

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS
MISSÕES

URI – CAMPUS DE ERECHIM

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

LEIDIANE FALCÃO

ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon winterianus*
JOWITT E SEU ÉSTER CONTRA *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) E TOXICIDADE
EM DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS

ERECHIM, JUNHO DE 2018

LEIDIANE FALCÃO

ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon winterianus*
JOWITT E SEU ÉSTER CONTRA *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) E TOXICIDADE
EM DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS

Projeto de pesquisa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ecologia (Área de Concentração: Gestão e Conservação Ambiental).

Linha de Pesquisa:

Ambiente e Tecnologia

Orientadores:

Rogério Luis Cansian

Silvane Souza Roman

ERECHIM, JUNHO DE 2018

ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon winterianus*
JOWITT E SEU ÉSTER CONTRA *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) E TOXICIDADE
EM DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS

Leidiane Falcão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ecologia. Área de Concentração: Gestão e Conservação Ambiental.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Rogério Luis Cansian D.Sc.

Universidade Regional e Integrado do Alto Uruguai e das Missões (URI - Campus de Erechim) (Orientador)

Profa. Silvane Souza Roman D.Sc.

Universidade Regional e Integrado do Alto Uruguai e das Missões (URI - Campus de Erechim) (Orientador)

Daniel Abeny Simões

Universidade Comunitária Regional de Chapecó (UNOCHAPECÓ)

Rozane Maria Restello

Universidade Regional e Integrado do Alto Uruguai e das Missões (URI - Campus de Erechim)

Erechim, Junho de 2018.

Ficha Catalográfica

AGRADECIMENTOS

À energia superior e meus guias por estarem comigo no dia a dia, lado a lado, me guiando para que eu seja um Ser Humano melhor a cada dia.

Às minhas guerreiras do Sagrado feminino, minha avó Cristina dos Passos Kopp e minha mãezinha Márcia Cristina Kopp Falcão, por serem meus exemplos de mulher e pela educação que a mim proporcionaram.

Aos meus orientadores professores, Rogério e Silvane pela confiança em mim depositada e por todas as orientações e sugestões.

A todos os colegas de laboratório, Júlia, Bruna, Raíza, Guilherme, Gabriel, Jaquilini por todo o auxílio prestado, a ajuda e apoio de vocês foram muito importantes para a realização desta pesquisa, e ao pessoal do biotério, Luan e Luisa, por toda disponibilidade e auxílio.

Aos animais que deram suas vidas pela ciência.

Às universidades, primeiramente à URI pelo espaço cedido nestes dois anos de mestrado, e também à UNOCHAPECÓ pela acolhida que tivemos quando fomos até lá realizar o experimento com as larvas de *Aedes*.

Agradeço também a todas as pessoas que eventualmente não tiveram seus nomes citados, e que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Atividade larvicida do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt e seu éster contra *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e toxicidade em diferentes modelos experimentais

Aluna: Leidiane Falcão

Autores: Rogério Luis Cansian; Silvane Sousa Roman

Resumo

Produtos gerados a partir de fontes naturais (óleos essenciais ou compostos isolados) via catálise enzimática ou via biotransformação são considerados naturais, proporcionando assim, menor impacto ambiental. Tais produtos naturais podem apresentar compostos com excelentes potenciais biológicos, sendo que estes compostos em doses elevadas podem apresentar-se tóxicos. Assim sendo, realizar testes preliminares em organismos menos desenvolvidos pode ser uma forma de visualização rápida e simples, disponibilizando também a identificação dos compostos que possam possuir potencial inseticida e larvicida contra insetos vetores de doenças, como é o caso das larvas de *Aedes aegypti*. Desta maneira, este trabalho objetivou determinar a toxicidade do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) e de seu éster frente a naúplios do microcrustáceo *Artemia salina*, frente larvas do mosquito *Aedes aegypti* e toxicidade aguda em camundongos Swiss. O óleo essencial apresentou como compostos majoritários o citronelal (27,5%), citronelol (15,1%) e geraniol (13,1%), sendo os dois últimos, os substratos da esterificação. As condições maximizadas de esterificação foram razão molar anidrido acético:óleo de 5:1 e 1% de enzima (lipase Novozym 435) para produção de acetato de citronelila e razão molar de 3:1 e 5,5% de enzima para produção de acetato de geranila. A toxicidade obtida frente *Artemia salina* em 6 horas de experimento (óleo $CL_{50}=39,91\mu\text{g/mL}$, éster $CL_{50}=62,7\mu\text{g/mL}$) e em 24 horas (éster $CL_{50}=35,2\mu\text{g/mL}$, óleo $CL_{50}=26,3\mu\text{g/mL}$), sugere que ambos os óleos (puro e esterificado) possuem alto potencial tóxico frente aos naúplios de *A. salina*, apresentando também toxicidade frente às larvas de *Aedes aegypti*, cujos resultados foram para 6 horas de exposição (óleo $CL_{50}=122,24\mu\text{g/mL}$, éster $CL_{50}=136,9\mu\text{g/mL}$) e para 24 horas (óleo $CL_{50}=99,95\mu\text{g/mL}$, éster $CL_{50}=124,57\mu\text{g/mL}$). Perante o teste de toxicidade aguda, o óleo essencial esterificado na dosagem de 1200mg/kg, induz um aumento do órgão linfóide Baço, o que demonstra um indício de toxicidade nos camundongos Swiss. Porém, maiores estudos se fazem necessários, como por exemplo, a coleta de sangue para visualização das células linfóides geradas, proporcionando uma melhor base sobre que compostos estão sendo combatidos.

Palavras-chave: microcrustáceo, larvas, camundongos, toxicidade.

Larvicidal activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt essential oil and its ester against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) and toxicity in different experimental models

