reagente de Grignard que,

através de uma reação de substituição nucleofílica de segunda ordem com o brometo de alila, levou à formação do produto desejado em 55% de rendimento, após purificação por coluna cromatográfica.

O produto purificado teve sua estrutura química identificada por cromatografia acoplada à espectrometria de massas, conforme apresentado na Figura 28.

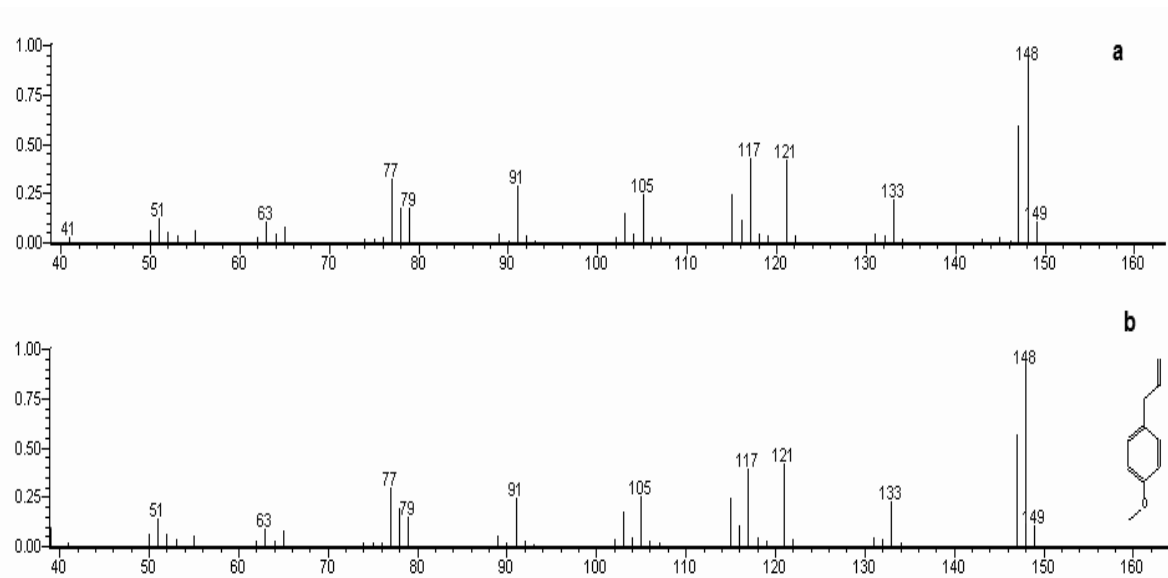


Figura 28. (a) espectro de fragmentação de massas do produto da reação. (b) espectro de fragmentação de massas do estragol obtido na literatura.⁸⁷

O pico base deste espectro é o pico do íon molecular (M^+ , $m/z = 148$ u.m.a.). Percebe-se também a perda do radical metila e metoxila, que originam os picos com m/z 133 e 117 u.m.a., respectivamente. A perda do radical C_2H_3 , referente aos dois carbonos da porção olefínica da cadeia lateral, gera o pico com m/z 121 u.m.a. Pode-se observar o rearranjo e a formação do íon tropílio simples ($C_7H_7^+$) pelo pico m/z 91 u.m.a.

O composto também foi analisado por RMN de 1H (Figura 1Figura 29) e por RMN de ^{13}C (Figura 31). No espectro de RMN de 1H do estragol pode-se destacar a presença de um duplete em δ 3,32 ppm referente ao CH_2 alílico com integral para dois hidrogênios (Figura 30 a), um sinpleto em δ 3,78 ppm correspondente ao grupo metoxila com integral para 3 hidrogênios (Figura 30 b) e os sinais em δ 5,05 ppm e em δ 5,95 ppm que correspondem aos hidrogênios vinílicos (Figura 30 c, d).

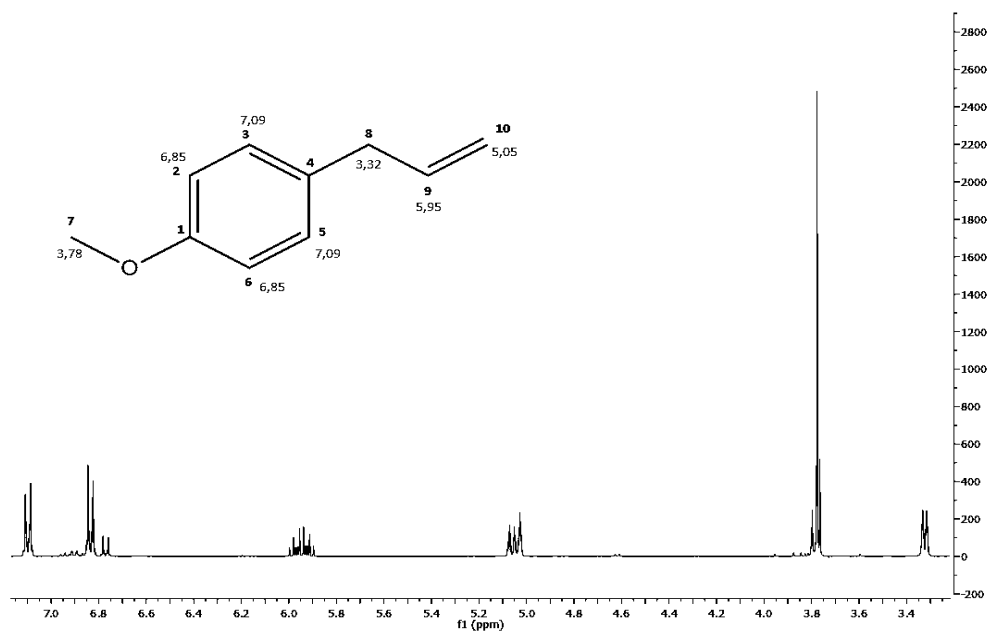


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H do estragol.

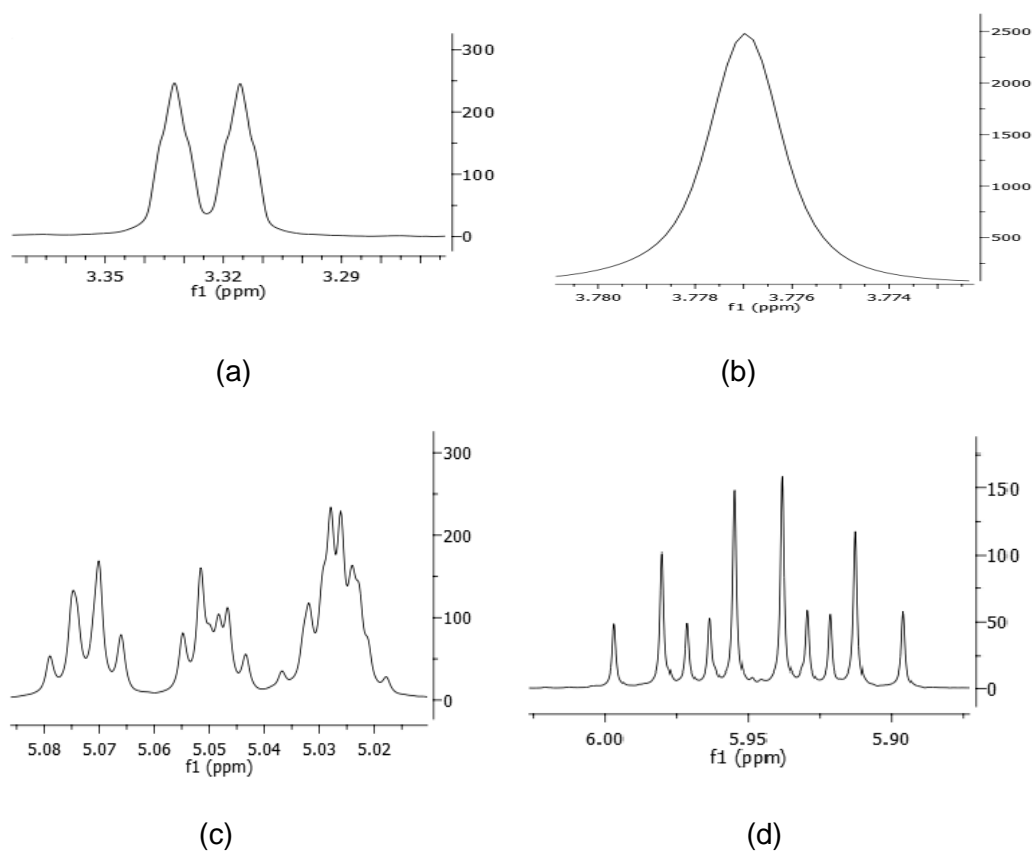


Figura 30. Regiões expandidas do espectro de RMN de ^1H do estragol.