Student: Leidiane Falcão

Advisors: Rogério Luis Cansian; Silvano Sousa Roman

Abstract

Products generated from natural sources (essential oils or isolated compounds) via enzymatic catalysis or via biotransformation are considered natural, thus providing less environmental impact. These natural products may contain compounds with excellent biological potentials, and these compounds at high doses may be toxic. Therefore, conducting preliminary tests on less developed organisms can be a quick and simple visualization, also making possible the identification of compounds that may have insecticidal and larvicidal potential against insects vectors of diseases, such as *Aedes aegypti* larvae. In this way, this work aimed to determine the toxicity of the essential oil of citronella (*Cymbopogon winterianus*) and its ester against nauplii of the microcrustacean *Artemia salina*, against larvae of the *Aedes aegypti* mosquito and acute toxicity in Swiss mice. The essential oils presented citronellal (27.5%), citronellol (15.1%) and geraniol (13.1%) as major compounds, the latter two being the esterification substrates. The maximized conditions of esterification were acetic anhydride: oil molar ratio 5: 1 and 1% enzyme (lipase Novozym 435) for the production of citronellyl acetate and molar ratio of 3: 1 and 5.5% enzyme for the production of geranyl acetate. The toxicity obtained with *Artemia salina* in 6 hours of experiment (oil $LC_{50} = 39.91\mu\text{g/mL}$, ester $LC_{50} = 62.7\mu\text{g/mL}$) and in 24 hours (ester $LC_{50} = 35.2\mu\text{g/mL}$, oil $LC_{50} = 26.3\mu\text{g/mL}$), suggests that both oils (pure and esterified) have a high toxic potential against the *A. salina* nauplii, also showing toxicity to *Aedes aegypti* larvae, with results for 6 hours of exposure (oil $LC_{50} = 122.24\mu\text{g/mL}$, LC_{50} ester = $136.9\mu\text{g/mL}$) and for 24 hours ($LC_{50} = 99.95\mu\text{g/mL}$, LC_{50} ester = $124.57\mu\text{g/mL}$). Due to the acute toxicity test, esterified essential oil at a dosage of 1200mg/kg induces an increase in the spleen lymphoid organ, which shows a sign of toxicity in the Swiss mice. However, further studies are needed, such as blood collection for visualization of the generated lymphoid cells, providing a better basis on which compounds are being combated.

Key words: microcrustaceans, larvae, mice, toxicity.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

1 INTRODUÇÃO

2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Atividade inseticida de Óleos essenciais	16
3.2. Óleo essencial de Citronela	18
3.3 Esterificação de óleos essenciais.....	20
3.4 Toxicidade em <i>Artemia salina</i>	22
3.5 <i>Aedes aegypti</i>	23
3.6 Toxicidade em Camundongos Swiss.....	25

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Determinação dos compostos do óleo essencial de Citronela	26
4.2 Determinação do tempo reacional para produção de ésteres e Otimização da Produção enzimática de ésteres terpênicos	26
4.3 Avaliação da toxicidade dos óleos essenciais antes e após a esterificação enzimática....	27
4.3.1 Bioensaios de letalidade para larvas de <i>Artemia salina</i>	27
4.3.2 Bioensaio de atividade larvicida sobre <i>Aedes aegypti</i>	28
4.3.3 Ensaio de toxicidade aguda em camundongos Swiss	28

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO (SEPARAR RESULTADOS E DISCUSSÃO OU NÃO?)

5.1 Composição Química do óleo essencial de <i>Cymbopogon winterianus</i>	30
5.2 Produção do éster	31
5.3 Toxicidade frente às larvas de <i>Aedes aegypti</i>	33

5.4 Toxicidade sobre naúplios de <i>Artemia salina</i>	35
5.5. Toxicidade aguda camundongos Swiss	38
5.5.1 Sinais clínicos.....	38
5.5.2 Peso corporal e Consumos de água e ração.....	41
5.5.3 Peso absoluto e relativo dos órgãos	45

6 CONCLUSÕES

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis e variáveis estudados para a produção enzimática de acetato de Citronelila e acetato de Geranila a 50°C, 150 rpm e 6 horas.	27
Tabela 2: Protocolo experimental.	29
Tabela 3 - Compostos majoritários do óleo essencial de Citronela.....	31
Tabela 4 - Matriz do planejamento experimental (valores codificados e reais) com as respostas em termos de conversão em acetato de Citronelila e acetato de Geranila, a 50°C, 150 rpm e 6 horas.	32
Tabela 5 - Sinais clínicos observados no grupo de óleos essenciais (puro e esterificado) e controles nas diferentes doses durante 14 dias.....	39
Tabela 6 - Comparativo do parâmetro Eriçamento de pelos nos grupos tratados com óleos essenciais (puro e esterificado) e controles nas diferentes doses, durante 14 dias.....	39
Tabela 7 - Comparativo do parâmetro de toxicidade redução da atividade motora nos grupos tratados com óleos essenciais (puro e esterificado) e controles nas diferentes doses, durante 14 dias..	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Reação de esterificação de Fisher catalisada por ácido. Fonte: Oliveira et al. (2013).	20
Figura 2- Cromatograma do óleo essencial de Citronela.	30
Figura 3 - Gráfico de Pareto da produção de acetato de Citronelila (A) e acetato de geranila (B) (6 horas de reação a 50°C).	32
Figura 4 - Percentual de mortalidade de <i>Aedes aegypti</i> de acordo com as concentrações de óleo essencial de Citronela esterificado e bruto em 6 horas de exposição.....	33
Figura 5 - Percentual de mortalidade de <i>Aedes aegypti</i> de acordo com as concentrações de óleo essencial de Citronela em 24 horas de exposição.....	34
Figura 6- Percentual de mortalidade de <i>Artemia salina</i> em relação a diferentes concentrações dos óleos essenciais (óleo e éster) de Citronela em 6 horas de exposição.	36
Figura 7 - Percentual de mortalidade de <i>Artemia salina</i> em relação a diferentes concentrações dos óleos essenciais de Citronela (óleo e éster) em 24 horas de exposição.	37
Figura 8 - Ganho de peso (g) dos grupos ao longo do período de tratamento. Os dados estão expressos em média±desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$)......	41
Figura 9 - Peso corporal do 1 e do 14 dia de tratamento dos grupos. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$). ...	42
Figura 10 - Consumo de ração ao longo do períodos de tratamento. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).	43
Figura 11 - Consumo de água ao longo do períodos de tratamento. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si, letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ($p<0,05$)......	43
Figura 12 - Peso absoluto dos órgãos no 15° dia de experimento. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).	46
Figura 13 - Peso relativo dos órgãos no 15° dia do experimento. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).	47

1 INTRODUÇÃO

Segundo a World Health Organization (WHO, 2016), a incidência global da Dengue tem crescido drasticamente nas últimas décadas, e com o surgimento de novas doenças como a Zika, a Chikungunya e a febre amarela, que são doenças transmitidas pelo vetor *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), é necessária uma intervenção na disseminação deste inseto. No Brasil, até a campanha 25 do Ministério da Saúde, no ano de 2018 foi possível observar casos prováveis de Dengue (171.582 casos prováveis, sendo 49,9% confirmados), de febre Chikungunya (53.089 casos prováveis, sendo 64,2% confirmados) e do vírus do Zika (5.401 casos prováveis, sendo 39,9% confirmados) (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Agroquímicos podem ser utilizados tanto para o controle de pragas na agricultura, quanto para controle de animais vetores de doenças, como é o caso do *Aedes aegypti*, sendo o Brasil o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (AZEVEDO e MEYER, 2017). Estes são amplamente utilizados no controle de doenças e de pragas na agricultura e também, no controle de insetos vetores de doenças. Entretanto, estes insumos podem deixar resíduos tóxicos nos alimentos e no ambiente (ISMAN, 2000), no caso do Brasil, o mesmo entre os anos de 2010-2011, foram consumidos 936 mil toneladas (AZEVEDO e MEYER, 2017). Além disso, os insetos e microrganismos acabam por se tornar resistentes a estes produtos (ROY e DUREJA, 1998). A busca por novos inseticidas de origem vegetal tem sido intensificada já que, de uma forma geral, estes compostos são degradados com maior velocidade que os inseticidas sintéticos, não deixando resíduos no alimento ou no meio ambiente (HENZ et al., 2007).