No espectro de RMN de ^{13}C para o estragol pode-se destacar, entre outros, o carbono em δ 55,2 ppm referente a metoxila e os carbonos em δ 158, 133,2, 129,5 e 113,8 ppm atribuídos aos carbonos do anel aromático.

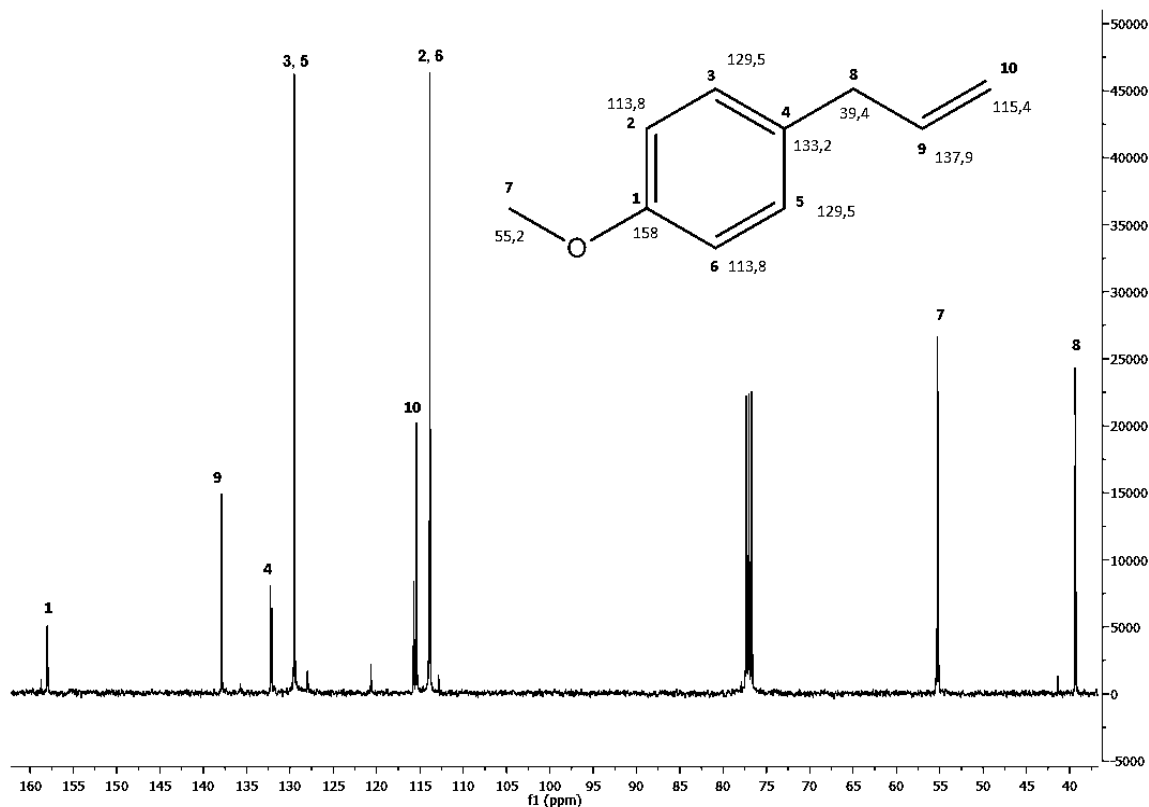


Figura 31. Espectro RMN de ^{13}C estragol.

4.4 TESTES DE REPELÊNCIA COM *Aedes aegypti*

Inicialmente foi realizado um teste preliminar com o óleo de *O. basilicum* e com combinações dos principais componentes do óleo, cinco compostos encontrados acima de 3%, compostos 1, 2, 5, 7 e 8, respeitando as concentrações presentes na composição do óleo, diluídos em 1,5 mL de etanol. Também foi testado o efeito repelente somente para o solvente. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 28.

Tabela 28. Resultados preliminares de repelência com o óleo de *Ocimum basilicum* e com os componentes majoritários do óleo diluídos em etanol a um volume final de 1,5 mL.

	Etanol	<i>O. basilicum</i>	Componentes do óleo
Tempo	24 s	2 min 03 s	2 min 37 s
n de picadas	13	12	1

O óleo de *O. basilicum* apresenta uma maior atividade de repelência quando comparado com o etanol. Os resultados também mostram que os principais componentes do óleo são os responsáveis pela atividade de repelência do mesmo. A partir deste resultado determinou-se a repelência dos cinco principais componentes do óleo, isoladamente (Tabela 29).

Tabela 29. Melhores resultados de repelência para os componentes do óleo em um volume de 100 µL, frente ao mosquito *Aedes aegypti*.

	Composto 2	Composto 7	Composto 5	Composto 1	Composto 8
Tempo	5 min	1 min 40 s	55 s	20 s	50 s
n de picadas	3	6	4	10	15

Outro teste efetuado foi avaliar a repelência da mistura dos componentes principais, sempre retirando o componente que apresentava menor abundância na mistura, ou seja, avaliou-se a repelência dos 5 principais componentes, depois dos quatro, três e dois principais componentes do óleo (Tabela 30). Os testes revelaram que dois componentes, isoladamente, apresentaram maior atividade de repelência, compostos 2 e 7. Os resultados abaixo de 1 minuto foram considerados pouco significativos.

Tabela 30. Repelência dos principais componentes do óleo, frente ao mosquito *Aedes aegypti*.

	5 principais componentes	4 principais componentes	3 principais componentes	2 principais componentes
Tempo	2 min 37 s	4 min 40 s	4 min	5 min
n de picadas	1	2	3	0

Durante os testes observou-se que o composto 2 isoladamente apresentou uma melhor atividade repelente contra o mosquito *A. aegypti* comparado com os demais componentes do óleo. Então foram feitas combinações do composto 2 com os demais componentes isoladamente. Também foram realizados testes variando-se as concentrações dos outros quatro componentes mantendo-se a concentração do composto 2. Nesses testes o tempo de análise passou a ser de 15 minutos. Os resultados estão sumarizados na Tabela 31.

Tabela 31. Tempos de repelência das diferentes combinações feitas com os compostos especificados mais o composto 2, frente ao mosquito *Aedes aegypti*.

Concentração		Tempo 1° picada	Tempo termino	n de picadas
Mantendo a concentração original	Composto 8	2 min 30 s	3 min 10 s	4
	Composto 1	3 min 05 s	5 min 15 s	2
	Composto 5	4 min 45 s	5 min 16 s	2
	Composto 7	12 min 30 s	13 min 45 s	3
Aumentando a Concentração	Composto 8	2 min 24 s	2 min 40 s	4
	Composto 1	6 min 47 s	7 min 15 s	2
	Composto 5	6 min 20 s	6 min 40 s	3
	Composto 7	-----	15 min	0

Duas combinações demonstraram um bom potencial repelente frente ao *A. aegypti*, sendo que para a combinação do composto 2 e 7 em especial, não observou-se picada após 15 minutos de exposição.

Com isso os testes passaram a ser realizados combinando os compostos 2 e 7 variando suas concentrações (Tabela 32).

Tabela 32. Tempos de repelência das diferentes combinações dos dois principais constituintes do óleo, frente ao mosquito *Aedes aegypti*.

Concentração		Tempo 1° picada	Tempo termino	n° de picadas
Compostos 2 e 7	1	12 min 30 s	13 min 45 s	3
Compostos 2 e 7	2	13 min	14 min 39 s	2
Compostos 2 e 7	3	-----	15 min	0

Observou-se que com o aumento das concentrações dos componentes, aumenta-se o efeito de persistência da repelência frente ao *A. aegypti*.

4.5 EFEITO DE REPELÊNCIA DO LINALOL

Um dos componentes do óleo que apresentou melhor eficiência durante os testes foi o linalol. O linalol é classificado como um monoterpene oxigenado e apresenta em sua estrutura química duas insaturações entre átomos de carbono bem como um estereocentro. A Figura 32 apresenta as estruturas do (*R*) e do (*S*)-linalol.

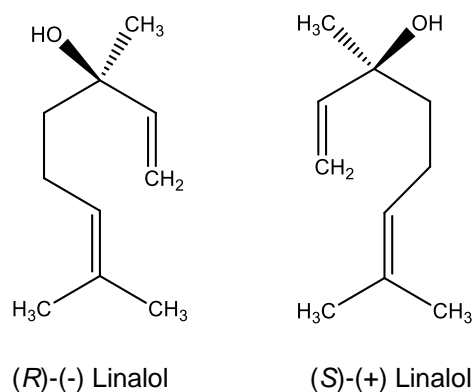


Figura 32. Estruturas do estereoisômeros linalol.

Testes preliminares foram efetuados para se avaliar o efeito de repelência dos estereoisômeros do linalol. O (*R*)-linalol foi adquirido da Sigma Aldrich. Uma mistura dos enantiômeros tendo o (*S*)-linalol como majoritário foi fornecida pelo Dr. Emmanoel Vilaça Costa da Universidade Federal de Sergipe. Essa mistura foi obtida através da extração das folhas, por hidrodestilação, de *Lippia alba* Verbenaceae.⁸⁸

Para verificar as estereoquímicas absolutas dos estereoisômeros do linalol determinou-se o valor de rotação específica de uma solução a 10% (m/v) desses compostos em etanol, cujos valores estão na Tabela 33.

Tabela 33. Valores de rotação específica e de excessos enantioméricos do extrato de *Lippia alba*, do (*R*)-linalol comercial e da mistura racêmica do linalol em solução de etanol (10%, v/v).

Composto	e.e. (%)	[α]_D
mistura tendo (<i>S</i>)- (+)-linalol como majoritário	67,45	+ 14,2°
(<i>R</i>)-(-)-linalol comercial	95	- 20,63°
mistura quase racêmica	2,5	+ 0,527°
(<i>R</i>)-linalol 95% (literatura)		- 20,0°

Percebe-se pelo valor de rotação específica que a mistura contendo os enantiômeros do linalol fornecido pelo Dr. Emmanoel Vilaça Costa tem o enantiômero com configuração (*S*) como majoritário em um excesso enantiomérico aproximado de 67,45%. Também é possível notar que na mistura quase racêmica o enantiômero com configuração (*S*) é majoritário em um excesso de 2,5%.

A mistura quase racêmica do linalol foi analisada via cromatografia gasosa (CG) em coluna quiral (Figura 33). Após várias tentativas de separação do linalol racêmico na coluna utilizada o melhor resultado é apresentado na Figura 33 a, onde percebe-se baixa resolução. Então foi preparada uma mistura com o (*R*)-linalol e a mistura contendo o (*S*)-linalol como majoritário, numa proporção de 2:1, respectivamente (Figura 33 b). Com isso foi possível determinar que o (*R*)-linalol apresenta menor tempo de retenção que seu enantiômero.

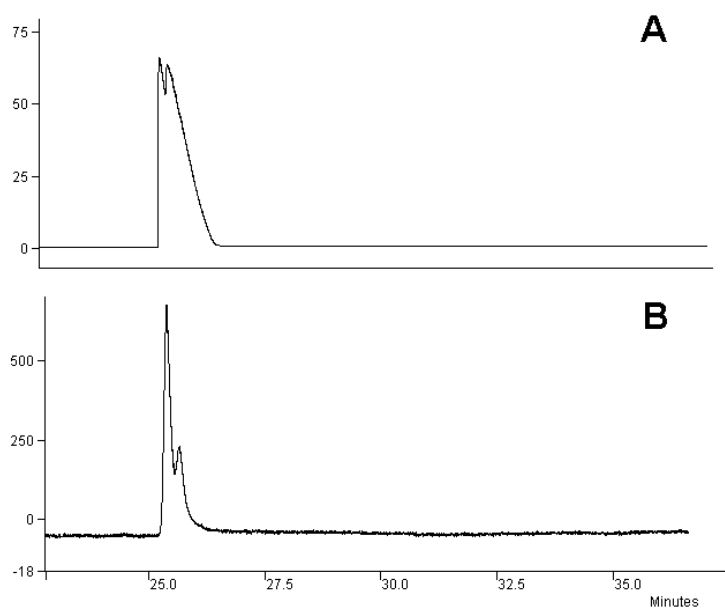


Figura 33. Cromatogramas obtido em cromatógrafo gasoso com coluna quiral CHIRASIL-DEX CB- β -ciclodextrina. (a) linalol quase racêmico; (b) mistura (*R* + *S*)-linalol.

Para confirmar qual dos estereoisômeros é o majoritário no óleo de *O. basilicum* (Figura 34 a) foi injetado juntamente com o óleo o (*R*)-linalol, havendo um aumento na área do pico (Figura 34 b); depois foi injetado o óleo mais o a mistura tendo o (*S*)-linalol como majoritário, aparecendo um pico com maior tempo de retenção (Figura 34 c) e também foi injetado uma mistura do óleo com o linalol quase racêmico, onde houve um aumento na área do pico com menor tempo de retenção bem como o aparecimento do pico com maior tempo de retenção (Figura 34 d).

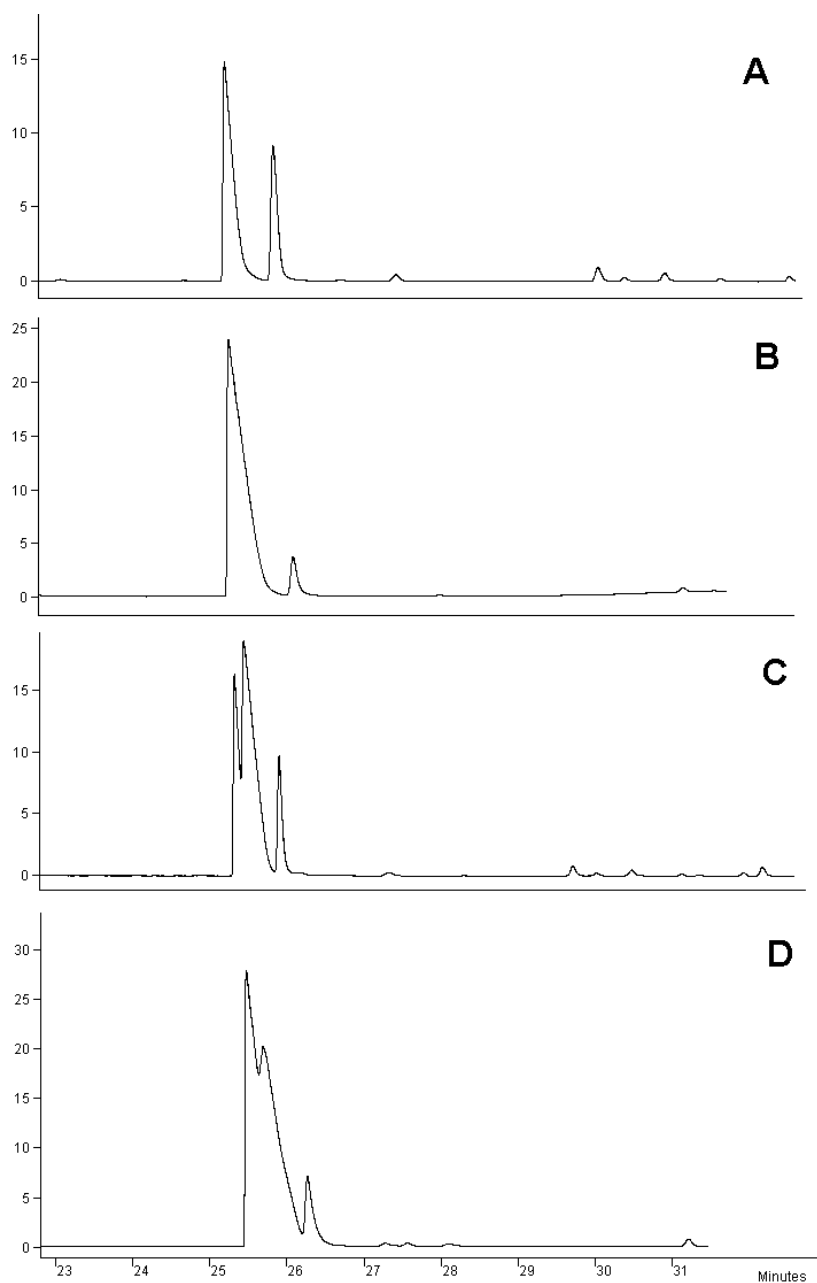
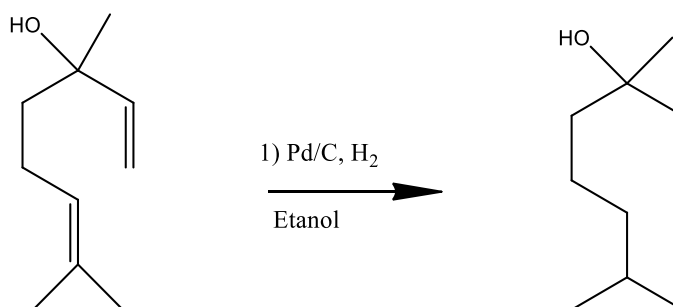