Existem ainda muitas questões a serem discutidas e analisadas, para esclarecer sobre vantagens, desvantagens e limitações no uso de aleloquímicos no controle de insetos considerados pragas, especialmente no que diz respeito à utilização de plantas pertencente a nossa biodiversidade.

Os principais controles utilizados são os inseticidas químicos, porém estes têm feito surgir populações do mosquito resistentes ao produto e são tóxicos ao meio ambiente (COELHO et al., 2009). Diante deste fato novas substâncias se fazem necessárias, para um controle de pragas mais eficaz, onde se ofereça maior segurança,

seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica e aplicabilidade que ofereçam menor impacto ambiental (VIEGAS JÚNIOR, 2003).

Vários inseticidas sintéticos contêm grupamento éster na sua estrutura química (organofosforados, carbamatos e piretróides), estes inseticidas químicos possuem alta eficácia, porém resistências têm sido detectadas para todas as classes de inseticidas, afetando, direta e profundamente no ressurgimento de doenças transmitidas por vetores (BRAGA e VALLE, 2007). Braga e Valle também explanam que mesmo que tenhamos obtido avanços no desenvolvimento de métodos alternativos, os inseticidas químicos continuam sendo usados nos programas integrados de controle, indicando a necessidade de estudos para o desenvolvimento de produtos alternativos e menos agressivos ao homem e meio ambiente.

A biotecnologia tem contribuído para o desenvolvimento de pesquisas sobre produção de ésteres, estimulando as indústrias à utilização de enzimas ou microrganismos para a produção destes compostos (VANIN et al., 2017). Os processos biotecnológicos são capazes de gerar sistemas complexos, com muitos dos compostos necessários para a caracterização dos ésteres, o que muitas vezes, na produção por via sintética não é alcançado ou se mostra economicamente inviável (BERGER, 2009).

Os produtos gerados a partir de fontes naturais (óleos essenciais ou compostos isolados) via catálise enzimática ou via biotransformação são considerados naturais, o que, na teoria, proporciona menor impacto ambiental, sendo importante ressaltar que não é possível saber o impacto dos mesmos à longo prazo. A vantagem da síntese enzimática é que as reações podem ocorrer em condições amenas, além de suprir as exigências de pureza e estereoespecificidade, evitando a formação de misturas racêmicas. Em geral, não emitem alta carga de resíduos e estão menos sujeitos a variações sazonais (BERGER, 2009).

Kumar et al. (2011), explanam ao fato de muitas abordagens já terem sido feitas para combater a iminente ameaça do mosquito, sendo o uso de larvicidas e de repelentes uma das práticas mais econômicas para impedir a proliferação do mesmo. Sendo tais vetores problemas, se faz necessária criar novas formas de combate, sendo uma das soluções encontradas a utilização de bioinseticidas. Neste sentido, fazer a utilização de plantas com potencial ativo larvicida e/ou inseticida, tem se mostrado alternativa promissora, devido ao seu alto índice de substâncias bioativas oriundas de seu metabolismo secundário (RODRIGUES, 2012).

A Organização Mundial de Saúde (World Health Organization - WHO, 2002), explica sobre a importância de maiores estudos referentes à toxicidade de plantas de cunho medicinal, pois as mesmas podem apresentar potenciais riscos que podem acarretar variados problemas aos seres humanos, tais como: reações adversas, superdosagens ou ineficácia; estas sintomalogias podem ser causadas pelos próprios constituintes das plantas em questão ou pela própria interação das mesmas com: possíveis medicamentos utilizados pelos usuários, identificação incorreta das plantas utilizadas, entre outros.

Chagas et al. (2004) definem óleos essenciais como substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, conhecidas de maneira geral como óleos voláteis. Óleos essenciais são compostos voláteis complexos que podem ser isolados de um grande número de plantas, tais óleos podem ser caracterizados por apresentarem propriedades inseticidas contra inúmeros artrópodos hematófagos, sendo certas plantas já conhecidas e utilizadas com tal propósito (CURTIS et al., 1989; TRONGTOKIT et al., 2005; BAGAVAN et al., 2011). Estes óleos essenciais podem ser utilizados em estudos de sua toxicidade, como ensaio preliminar de toxicidade, fazer utilização de modelos experimentais como *Artemia salina*, pode ser base em estudos de plantas que possuam potencial bioativo (PARRA et al., 2001).

A planta foco deste trabalho foi a Citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt), pertencente ao gênero *Cymbopogon* e à família Poaceae. A família Poaceae, é uma das maiores famílias de plantas, a qual engloba cerca de 500 gêneros e aproximadamente 8000 espécies, em sua grande maioria herbáceas (UNIVERSITY, 2018).

Considerando as características do gênero *Cymbopogon*, como a de possuir boa quantidade de compostos bioativos em seu óleo essencial, e a necessidade de novos estudos de espécies com potencial larvicida e inseticida, para a busca de soluções de problemas na saúde pública, o presente trabalho objetivou caracterizar os constituintes químicos do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*, assim como avaliar sua toxicidade frente à larvas de *Aedes aegypti*, náuplios de *Artemia salina* e toxicidade oral em Camundongos Swiss.

A *Artemia salina*, é um microcrustáceo pertencente à classe Anostracea, sendo seu habitat águas salinizadas, *Artemia* possui quatro estágios de desenvolvimento, sendo o custo de implantação e manutenção do cultivo da mesma muito baixo, o que faz da mesma um ótimo modelo experimental, sendo conhecida como indicador de toxicidade

em bioensaios e também para a Concentração Letal Média (CL₅₀) como parâmetro de avaliação biológica (XIMENES, 2008).

Aedes aegypti, é o principal vetor de doenças como a dengue, a febre amarela, entre outras, em países tropicais, sendo esta uma das maiores preocupações mundiais de saúde pública, pois apresenta alta ocorrência em países subtropicais e tropicais (WHO, 2016). Adaptado ao ambiente urbano, este mosquito vive em contato com um terço da população mundial, sendo permanente o risco de transmissão de dengue (NATAL, 2002).

Ratos e camundongos são animais utilizados em pesquisas biomédicas, sendo que o uso dos mesmos passam desde a prevenção até a cura de doenças, sem contar que podem possibilitar o desenvolvimento de técnicas e procedimentos cirúrgicos (MENDES e SOUZA, 2017). No Brasil a utilização de animais de laboratório e as condições éticas aos quais devem ser submetidos vêm sendo discutidas desde a década de 80, não havendo porém uma regulamentação para a prática, até o ano de 2008 com a aprovação da Lei Arouca (n°11.794/08), que estabelece normas para a utilização de modelos experimentais (BRASIL, 2008).

Assim sendo, utilizar animais modelos em pesquisas de cunho biomédico experimentais se faz ferramenta fundamental e necessária, onde dificilmente será possível encontrar métodos alternativos que representem a fisiologia humana e animal de forma completa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Otimizar a produção de ésteres a partir de óleos essenciais via catálise enzimática, para posterior teste quanto a sua atividade larvicida em *Aedes aegypti*, e sua toxicidade sobre náuplios de *Artemia salina* e toxicidade aguda em camundongos, visando a obtenção de inseticida natural para o controle de vetores de doenças, sendo a hipótese a de que a esterificação do óleo essencial iria aumentar sua atividade larvicida, além de aumentar sua estabilidade.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a composição química do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*);
- Otimizar o processo de produção dos ésteres (acetato de citreonelila e acetato de geranila) via esterificação enzimática do óleo essencial de citronela;
- Avaliar a toxicidade sobre náuplios de *Artemia salina*;
- Avaliar a atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*;
- Avaliar a toxicidade aguda em camundongos por meio de sinais clínicos, peso corporal e consumo de ração.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Atividade inseticida de Óleos essenciais

Figueiredo (2014), define óleo essencial como um produto, que pode ser obtido de duas maneiras: primeiramente via destilação, hidrodestilação ou destilação por arrastamento; e a outra forma, ocorre através de processo mecânico, sem envolvimento de calor, o qual se denomina expressão. Complementando, Bakkali et al. (2008), elucidam óleos essenciais como compostos voláteis, naturais e complexos, os quais podem ser caracterizados por um forte odor, sendo formados por plantas aromáticas como metabólitos secundários, sendo conhecidos desde a antiguidade por suas propriedades antissépticas, bactericidas, virucidas/fungicidas e também por suas propriedades medicinais e aromáticas; além do mais, não descartando sua utilização nos processos de embalagem, preservação de alimentos e como remédios antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, espasmolíticos e anestésicos locais.

A atividade dos óleos essenciais engloba ação fitoterápica, antiviral, antisséptica, nutricional, antifúngica, entre outras. A atividade bacteriostática e/ou bactericida de

óleos essenciais é exercida principalmente por compostos terpenóides (BURT, 2004). Porém, a composição e a atividade de um óleo essencial pode ser modificada por vários aspectos, desde o modo de extração, a fatores próprios da planta e do ambiente em que ela esta inserida (SILVA et al., 2011).

O uso de óleos essenciais na perfumaria e na indústria de sabores têm uma longa história, o aumento do uso destes, acabou por dar abertura à expansão dos produtores de óleos essenciais (ISMAN, 2011). Muitas plantas foram documentadas com indicativo de uso para repelir insetos e outras pragas, porém dificilmente encontram-se repelentes comercialmente eficientes e menos ainda inseticidas, anterior ao final da década de 1990, com exceção dos de à base de Citronela, com base em óleos essenciais de outras plantas (ISMAN, 2000).

Isman (2004), nos mostra que há alternativas aos inseticidas sintéticos, como os pesticidas microbianos, ferômonios e os inseticidas a base de plantas (bioinseticidas). Espera-se que os bioinseticidas tenham um funcionamento melhor que os inseticidas sintéticos, e que os mesmos não sejam agressivos ao meio ambiente e às pessoas.

Plantas possuem naturalmente capacidades bioativas contra inúmeros grupos de pragas, devido, em grande parte, ao seu desenvolvimento evolutivo, para própria defesa e em resposta a possíveis ataques, sendo assim, são fontes de compostos bioativos, que provém de seu metabolismo especializado, neste metabolismo encontra-se seu potencial fitoterápico através de compostos como: alcalóides, terpenos, flavonóides e esteróides (GONÇALVES et al., 2016).

Zapata e Smagghe (2010) avaliaram a atividade repelente, fumigante e toxicidade de contato de quatro óleos essenciais extraídos de folhas e cascas de *Laurelia sempervirens* e *Drimys winteri* contra besouros (*Tribolium castaneum*). Os quatro óleos testados tiveram uma atividade repelente muito forte contra o besouro. Após quatro horas de exposição >90% de repelência foi conseguida com *L. sempervirens* em baixas concentrações (0,032µl/cm²), para *D. winteri* as concentrações variaram de 3-10 vezes mais para ter o mesmo resultado. Ambos óleos foram tóxicos para o besouro quando aplicados topicamente ou por fumigação, sendo os valores da DL₅₀ de 39-44µg/mg para *L. sempervirens*; já para *D. winteri* a DL₅₀ variou de 75-85µg/mg. Assim sendo, os óleos essenciais podem ser explorados como bioinseticida natural contra insetos devido sua alta repelência e atividade inseticida.

Teixeira et al. (2017) avaliaram o potencial inseticida de óleos essenciais comerciais (hortelã pimenta, canela, melaleuca, capim-limão e citronela) no controle de

S. zeamais. Foram utilizados papéis filtro embebido nos óleos essenciais puros e colocados em gerbox. Após 72 horas de exposição ao óleo foi contabilizado o número de insetos mortos. Como resultados obtidos, estatisticamente nenhum dos óleos essenciais apresentou poder inseticida contra *S. zeamais*.

Bezerra et al. (2018) avaliaram a composição química e o efeito inseticida do óleo essencial de *Lantana montevidensis* contra *Drosophila melanogaster*, onde as mesmas foram expostas a diferentes concentrações do óleo essencial (3-30,5µg/mL). Como resultados o óleo essencial apresentou uma CL₅₀ na concentração de 15,14µg/mL em 3 horas de exposição, apresentando um efeito significativo no dano do aparelho locomotor das moscas, indicando um potencial bioinseticida do óleo em questão.

Gusmão et al. (2013) avaliaram a composição química, a toxicidade de contato e fumigação, e o potencial inseticida de: *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus staigeriana*, *Foeniculum vulgare* e *Cymbopogon winterianus*, contra *Callosobruchus maculatus*. Como resultados, as CL₅₀ de *F. vulgare*, *R. citriodora*, *C. winterianus* e *E. staigeriana* foram estimados em: 178,13, 298,17, 328,42 e 345,57 ppm, respectivamente. Em todas as concentrações testadas, *E. citriodora* e *C. winterianus* foram repelentes contra *C. maculatus*; *F. vulgare* mostrou-se neutro e *E. staigeriana* foi neutro em concentrações abaixo de 558 ppm e repelente em altas concentrações.