Figura 34. Cromatogramas obtido em cromatógrafo gasoso com coluna quiral CHIRASIL-DEX CB- β -ciclodextrina. (a) óleo de *Ocimum basilicum*; (b); *Ocimum basilicum* + (*R*)-linalol; (c); *Ocimum basilicum* + mistura contendo (*S*)-linalol como majoritário; (d) *Ocimum basilicum* + linalol quase racêmico.

4.6 HIDROGENAÇÃO DO (*R*)-LINALOL.

Tendo em vista o potencial repelente do linalol, foi realizada em nosso laboratório a hidrogenação do mesmo uma vez que está descrito em literatura que o

potencial de causar reações alergênicas é devido à facilidade de oxidação das insaturações presentes nesse composto.⁸⁹



Esquema 3. Hidrogenação do linalol.

Com isso buscou-se preparar um derivado do linalol saturado e avaliar suas propriedades como repelente. Desta forma obteve-se o 3,7 dimetil-octan-3-ol como o produto majoritário ao final da reação, conforme determinado por análise via cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

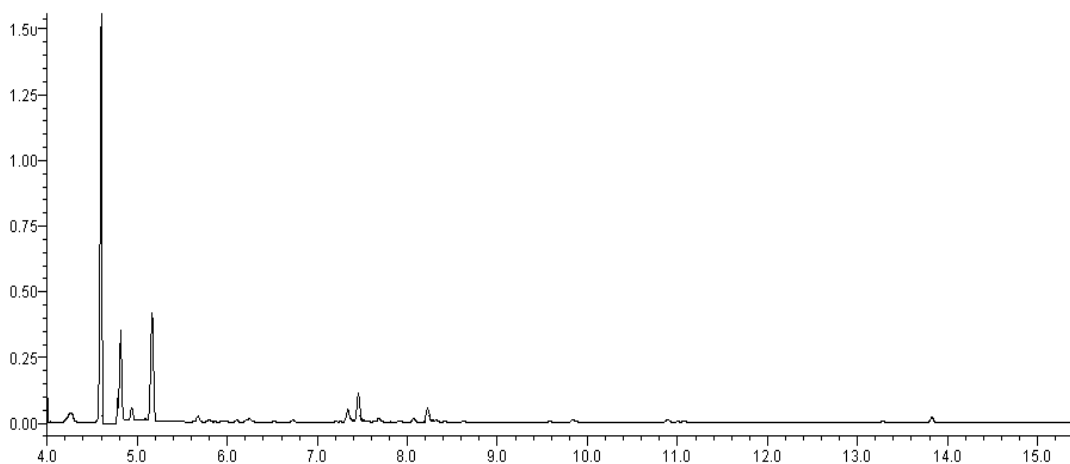


Figura 35. Análise cromatográfica da reação de hidrogenação do linalol.

Os outros dois compostos observados em maiores proporções, além do produto totalmente hidrogenado com tempo de retenção de 4,6 minutos, foram identificados como sendo os produtos monoinsaturados, um com tempo de retenção de 4,8 minutos, provavelmente o que manteve a ligação dupla terminal, e o outro com tempo de retenção de 5,2 minutos. O espectro de massas do composto majoritário é

ilustrado abaixo, bem como o espectro do 3,7 dimetil-octan-3-ol, obtido da base de dados do espectrômetro de massas.

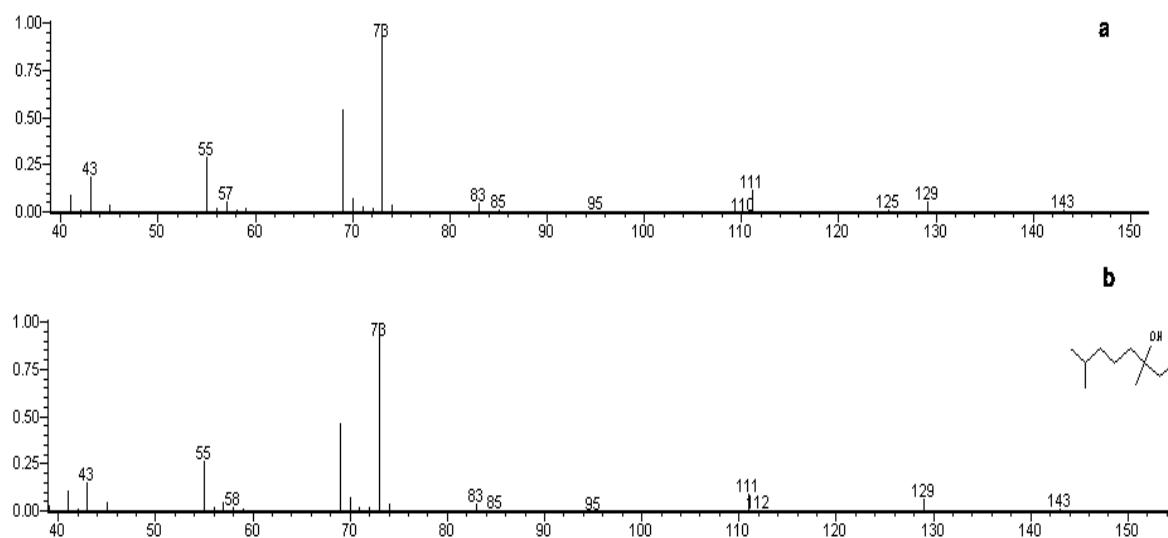


Figura 36. (a) espectro de fragmentação de massas do produto majoritário da reação de hidrogenação do linalol; (b) espectro de fragmentação de massas do 3,7 dimetil-octan-3-ol obtido da literatura.⁸⁷

O pico base deste espectro é o (M^+ , $m/z = 73$ u.m.a.) que corresponde a perda do fragmento C_4H_9O .

A mistura reacional também foi analisada por RMN de 1H (Figura 37) e por RMN ^{13}C (Figura 38). No espectro de RMN de 1H pode-se destacar a presença dos sinais entre δ 0,85 ppm e δ 0,90 ppm referente às metilas conectadas a carbonos que foram hidrogenados (Figura 37 b) uma vez que esses carbonos apresentaram um deslocamento químico de δ 1,59 e δ 1,67 ppm para o linalol (Figura 37 a). Percebe-se os hidrogênios vinílicos presentes em ambos os compostos minoritários monoinsaturados entre δ 5,0 e 5,50 ppm.