Óleos essenciais, em sua constituição, podem possuir alguns componentes com toxicidade moderada, como é o caso dos terpenóides purificados, esta toxicidade também pode ocorrer em mamíferos, porém, com algumas poucas exceções os óleos essenciais em si, ou produtos à sua base, não são tóxicos para mamíferos, aves ou peixes (ISMAN, 2000; STROH et al., 1998).

3.2. Óleo essencial de Citronela

Cymbopogon winterianus (Citronela de Java) é uma erva aromática e medicinal pertencente à família Poaceae com efeitos medicinais e terapêuticos comprovados (SINGH e KUMAR, 2017). Alguns componentes químicos encontrados em seu óleo essencial são extensivamente utilizados como fonte nas indústrias: cosmética, aromatizantes e perfumaria (KATIYAR, 2011). Pode-se definir as plantas pertencentes a este gênero como plantas perenes e formadoras de rizomas (WIJESEKERA et al., 1973).

Pandu (2014), em análise da constituição química do óleo essencial de citronela encontrou diferentes proporções de vinte constituintes do óleo, sendo que as análises

foram feitas com diferentes amostras (plantas com até 90 dias), os resultados obtidos foram: limoneno (2,2-3,1%), linalol (0,8-0,8%), citronelal (30,6-33,0%), isopulegol (0,3-0,4%), citronelol (5,4-6,9%), neral (0,6-0,8%), geraniol (19,2-26,7%), geranial (0,9-1,0%), citronelil acetato (3,8-5,3%), eugenol (0,9-1,2%), geranil acetato (9,0-14,8%), β -elemeno (0,7-1,0%), germacreno-D (0,4-0,7%), murroleno (0,2%), δ -cadineno (0,8-1,0%), elemol (6,8-8,2%), β -germacrenol (1,1-1,9%), T-murolol (0,6-0,9%), α -cadinol (1,0-1,6%), e trans-farnesol (0,2-0,3%). Esses resultados apresentam significativa variabilidade no conteúdo de citronelal (30,6-33,0%), também se observa uma quantidade significativa de citronelol (5,4-6,9%) e geraniol (19,2-26,7%).

Segundo a László (2010), a citronela pode ser utilizada como repelente de insetos, atuando também como anti-bacteriana, anti-inflamatória e óleo refrescante. O citronelol, já possui características conhecidas, como sua capacidade de repelir insetos, seu aroma peculiar, sua atividade antimicrobiana e atividade acaricida (MATTOS, 2000). A utilização de Citronela de Java na perfumaria também é muito difundida, porém a qualidade do óleo essencial irá depender das características físico-químicas do solo e das condições climáticas em que a mesma foi cultivada (SINGH, 2017).

Costa et al. (2013) avaliaram os compostos majoritários e o potencial inseticida de *Cymbopogon citratus* contra *Frankliniella schultzei* e *Myzus persicae*. Como resultados para a composição do OE, os componentes majoritários principais foram geraniais (49,98%) e neral (37,78%). Em relação à atividade inseticida, os insetos foram pulverizados com o óleo essencial de *C. citratus* em diferentes concentrações. Os valores obtidos para CL₅₀ de *M. persicae* e *F. schultzei* foram de 0,28% e 1,49% respectivamente, o que demonstra que *C. citratus* pode ser considerado uma alternativa natural como pesticida no manejo de *M. persicae*.

Xavier et al. (2012), avaliaram a influência do óleo essencial de Citronela (*Cymbopogon winterianus*) na germinação de sementes do feijão *Vigna unguiculata*. Os mesmos utilizaram as dosagens de 20, 15, 10 e 5 $\mu\text{g/L}^{-1}$ e o grupo controle. Como resultado obtido, o OE de citronela revelou potencialidade alelopática sobre a germinação de sementes do feijão, a germinação variou conforme a concentração do óleo.

Santos et al. (2015) utilizando os extratos aquoso, hidroalcoólico concentrado e o óleo essencial puro de Citronela (*Cymbopogon winterianus*) sobre larvas e teleóginas de *Rhizophthalus* (*Boophilus*) *microplus*, nas concentrações 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100% de cada extrato mais o grupo controle; obtiveram como resultado que a citronela

demonstra potencial acaricida, principalmente na forma de OE, pois a partir da concentração de 12,5% causou 100% de mortalidade larval, e a 25% demonstrou índice de eficácia de 100% no teste com as teleóginas, demonstrando que a citronela na forma de óleo essencial é eficaz no controle de *R. microplus*.

3.3 Esterificação de óleos essenciais

Os ésteres são substâncias orgânicas, frequentemente encontradas na natureza e utilizadas como importantes intermediários em síntese orgânica. Tais substâncias desempenham um papel relevante na indústria farmacêutica, de perfumes, de polímeros, de cosméticos, de alimentos e agroquímica (TAN et al., 2006).

Em 1895, Fischer e Speier constataram que era possível a obtenção de ésteres através do aquecimento de um ácido carboxílico e um álcool na presença de catalisador ácido (MCMURRY, 2011). Esta reação ficou conhecida como esterificação de Fischer (Figura 1), sendo um dos principais métodos utilizados na produção de ésteres, sendo até hoje o método mais comum e mais utilizado em processos industriais e em escala de laboratório para obtenção de ésteres.

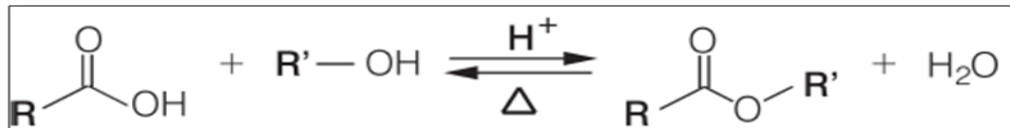


Figura 1- Reação de esterificação de Fisher catalisada por ácido. Fonte: Oliveira et al. (2013).

Essas reações geram água e são facilitadas através do aumento da temperatura do meio de reação e da presença de um catalisador ácido de Brønsted-Lowry. Sem catalisador, em condições normais de temperatura e pressão, essa reação ocorre lentamente, devido a sua reversibilidade (CLAYDEN et al., 2007).

Algumas das desvantagens deste método são as dificuldades de reutilização do catalisador, corrosão de reatores industriais, além do impacto ambiental decorrente dos resíduos inorgânicos e da formação de subprodutos tóxicos. A maior parte dos resíduos é gerada durante a fase de separação por neutralização (MCMURRY, 2011).

A esterificação pode ocorrer na ausência de catalisador, entretanto devido aos ácidos carboxílicos serem ácidos fracos, a reação é extremamente lenta, sendo necessários dias para que se alcance uma situação de equilíbrio (BRITO, 2010). Portanto, a utilização de catalisador na reação de esterificação é essencial para a

ativação do grupo carbonila do ácido envolvido, devido a função doadora de próton que o catalisador exerce (PATTANAIK e MANDALIA, 2011).

A fim de minimizar os impactos causados pelos processos químicos, inúmeras alternativas baseadas na Química Verde visam o desenvolvimento de técnicas, equipamentos e processos de produção capazes de reduzir ou eliminar a geração de substâncias agressivas ao meio ambiente e à saúde humana. Uma das rotas é a utilização da catálise enzimática (BRITO, 2010).

A biotecnologia tem contribuído para o desenvolvimento de pesquisas sobre produção de ésteres, estimulando as indústrias à utilização de enzimas ou microrganismos para a produção destes compostos. Os processos biotecnológicos são capazes de gerar sistemas complexos, com muitos dos compostos necessários para a caracterização dos ésteres, o que muitas vezes, na produção por via sintética não é alcançado ou se mostra economicamente inviável (BERGER, 2009).

Paroul (2011) define ésteres como uma importante classe de compostos orgânicos com propriedades aromáticas, que podem ser sintetizados por vários mecanismos, entre eles a síntese enzimática. Os ésteres obtidos via síntese enzimática têm sido muito valorizados devido à sua obtenção em condições brandas, podendo então, ser considerados produtos naturais quando os substratos têm esta origem. Assim sendo, Dhake et al. (2013), explanam sobre as vantagens desta síntese, pois estas funcionam com condições de reação mais amenas e com seletividade apreciável. Pode-se citar entre o leque de enzimas estudadas as lipases, sendo esta uma das enzimas mais utilizadas para a síntese de produtos químicos importantes (LOZANO, 2010).

Ribeiro Neto et al. (2013), avaliaram a toxicidade do óleo comercial FAME (Fatty acid methyl esters) esterificado e bruto contra larvas de *Culex quinquefasciatus*, primeiramente em concentrações iniciais de 124,5mg/L e 116,0mg/L e das frações iniciais duas outras concentrações dez vezes mais diluídas que as anteriores. Como resultados, a mortalidade encontrada foi determinada em 35% para o FAME em sua maior dosagem, enquanto para o óleo bruto comercial a mortalidade ficou em 8,3%, obtendo-se uma $DL_{50}=478,21\text{mg/L}$.

Vanin (2014) testou a toxicidade do óleo essencial de Cravo (*Caryophyllus aromaticus*) bruto e esterificado em naúplios de *Artemia salina*, sendo que o resultado obtido para o óleo foi de $DL_{50}=0,5993\mu\text{g.mL}^{-1}$ e para o óleo essencial esterificado foi de $DL_{50}=0,1178\mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando que, tanto o óleo essencial bruto quanto o óleo

essencial esterificado apresentam alto potencial tóxico, sendo que o éster apresenta uma toxicidade 5 vezes maior perante o organismo testado.

Alves et al. (2015) investigaram o potencial fumigante dos óleos essenciais de *Ocimum gratissimum*, *Ocimum basilicum*, *Xymbopogon nardus*, *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba*, *Menha arvensis*, *Schinus terebinthifolius* e *Cordia verbenacea* no controle dos ciclos de vida do caruncho do feijão-caupi. Os óleos foram extraídos e avaliados por CG/EM, e utilizados então para avaliação da mortalidade, postura de ovos e emergência de novos adultos. Pôde ser observado na análise dos compostos: linalol (32,8%) e eugenol (48,1%) para *O. basilicum*, eucaliptol (14,8%) e eugenol (74,5%) para *O. gratissimum*; acetato de mentol (10%) e mentol (73,3%) para *M. arvensis*; citonelal (50,13%) e nerol (10,8%) para *C. nardus*; citral (75,8% e 87,1%) respectivamente para *C. citratus* e *L. alba*; α -santaleno (35,8%) e β -sinensal (17,7%) para *C. verbenacea* e opineno (23,1%), δ -3-careno (32,1%) e limoneno (16,9%) para *S. terebinthifolius*. Nos testes biológicos, os OE's apresentaram efeitos tóxicos sobre o ciclo de vida do caruncho, inibindo acima de 80% a postura de ovos e mais de 98% a emergência de novos insetos, com excessão do óleo de *C. verbenacea*.

3.4 Toxicidade em *Artemia salina*

Artemia salina é um artrópoda pertencente a Classe Crustacea que pode suportar altas taxas de salinidade (BROWN et al., 1991), sendo sensível à muitos compostos químicos este organismo é muito utilizado em experimentos laboratoriais, devido ao fácil manuseio e ao cultivo fácil e barato (IANNACONE et al., 2016). Seu tamanho varia conforme sexo, produzindo cistos que podem logo eclodir (se em condições favoráveis) ou ficar inativos até as condições serem propícias (FAO, 2018).

Artemia salina passa por alguns estágios de desenvolvimento, sendo que estes foram determinados por Drach (1939), onde o mesmo os dividiu em: Pós-muda A, Pós-muda B, intermuda, pré-muda e Ecdise. A partir da análise dos exopoditos de *Artemia salina*, Criel e Walgrave (1989) estagiaram o ciclo da muda nesses, a partir de microscopia óptica simples. O desenvolvimento da nova matriz celular compõem os exopoditos que podem ser observados com bastante distinção durante todo o ciclo da muda. Cada estágio é marcado pelo desenvolvimento da nova matriz celular que vai compor o exopodito, sendo que após sua eclosão, já é possível identificar em que estágio o mesmo se encontra (CRIEL e WALAGRAVE, 1989).

O uso de bioensaios para monitorar a bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas têm sido, muitas vezes, incorporadas na pesquisa fitoquímica. Entre estes ensaios biológicos é o ensaio de toxicidade com *Artemia salina* (BST-Brine Shrimp Test), que foi desenvolvido para detectar compostos bioativos em extratos de plantas (MEYER et al., 1982; NOLDIN et al., 2003). Este teste é um método simples na pesquisa de produtos naturais, que tem uma boa correlação com os testes de toxicidade oral aguda *in vivo* (PARRA et al., 2001).

Tem sido demonstrado que existe uma boa correlação entre a concentração letal média (CL₅₀) de extratos de plantas às larvas e as doses letais médias (DL₅₀) dos mesmos extratos (PARRA et al., 2001), assim sendo, alguns autores em seus respectivos estudos fizeram testes de toxicidade utilizando *Artemia* como modelo, para tanto a mesma é utilizada em testes de toxicidade (SILVA, 2010; ROCHA, 2011; CHAVES, 2017).

3.5 *Aedes aegypti*

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) é um mosquito pertencente à ordem Diptera, família Culicidae tendo como gênero *Aedes* e sub-gênero *aegypti* (NATURDATA, 2018). O *Aedes aegypti* pode ser citado como o vetor mais importante de algumas doenças, entre elas a dengue (SIMMONS, 2012) e a febre amarela (BLYTHE, 2015). Sendo extremamente adaptado ao ambiente urbano, este organismo vive em contato com um terço da população mundial (WHO, 2016).