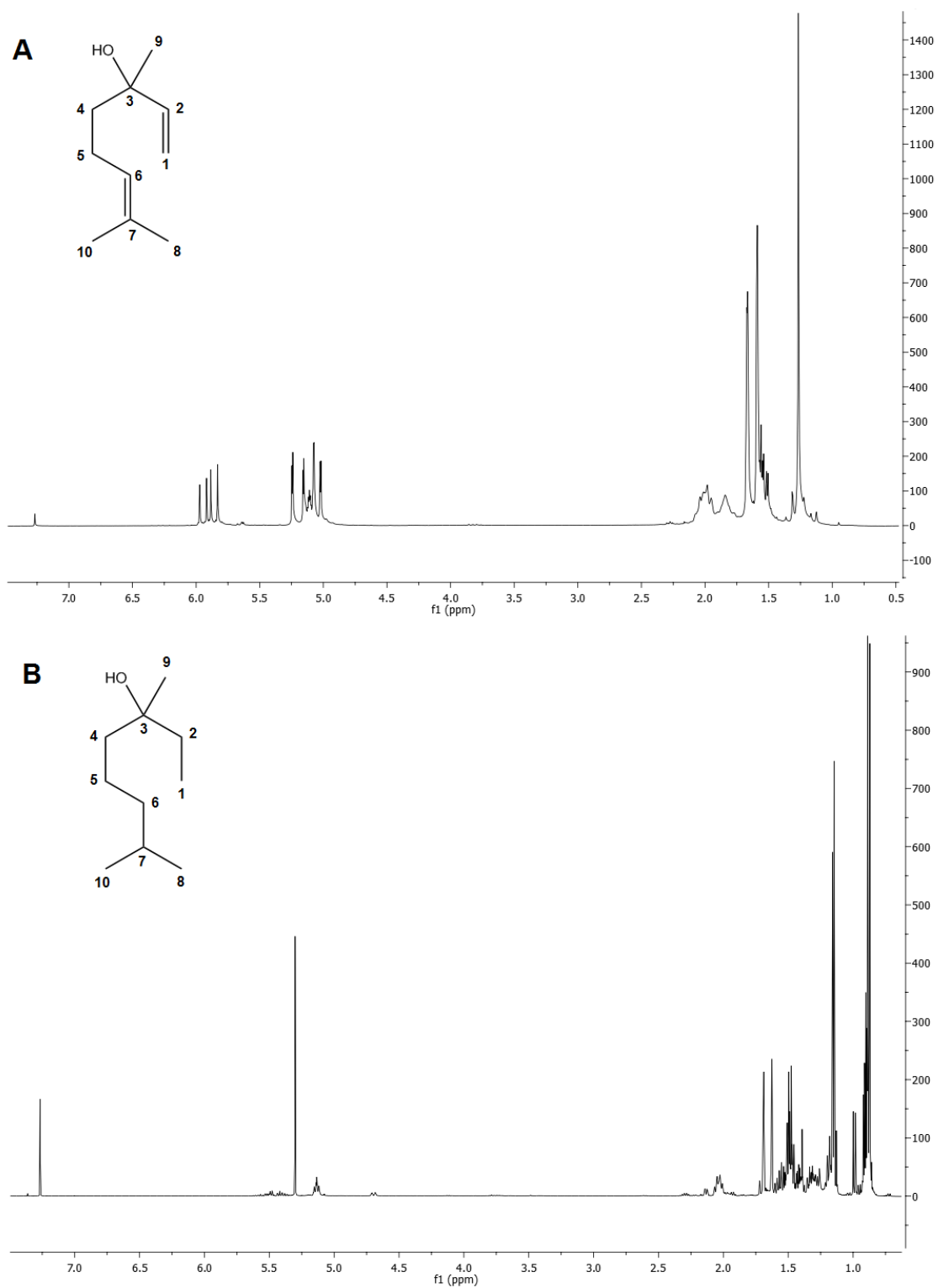


Figura 37. Espectro de RMN de ^1H (a) do linalol (b) da mistura obtida da hidrogenação do linalol.

No espectro de RMN de ^{13}C da mistura pode-se destacar, entre outros, os deslocamentos químicos dos carbonos 1, 2, 6 e 7, que foram hidrogenados, em δ 8,5 ppm; δ 34,3 ppm; δ 41,6 ppm e δ 26,5 ppm, respectivamente. Percebe-se também uma diminuição na intensidade dos sinais referentes aos carbonos vinílicos que no espectro do linalol apareciam acima de 100 ppm.

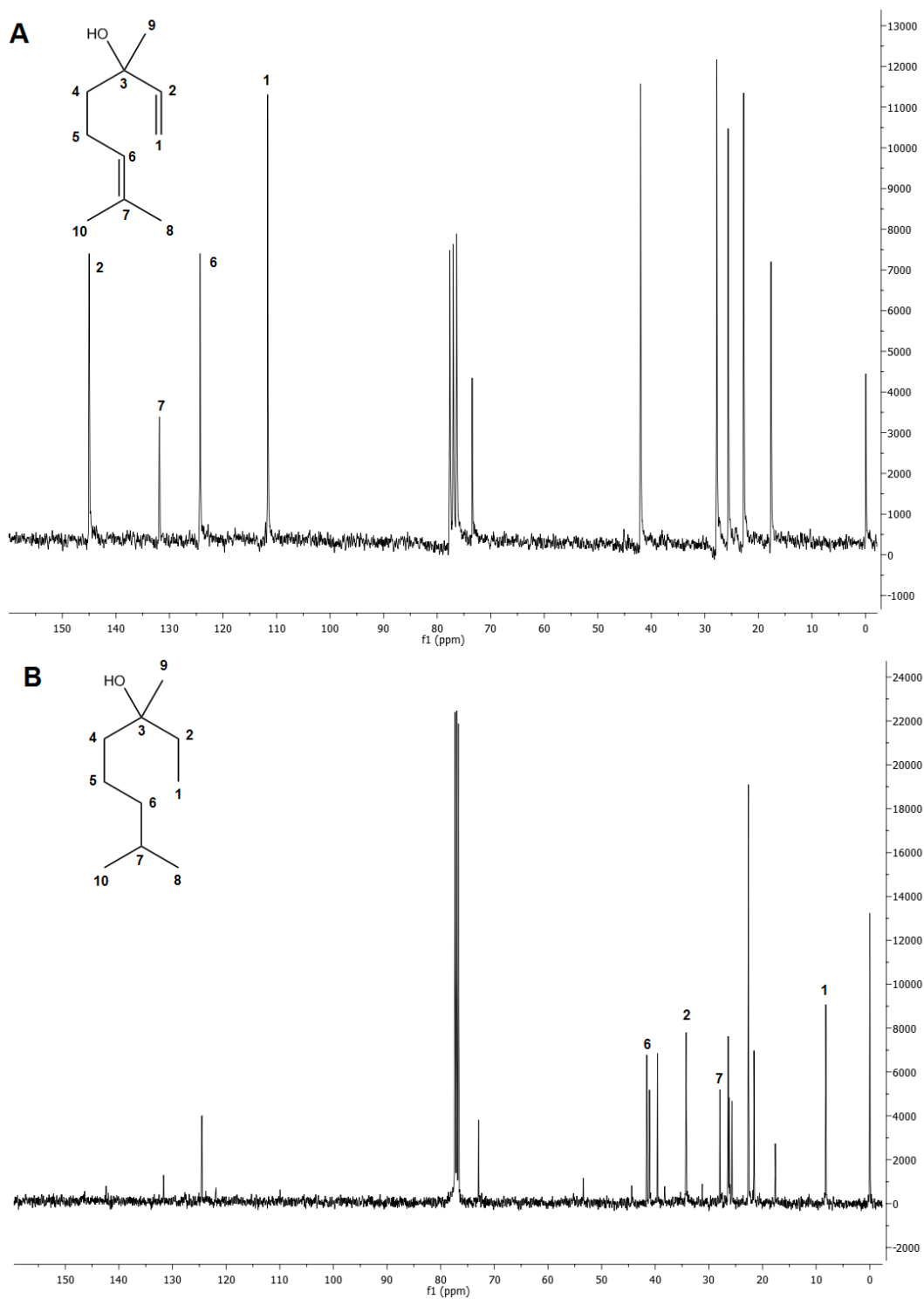


Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C (a) do linalol (b) da mistura obtida da hidrogenação do linalol.

4.7 TESTES DE REPELÊNCIA COM A MISTURA RACÊMICA, COM OS ESTEREOISÔMEROS DO LINANOL E COM A MISTURA CONTENDO O LINALOL HIDROGENADO COMO MAJORITÁRIO.

Tendo em vista que a atividade biológica de um composto pode estar relacionada com a estereoquímica, testes foram iniciados para se avaliar o efeito da estereoquímica do linalol em sua atividade de repelência. Utilizou-se também a mistura obtida da reação de hidrogenação do linalol nesses testes uma vez que está relatado na literatura que o linalol pode causar reações alergênicas quando aplicado diretamente sobre a pele de humanos principalmente devido aos produtos de oxidação de suas insaturações.⁸⁹ É importante ressaltar que a reação de hidrogenação não se completou e a utilização da mistura nesses testes iniciais, que tinha o produto hidrogenado como majoritário, serviria para indicar uma tendência de repelência para o composto hidrogenado.