Aedes (*Stegomyia*) *aegypti* é uma espécie exótica na América do Sul, sendo introduzido no Brasil provavelmente na época do tráfico de escravos (FORATTINI 1986; CONSOLI e LOURENÇO 1994). Seu desenvolvimento dura cerca de 8-10 dias possuindo fase aquática e uma fase terrestre durante seu ciclo de vida. A primeira fase possui três estádios de desenvolvimento: ovo, larva e pupa, ao emergir da pupa o mesmo torna-se adulto (CONSOLI e LOURENÇO, 1994). Desde a oviposição até a fase adulta decorrem em média 10 dias, sendo os ovos depositados individualmente pelas fêmeas nas paredes internas de recipientes, próximos à superfície da água, embora as posturas possam ser realizadas diretamente na água (GOMES et al., 2006; MADEIRA et al., 2002).

Os ovos de *Aedes aegypti* podem permanecer em locais secos (sendo portanto resistentes à dessecação) desde que, o desenvolvimento embrionário ocorra em ambiente úmido (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Após a eclosão,

emergem as larvas que apresentam quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4) e em seguida ao desenvolvimento larval tem início a fase de pupa. Neste estágio de desenvolvimento, o imaturo não se alimenta e a forma como irá se desenvolver é consideravelmente influenciada pela temperatura. Estes mosquitos passam de forma rápida pela fase imatura, já que todo o ciclo inteiro de vida deve acontecer antes que o líquido do criadouro evapore por completo. Em condições ideais (27-38°C) o mosquito emerge entre um e três dias, as fêmeas são realizam hematofagia, atacando durante o dia (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Tendo preferência por criadouros artificiais, *Aedes aegypti* teve um aumento considerável em sua população devido à concentração humana originada pela urbanização e a grande utilização de recipientes artificiais como utensílios domésticos e de embalagens alimentícias, o que acaba por contribuir para a crescente proliferação desta espécie de mosquito nos centros urbanos e nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (TAUIL, 2001).

Aedes aegypti é um mosquito de hábitos domésticos, que pica durante o dia, sendo que fêmeas possuem preferência acentuada por sangue (TAUIL, 2001), assim sendo as fêmeas realizam hematofagia em horários diurnos, principalmente ao amanhecer e pouco antes do crepúsculo, entretanto pode picar o homem e animais domésticos, a qualquer hora do dia e mais raramente à noite, caso o hospedeiro se aproxime de seu abrigo. O hábito diurno também é apresentado pelos machos, que seguem as fêmeas em seus abrigos na tentativa de efetuar a cópula e também obter alimento como substâncias açucaradas (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

A espécie *A. aegypti* possui a habilidade de se resguardar enquanto fazem repasto sanguíneo, pois possuem grande sensibilidade a qualquer movimento, escapando rapidamente quando ameaçados e logo após, podendo atacar novamente ou procurar nova fonte de alimento, sendo este, um importante fator do ponto de vista epidemiológico, pois fêmeas infectadas e não infectadas acabam alimentando-se rapidamente por diversas vezes, e em diferentes hospedeiros, sendo as infectadas as responsáveis por disseminar o vírus para um maior número de pessoas (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Diversos autores publicaram trabalhos nos quais fizeram testes das concentrações letais mínimas e da atividade larvicida de diversos óleos essenciais perante larvas de *Aedes aegypti* (COSTA et al., 2008; PORTO et al., 2008; CAVALCA

et al., 2010; CASTRO et al., 2015; PEREIRA et al., 2016; VORIS et al., 2017), sendo que estes estudos sugerem que óleos essenciais podem representar uma nova ferramenta no controle da larva do vetor *Aedes aegypti*.

3.6 Toxicidade em Camundongos Swiss

Camundongos são mamíferos onívoros e granívoros, altamente sociais, e se comunicam principalmente através do olfato e da audição. Na cadeia alimentar ocupam a posição de presas, por isso, fogem e se escondem de ameaças. Eles são principalmente noturnos, vivem em tocas e constroem ninhos (SUCKOW et al., 2001).

O uso de animais em laboratório, incluindo camundongos, continua a ser uma parte importante da pesquisa biomédica (MENDES e SOUZA, 2017). Camundongos têm sido domesticados por séculos, até mesmo milênios, e têm sido usados nas pesquisas científicas desde 1600, seu desenvolvimento como modelo de pesquisa realmente iniciou, com os experimentos genéticos por volta de 1900 (SUCKOW et al., 2001). sendo que atualmente, utilizar modelos animais em pesquisas é de extrema relevância nas diferentes áreas da biomedicina, podendo citar como exemplo pesquisas a respeito do Zika vírus na área da virologia (MENDES e SOUZA, 2017). O camundongo de laboratório é reconhecido como o modelo preeminente para pesquisa genética moderna, incluindo câncer, imunologia, toxicologia, metabolismo, desenvolvimento biológico, diabetes, obesidade, envelhecimento e doenças cardiovasculares, sendo os mais geneticamente os mais bem caracterizados de todos os mamíferos o que aumenta o seu valor em todos os campos de estudo (SUCKOW, 2001).

Comportamentos sociais de camundongos em laboratório são também conservados e eles preferem a proximidade com outros de sua espécie (VAN LOO et al., 2004), sendo amplamente estudados em pesquisas biomédicas (ABRAMOV et al., 2008; ARNDT et al., 2009; KOIKE et al., 2009), e em laboratório, os mesmos são alojados em grupos como no ambiente selvagem, porém são normalmente segregados por sexo, em contraste com seu habitat natural (ALLEVA, 1993).

Variados autores em suas respectivas publicações, demonstraram (em distintos casos) que os óleos essenciais causam diversas alterações fisiológicas em mamíferos (RAMALHO et al., 2014; TROMBETA et al., 2014; ZANCANARO FILHO et al., 2015; GUILARDUCCI et al., 2016), sendo estes estudos importantes ferramentas para o entendimento de como tais substâncias podem interferir na fisiologia de mamíferos até a utilização em seres humanos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Determinação dos compostos do óleo essencial de Citronela

Para a determinação dos compostos do óleo essencial foi utilizada a cromatografia gasosa, acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) modelo Shimadzu, Modelo QP 5050A. As amostras foram preparadas em uma concentração de 50.000 ppm com diclorometano. O método utilizado na cromatografia foi com split 1:20, em coluna DB5, fluxo de 1mL/min, injetor de 250 °C e interface de 250 °C, com um detector de 1,6 Kv e um corte de solvente em 3,5 minutos. Com um tempo inicial 3 minutos a 50 °C, aumentando 5 °C por minuto até atingir 130 °C, depois 15 °C por minuto até atingir 210 °C por 7 min e 20 °C por minuto até atingir 250 °C por 10 min. Para a identificação dos compostos utilizou-se a biblioteca do equipamento (Wiley) e o índice de kovats tabelado destes compostos (ADAMS, 2007).