Foram realizados testes de repelência com os componentes separadamente seguindo a mesma metodologia dos testes anteriores. A Tabela 34 apresenta os resultados obtidos durante os testes.

Tabela 34. Resultados dos testes de repelência de soluções etanólicas (1,5 mL volume final) dos estereoisômeros e da mistura racêmica do linalol bem como da mistura reacional obtida na hidrogenação do linalol.

	Quantidade	Tempo 1° picada	Término teste	n° de picadas
(R)-(-)-linalol	100 µL	6 min 49 s	8 min 30 s	3
(S)-(+)-linalol	100 µL	6 min 30 s	7 min	3
linalol racêmico	100 µL	10 min 30 s	11 min	2
mistura da reação de hidrogenação do linalol	100 µL	7 min	7 min 30 s	4

Os resultados indicam que ambos os estereoisômeros do linalol, nos excessos testados, apresentaram atividades de repelência similares e comparáveis ao da

mistura obtida durante a hidrogenação do (*R*)-linalol. A mistura racêmica apresentou o melhor resultado de repelência.

4.8 TESTES INSETICIDAS

Tendo em vista que durante alguns testes visando avaliar a atividade de repelência dos compostos isolados de *O. basilicum* foi observada uma inesperada mortalidade dos mosquitos adultos em uma determinada massa e relação entre os compostos empregados, resolveu-se investigar o efeito causado variando-se a proporção destes compostos na mistura, bem como a massa total dos compostos empregados. **A identidade química dos compostos bem como a proporção entre os eles estão sendo preservadas, pois uma patente está sendo redigida com os resultados deste experimento, envolvendo o desenvolvimento de um provável novo adulticida para o mosquito *A. aegypti*.**

Tabela 35. Testes de repelência com combinações dos compostos variando a proporção e/ou a quantidade.

		Massa total	Tempo 1° picada	Tempo término	n° de picadas
1	Combinação de compostos variando a proporção	100 mg da mistura	11 min	13 min	2
2	Combinação de compostos variando a proporção	150 mg da mistura	-----	15 min	0
3	Combinação de compostos variando a proporção	200 mg da mistura	-----	15 min	0
4	Combinação de compostos variando a proporção	270 mg da mistura	-----	15 min	0
5	Combinação de compostos variando a proporção	360 mg da mistura	-----	15 min	0
6	Combinação de compostos responsável pelo efeito adulticida	219 mg da mistura	-----	15 min	0

Para as entradas 1 a 5 da Tabela 35, observou-se que embora as soluções apresentassem efeito de repelência, não foi observada mortalidade ou perda de atividade dos mosquitos que pudesse levar à mortalidade. Apenas para entrada 6, além do efeito de repelência, observou-se uma perda de atividade dos mosquitos, com consequente morte dos mesmos nos 15 minutos de experimento.

Vale a pena ressaltar que nas entradas 4 e 5 da Tabela 35, foi mantida a quantidade em massa do majoritário e usadas quantidades maiores dos compostos minoritários do que as usadas na entrada 6 e, mesmo assim, não foi observado o efeito adulticida, evidenciando que para que o efeito adulticida seja

observado é necessário que os compostos mantenham uma determinada relação.

Tendo em vista que o linalol é um dos componentes da mistura que apresentou atividade adulticida, experimentos foram efetuados para se determinar o papel da estereoquímica no efeito de mortalidade. Esses testes revelaram que quando o (*R*)-linalol, identificado no extrato de *O. basilicum*, foi empregado na mistura, a atividade de mortalidade foi mais pronunciada do que quando se utilizou a mistura racêmica.

5. CONCLUSÃO

Os resultados permitiram identificar um novo composto sintético com forte ação larvicida frente a *A. aegypti*. Esse resultado abre boas perspectivas visando o desenvolvimento de novos larvicidas, pois se trata de composto foto e termoestável, de custo competitivo com os custos dos produtos comerciais usados para tal finalidade e de baixa toxicidade ao ser humano.

Os resultados obtidos com óleo essencial de *O. basilicum* permitiram identificar quais componentes são responsáveis pelo efeito de repelência frente ao mosquito *A. aegypti*.

Vale a pena ressaltar que uma combinação de componentes deste óleo apresentou forte ação adulticida e pode permitir também o desenvolvimento de um novo adulticida para o *A. aegypti* baseado em produtos naturais de baixa toxicidade ao ser humano.

6. PERSPECTIVAS

- Estudo do mecanismo de ação do complexo com ação larvicida.
- Sintetizar outros complexos, baseados nos mecanismos de ação, e determinar suas atividades visando potencializar a ação larvicida.
- Emprego do composto com ação larvicida para o controle de outras pragas florestais e agrícolas, tendo em vista que resultados promissores já estão sendo obtidos em estudos preliminares.
- Estudos visando determinar a aplicabilidade da mistura dos compostos naturais identificados do óleo essencial de *O. basilicum* para o desenvolvimento de um novo adulticida frente a *A. aegypti*.
- Estudo do mecanismo de ação da mistura de produtos naturais com efeito adulticida.
- Utilização da mistura de produtos naturais com efeito adulticida para o controle de outras pragas tendo em vista os resultados promissores observados em estudos preliminares.

7. REFERÊNCIAS

1. Vanwambeke, S. O.; Benthem, B. H. V.; Khantikul, N., Burghoorn-Maas, C.; Panart, K.; Oskam, L.; Lambin, E. F.; Somboon, P.; (2006) Multilevel analyses of spatial and temporal determinants for dengue infection. **International Journal of Health Geographics**. 5, 5 - 27.
2. Who; (1997) Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnostic, Treatment, Prevention and Control, 2 ed.
3. Bangs, M. J.; Tan, R.; Listiyaningsih, E.; Kay, B. H.; Porter, K.R.; (2001) Detection of Dengue Viral RNA in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Exposed to Sticky Lures Using Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction. **Journal of Medical Entomology**. 38, 720 - 724.
4. MS/SVS; (2004) Doenças Infecciosas e Parasitárias. In: Dengue. Brasília, 3 ed., v. 1.
5. Malavige, G. N.; Fernando, S.; Fernando, D. J.; Seneviratne, S. L.; (2004) Dengue viral infections. **Postgraduate Medical Journal**. 80, 588 - 601.
6. Thatheyus, J. A.; (2007) Bio control of mosquitoes In: Defeating the public enemy, the mosquito: a real challenge. **Loyola College Chennai**. 76 – 94.
7. Penido, C.; Costa, K. A.; Pennaforte, R. J.; Costa, M. F. S.; Pereira, J. F. G.; Siani, A. C.; Henriques, M. G. M. O.; (2005) Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapaguianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. **Inflammation Research**. 54, 295 - 303.
8. Schmutterer, H.; (1990) Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**. 35, 271-297.
9. Sukamar, K.; Perich, M. J.; Boobar, L. R.; (1991) Botanical derivatives in mosquito control: a review. **Journal of the American Mosquito Control Association**. 7, 210 - 237.
10. Mendonça, F. A.; Silva, K. F.; Santos, K. K.; Ribeiro, K. A. Jr.; Sant' Ana, A. E.; (2005) Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**. 76, 629 - 636.
11. Amer, A.; Mehlhorn, H.; (2006) Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). **Parasitology Research**. 99, 466 - 472.

12. Champakaew, D.; Choochote, W.; Pongpaibul, Y.; Chaithong, U.; Jitpakdi, A.; Tuetun, B. O.; Pitasawat, B.; (2007) Larvicidal efficacy and biological stability of a botanical natural product, zedoary oil-impregnated sand granules, against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Parasitology Research**. 100, 729 - 737.
13. Gleiser, R. M.; Zygadlo, J. A.; (2007) Insecticidal properties of essential oils from *Lippiaturbinata* and *Lippiapolystachya* (Verbenaceae) against *Culexquinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**. 101, 1349 - 1354.
14. Cheng, S. S.; Huang, C. G.; Chen, Y. J.; Yu, J. J.; Chen, W. J.; Chang, S. T.; (2008). Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. **Bioresource Technology**. 1, 452-456.
15. Geris, R.; Silva, I. G.; Silva, H. H.; Barison, A.; Rodrigues-Filho, E.; Ferreira, A. G.; (2008) Diterpenoids from *Copaiferareticulata*Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 50, 25 - 28.
16. Mullai, K.; Jebanesan, A.; Pushpanathan, T.; (2008) Effect of bioactive fractions of *Citrullusvulgaris*Schrad.leaf extract against *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**. 102, 951 - 955.
17. Pavela, R.; (2008) Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culexquinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**. 102, 555 - 559.
18. Pushpanathan, T.; Jebanesan, A.; Govindarajan, M.; (2008) The essential oil of *Zingiber officinalis* Linn (Zingiberaceae) as a mosquito larvicidal and repellent agent against the filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**. 102, 1289 - 1291.
19. Rahuman, A. A.; Gopalakrishnan, G.; Venkatesan, P.; Geetha, K.; (2008). Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against.
20. Barreto, C. F.; (2005) *Aedes aegypti* – Resistencia aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. **Revista eletrônica da faculdade montes belos Goias**. 1, 62 - 73.
21. Furtado R. F.; Lima, M. G. A.; Andrade M. N.; Bezerra, J. N. S.; Silva M. G. V.; (2005) Atividades Larvicidas de óleos essências contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**. 34, 843 - 847.

22. Cantino, P. D.; (1992) Evidence for a polyphyletic origin of Labiatae. **Missouri Botanical Garden Press**. 79, 361 - 379.
23. Almeida, C. F. C. B. R.; Albuquerque, U. P.; (2002) Check-list of the family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 45, 343 - 353.
24. Almeida, O. S.; Silva, A. H. B.; Silva, A. B.; Silva, A. B.; Amaral, C. L. F.; (2004) Estudo da biologia floral e mecanismos reprodutivos do alfavacão (*Ocimum officinalis* L.) visando o melhoramento genético. Acta Scientiarum. **Biological Sciences**. 26, 343 - 348.
25. Mazutti, M.; Beledelli, A. J. M.; Cansian R. L.; Oliveira, C. D. J. V.; Paroul, N.; (2006). Caracterização química de extratos de *Ocimum basilicum* L. obtidos através de extração com CO₂ a altas pressões. **Química Nova**. 29, 1198 -1202.
26. Chauhan, K. R.; Klun, J. A.; Debboun, M.; Kramerf, M.; (2005) Feeding Deterrent Effects of Catnip Oil Components Compared with Two Synthetic Amides Against *Aedes aegypti*. **Journal of Medical Entomology** 42, 643-646.
27. Webb, C. E.; Russell, R. C.; (2007) Is The Extract From The Plant Catmint (*Nepeta Cataria*) Repellent To Mosquitoes In Australia? **Journal of the American Mosquito Control Association**. 23, 351 – 354.
28. Trongtokit, Y.; Rongsriyam, Y.; Komalamisra, N.; Apiwathnasorn, C.; (2005) Comparative Repellency of 38 Essential Oils against Mosquito Bites. **Phytotherapy Research**. 19, 303 - 309.
29. Prajapati, V.; Tripathi, A. K.; Aggarwal, K. K.; Khanuja, S. P. S.; (2005) Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Bioresource Technology**. 96, 1749 – 1757.
30. Thavara, U.; Wongsinkongman, P.; Bansidhi, J.; Boonruad, T.; Chavalittumrong, P.; Soonthornchareonnon, N.; Komalamisra, N.; Mulla, M. S.; (2006) Repellency Of Essential Oils Extracted From Plants In Thailand Against Four Mosquito Vectors (Diptera: Culicidae) And Oviposition Deterrent Effects Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**. 37, 915 - 931.
31. Amer, A.; Mehlhorn, H.; (2006) Repellency effect of forty-one essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes. **Parasitol Research**. 99, 478 – 490.

32. Maia, M. F.; Moore, S. J.; (2011) Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. **Malaria Journal**. 10, 1 - 15.
33. Kardinan, A.; (2007) Potensi Selasih Sebagai Repellent Terhadap Nyamuk *Aedes aegypti*. **Jurnal Littri**. 13, 39 - 42.
34. Dekker, T.; Ignell, R.; Ghebru, M.; Glinwood, R.; Hopkins, R.; (2011) Identification of mosquito repellent odours from *Ocimum forskolei*. **Parasites e Vectores**. 4, 183 - 190.
35. Van De Braak, S. A. A. J.; Leijten, G. C. J. J.; (1999) Essential oils and oleoresins: a survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. **CBI, Centre for the promotion of imports from developing countries**. Rotterdam, 116 - 119.
36. Saxena, R. C.; Arnason, J. T.; Philogene, B. J. R.; Morand, P.; (1989) Insecticides of plant origin. **American Chemical Society**. 9, 110 - 135.
37. Moyler, D. A.; (1998) CO₂ Extraction and other new technologies: an update on commercial adoption. International Federation of Essential Oils and Aroma Trades-21st International Conference on Essential Oils and Aromas. **IFEAT, London**, 33-39.
38. Simões, C. M. O. et al.; (2003) Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 5^a ed. Porto Alegre: Universidade, 1102.
39. Senatore, F.; (1996) Influence Of Harvesting Time on Yield And Composition Of the Essential Oil of A Thyme (*Thymus pulegioides*) Growing Wild In Campania (Southern Italy). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 44, 1327 - 1332.
40. Cong, Y.; Abulizi, P.; Zhi, L.; Wang, X.; Mirenska.; (2008) Chemical Composition Of The Essential Oil Of *Lavandula Angustifolia* From Xinjiang, China. **Chemistry of Natural Compounds**. 44, 810.
41. Verma, R. S.; Rahman, L. ; Verma, R. K.; Chauhan, A.; Yadav, A. K.; Singh, A.; (2010) Essential Oil Composition of Menthol Mint (*Mentha arvensis*) and Peppermint (*Mentha piperita*) Cultivars at Different Stages of Plant Growth from Kumaon Region of Western Himalaya. **Journal of Medicinal and Aromatic Plants**. 1, 13 - 18.
42. Pitarokili, D.; Couladis, M.; Petsikos-Panayotarou, N.; Tzakou, O.; (2002) Composition and Antifungal Activity on Soil-Borne Pathogens of the Essential

- Oil of *Salvia sclarea* from Greece. **Journal Agricultural Food and Chemistry**. 50, 6688 – 6691.
43. Soković, M. D.; Vukojević, J.; Marin, P. D.; Brkić, D. D.; Vajs, V.; Van Griensven, L. J. L. D.; (2009) Chemical Composition of Essential Oils of Thymus and Mentha Species and Their Antifungal Activities. **Molecules**. 14, 238-249.
 44. Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Shafi, M. P.; Kaniampady, M. M.; (2003) Chemotaxonomical Analysis Of The Essential Oil Aroma Compounds of Four Different Ocimum Species From Southern India. **European Food Research and Technology**. 217, 120 - 124.
 45. DELAY, C. E.; (2007) Estudo da Comunicação Química, Acústica-Vibracional e da Eficiência de Pesticidas e de Repelentes Visando o Controle Populacional da Aranha-Marrom *Loxosceles intermédia*. **Tese de Doutorado em Química, Curso de Pós Graduação em Química, Área de Concentração em Química Orgânica, Setor de Ciências Exatas**, Curitiba - PR.
 46. Kascheres C.; e CUNHA, I. B. S.; (1988) Piretroides como uma classe de inseticidas. Aplicação, desenvolvimento químico e perspectivas. **Química Nova**. 12, 272 - 281.
 47. Elliot, M. (1979) Progress in the design of insecticides. **Chemical Industries**. 17, 757 - 769.
 48. Sawicki, R. M.; (1962) Insecticidal activity of pyrethrum extract and its four insecticidal constituents against house flies. Knock-down and recovery of flies treated with pyrethrum extract with and without piperonyl butoxide. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 13, 283 - 292.
 49. Barlow, F.; Elliot, M.; Farnham, A. W.; Hadaway, A. B.; Janes, N. F.; Needham, P. H.; Wicham, J. C.; (1971) Insecticidal activity of the pyrethrins and related compounds. Essential features for insecticidal activity in chrysanthemates and related cyclopropane esters. **Pesticide Science**. 2, 115 - 118.
 50. Briggs, G. G.; Elliot, M.; Farnham, A. W.; Janes, N. F.; (1974) Structural aspects of the knockdown of pyrethroid. **Pesticide Science**. 5, 643 - 649.
 51. Briggs, G. G.; Elliot, M.; Farnham, A. W.; Janes, N. F.; Needham, P. H.; Pulman, D. A.; Young, S. R.; (1976) Insecticidal activity of the pyrethrins and related compounds VIII. Relation of polarity with activity in pyrethroids. **Pesticide Science**. 7, 236 - 240.

52. Aiub, C. A. F.; (2002) Avaliação genotóxica dos pesticidas organofosforados temphos. **Genetics and Molecular Research**. 1, 159 - 166.
53. INSTRUÇÕES Pessoal de Combate Vetor: Manual de Normas Técnicas. 2.e. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Plano Diretor de Erradicação do *Aedes aegypti* do Brasil, FUNASA, Brasília, DF, Brasil. (1998).
54. Braga, I. A.; (2007) *Aedes aegypti*: Insecticides, Mechanisms of Action and Resistance Epidemiol. **Serviço Saúde**. 16, 279 - 293.
55. Oliveira, B. R.; (2008) Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapaguianesis* e *Copaifera sp.* E estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti*. Tese (Mestrado em Ciências farmacêuticas) – Departamento Farmácia, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto.
56. Nuchuchua, O.; Sakulku, U.; Uawongyart, N.; (2009) In Vitro Characterization and Mosquito (*Aedes aegypti*) Repellent Activity of Essential-Oils-Loaded Nanoemulsions. **Pharmaceutical Science Technology**. 10, 1234 - 1242.
57. Paula, J. P.; (2002) Estudo da Ação Repelente do Óleo Essencial de *Ocimum selloi benth* Contra o *Anopheles braziliensis* Chagas. **Tese (Mestrado em Saude Pública) Universidade Estadual de Ponta Grossa**, Ponta grossa - PR.
58. Tawatsin, A.; Wratten, S. D.; Scott, R. R.; Thavara, U.; Techadamrongsin, Y.; (2001) Repelência de óleos voláteis de plantas contra três mosquitos vetores. **Journal of Vector Ecology**. 26, 76 - 82.
59. Waliwitiya, R.; Isman, M. B.; Vernon, R. S.; Riseman, A.; (2005) Insecticidal Activity of Selected Monoterpenoids and Rosemary Oil to *Agriotesobscurus* (Coleoptera: Elateridae). **Journal of Economic Entomology**. 98, 1560 - 1565.
60. Solomons, T. W. G.; (1996) Organic chemistry, New York: John Wiley & Sons.
61. Perich, M. J.; Wells C.; Bertsch, W.; Tredway, K. E.; (1994) Toxicity of extracts from three *Tagetes* against adult and larvae of yellow fever mosquito and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**. 31, 833 – 837.
62. Shaalan, E. A. S.; Canyon, D.; Younes, M. W. F.; Abdel-Wahab, H.; Mansour, A. B.; (2005) A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environment International**. 31, 1149 – 1166.
63. Millar, J. G.; Sims, J. J.; (1998) Preparation, cleanup, and preliminary fractionation of extracts. **Methods in chemical ecology**. 1.

64. Wendler, E. P.; (2006) Síntese e Avaliação de Infoquímicos de *Biabrotica spp.* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR.**
65. Casy, A. F.; Dewar, G. H.; The Steric Factor in Medicinal Chemistry. **Disymmetric Probes of Pharmacological Receptors.** Plenum Press, **New York**, 1993.
66. Van Ree, J.; Ariens, E. J.; (1982) M. Stereochemistry and Biological Activity of Drugs; Stereoselectivity of Bioactive Agents: General Aspects; Backwell, **Oxford.**
67. Stymiest, J. L.; Bagutski, V.; French, R. M.; Aggarwal, V. K.; (2008) Enantiodivergent Conversion of Chiral Secondary Alcohols into Tertiary Alcohols, **Nature.** 456, 778 - 782.
68. Weickgenannt, A.; Mewald, M.; Oestreich, M.; (2010) Asymmetric Si–O Coupling of Alcohols. **Organic & Biomolecular Chemistry.** 8, 1479 - 1504.
69. WU, X.; XIAO, J.; (2007) Aqueous-Phase Asymmetric Transfer Hydrogenation of Ketones – A Greener Approach to Chiral Alcohols, **Chemical Communications.** 2449 - 2466.
70. Teichert, J. F.; Feringa, B. L.; (2010) Phosphoramidites: Privileged Ligands in Asymmetric Catalysis, **Angewandte Chemie International Edition.** 49, 2486-2528.
71. Pinheiro, S.; Ferreira, V. F.; (1998) Abordagens Em Síntese Assimétrica. **Química Nova.** 21, 312 - 318.
72. Testa, B. (1990) Definitions and concepts in biochirality. B. Holmstedt H. Frank B. **Testa Chirality and biological activity.** 4, 15 – 32.
73. Müller, M. D.; Buser, H. R.; (1995) Environmental Behavior of Acetamide Pesticide Stereoisomers. 2. Stereo and Enantioselective Degradation in Sewage Sludge and Soil. *Environmental Science Technology.* 29, 2031 – 2037.
74. Schmidt, W. F.; Honigberg, I. L.; (1991) Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopic investigation of interaction energies of ephedrine stereoisomers in noncrystalline solids and its correlation with thermodynamic data. **Pharmaceutical Research.** 8, 1128 – 1136.
75. Schmidt, W. F.; Porter, W.; Carstensen, J. T.; (1988) Thermodynamics in the prediction of the solubilities of binary mixtures of the diastereoisomers and enantiomers of ephedrine. **Pharmaceutical Research.** 5, 391 – 395.

76. Jayasundera, S.; Schmidt, W. F.; Hapeman, C. J.; Torrents, A.; (1999) Influence of the chemical environment on metolachlor conformations. **Journal Agricola Food Chemical**. 47, 4435 – 4442.
77. Eliel, E. L.; Wilen, S. H.; Stereochemistry of Organic Compounds, New York, **John Wiley**, 1994.
78. Madesclaire, M.; Stéréoisomérisation Généralités et incidences en chimie thérapeutique, **Paris Ellipses**, 1987.
79. Fassihi, A. R.; (1993) Racemates and enantiomers in drug development. **International Journal of Pharmaceutics**. 92, 1 - 14.
80. O'Connell, Peter J.; Harms, Christian T.; Allen, James R. F.; (1998) Metolachlor, s-metolachlor and their role within sustainable weed-managemetn. **Crop Protection**. 17, 207 – 212.
81. Kurihara, N.; Miyamoto, J.; Paulson, G. D.; Zeeh, B.; Skidmore, M. W.; Hollingworth, R. M.; Kuiper, H. A.; (1997) Chirality in synthetic agrochemicals: bioactivity and safety considerations. **Pure and Applied Chemistry**. 69, 2007 – 2025.
82. Zadra, C.; Marucchini, C.; Zazzerini, A.; (2002) Behavior of metalaxyl and its pure R-enantiomer in sunflower plants (Helianthus annus). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50, 5373 – 5377.
83. McCann, S. F.; Annis, G. D.; Shapiro, R.; Piotrowski, D. W.; Lahm, G. P.; Long, J. K.; Lee, K. C.; Hughes, M. M.; Myers, B. J.; Griswold, S. M.; Reeves, B. M.; March, R. W.; Sharpe, P. L.; Lowder, P.; Barnette, W. E.; Wing, K. D.; (2001) The discovery of indoxacarb: oxadiazines as a new class of pyrazoline-type insecticides. **Pest Management Science**. 57, 153 – 164.
84. Sauer, A. M.; Crowe, W. E.; Henderson, G.; Laine, R. A.; (2009) An Efficient and Economic Asymmetric Synthesis of (+)-Nootkatone, Tetrahydro nootkatone, and Derivatives. **Organic Letters**. 11, 3530 - 3533.
85. Sheldon, Roger E.; (1993) Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds; **Dekker: New York**. 61 – 67.
86. Tombo, G. M. R.; Bellus, D.; (1991) Chirality and Crop Protection. **Angewandte Chemie International Edition in English**. 30, 1193 - 1215.

87. ADAMS, R.P., Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Espectrometry, **Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.**
88. Silva, G. B.; (2011) Isolamento, caracterização, quantificação e avaliação da pureza enantiomérica de linalol, carvona e limoneno em óleos essenciais de espécies aromáticas. Dissertação de Mestrado em Química – Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão – SE.
89. Yazar, K.; Johnsson, K, S.; Lind, M. L; Boman, A.; (2011) Preservatives and fragrances in selected consumer-available cosmetics and detergents. **Contact Dermatitis**, 64(5), 265 – 272.