4.2 Determinação do tempo reacional para produção de ésteres e Otimização da Produção enzimática de ésteres terpênicos

Para a reação de esterificação e produção de acetato de citronelila e acetato de geranila, foram utilizados como substratos o anidrido acético e o óleo de citronela comercial. A enzima utilizada foi a lipase comercial imobilizada Novozym 435, produzida por fermentação submersa a partir do micro-organismo *Candida antarctica* e imobilizada em resina acrílica macroporosa, com tamanho de partícula entre 0,3-0,9 mm, densidade de aproximadamente 430 Kg/m³ e conteúdo de água entre 1-2%, sendo uma lipase termoestável com uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 40-80 °C.

Para determinação das condições experimentais de maximização da síntese dos ésteres, foi realizado um planejamento experimental (Tabela 1) variando-se a razão molar (RM) e a concentração de enzima ([E]). A reação de esterificação enzimática foi conduzida em um agitador rotativo, onde os erlenmeyers com a mistura reacional dos reagentes e enzima foram deixados sob agitação e temperatura de 50 °C. O tempo de reação e agitação do sistema foram fixados, respectivamente, em 6 horas e 150 rpm (PAROUL, 2011).

Tabela 1 - Níveis e variáveis estudados para a produção enzimática de acetato de Citronelila e acetato de Geranila a 50°C, 150 rpm e 6 horas.

Níveis/Variáveis	RM (mol:mol) (anidrido acético/óleo)	[E] (%) (m/m substratos)
-1	1:1	1
0	3:1	5,5
1	5:1	10

A quantificação do éster foi realizada por cromatografia gasosa em equipamento Shimadzu GC-2010 equipado com processador de dados. As análises foram realizadas utilizando coluna capilar de sílica fundida INOWAX (30m x 250µm i.d.), 0,25µm de espessura de filme e detector FID. A determinação da conversão das reações foi feita acompanhando a redução na área do sinal do agente limitante.

Para a análise estatística foi utilizado o software Statistica® 5.0 (Statsoft Inc., EUA), adotando-se em todos os casos estudados um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

4.3 Avaliação da toxicidade dos óleos essenciais antes e após a esterificação enzimática

Para fins comparativos, as determinações de atividade larvicida foram feitas com o óleo essencial bruto e com óleo essencial esterificado.

4.3.1 Bioensaios de letalidade para larvas de *Artemia salina*

Cistos de *A. salina* foram colocados em recipiente de vidro com solução salina artificial (10g de sal marinho/1 litro de água destilada/0,7g de bicarbonato de sódio) com iluminação artificial, sob aeração e controle da temperatura (24°C) para a eclosão dos cistos. Após 24 h de incubação, as larvas foram retiradas para o ensaio por sucção, com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

Para os bioensaios de letalidade utilizando o óleo comercial de citronela esterificado e não esterificado (óleo puro), foram utilizadas as seguintes concentrações (10, 25, 50, 75, 100, 250 e 400 µg/mL) + 2% DMSO (dimetilsulfóxido). Após o período de incubação, 40 náuplios de *A. salina* foram colocados em placas de Petry juntamente com 20 mL de cada concentração de óleo puro e esterificado, o procedimento foi feito em triplicata. As soluções foram preparadas em 2% de DMSO e avolumadas com solução salina artificial (preparada anteriormente), sendo o controle avaliado nesta

solução sem a adição de óleo esterificado. Os controles foram utilizados também para se ter certeza de que a mortalidade observada dos náuplios de *A. salina* fosse resultante da toxicidade ao composto e não devido à falta de alimentação (CARBALLO et al., 2002).

Após 24 h de exposição, foi realizada contagem dos náuplios vivos e mortos, sendo considerados vivos todos aqueles que apresentaram qualquer tipo de movimento quando observados próximos a uma fonte luminosa por 10 segundos. Os náuplios de *A. salina* após a eclosão não recebiam alimento, assim sendo, tanto o grupo controle quanto os grupos que recebiam o tratamento, obtiveram índices de mortalidade, onde como solução foram considerados válidos somente os testes nos quais o controle apresentou mortalidade igual ou inferior a 10 % da população.

4.3.2 Bioensaio de atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*

As larvas de *A. aegypti*, foram cedidas pelo laboratório LABENT – ECO, com sede na Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ), no qual o experimento foi realizado, em parceria entre ambas as Universidades, sendo que a eclosão dos ovos e criação até o momento do experimento foi realizada no LABENT-ECO. As larvas cedidas estavam em torno do terceiro a quarto estágio de desenvolvimento, as mesmas eram alimentadas com ração para peixe.

Os óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* puro e esterificado foram testados nas seguintes concentrações: 10, 25, 55, 75, 100, 125, 155, 175, 200, 250 e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) 2% e água (50 mL). Como controles negativos, foram utilizados um controle somente composto por água e outro com água e DMSO 2%. Para cada amostra foram avaliadas 25 larvas em 3º e 4º estágio, em triplicata. Os resultados foram avaliados em 6 h e novamente após 24 h, considerando-se como mortas as larvas que não reagiram à estímulos mecânicos (pinça). A estimativa da CL_{50} foi feita pela análise de Probit, utilizando o programa SPSS.

4.3.3 Ensaio de toxicidade aguda em camundongos Swiss

O projeto foi aprovado na CEUA Erechim sob número 57, sendo utilizados 44 camundongos Swiss, pesando entre 30-45g fornecidos pelo Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim. Os animais foram mantidos em condições adequadas no biotério, com temperatura controlada (22 ± 2 °C), umidade relativa ($50 \pm 5\%$) e em ciclo de 12 horas claro/escuro, com livre acesso à alimentação e água.

Para este ensaio foi utilizada a metodologia da OECD, (2001) e foram seguidas as diretrizes 420, 423 e 425, às quais tem como objetivo identificar a menor dose que cause toxicidade evidente. Segundo as diretrizes, na ausência de testes de toxicidade *in vitro*, a dose inicial permitida é de 300 mg/kg, por gavagem, e um período de pelo menos 24 horas entre a dose de cada animal é analisado (VALADARES, 2006).

A partir dos resultados com *Artemia salina* e *Aedes aegypti* foram definidas as doses utilizadas para a toxicidade nos camundongos. Para tanto foram utilizados dois grupos controles e seis grupos experimentais subdivididos conforme o óleo essencial (puro e esterificado) nas doses de 120, 600 e 1200mg/kg (Tabela 2). A administração aguda do veículo (água destilada e DMSO) e dos óleos (essencial e esterificado) nos animais dos diferentes grupos foi via gavagem (Gavagem: define-se gavagem quando uma substância é introduzida na cavidade oral ou no aparelho digestório através de um tubo esofágico ou estomacal, no caso dos camundongos é utilizado uma agulha curvada com a ponta arredondada é introduzida na boca do animal e gentilmente empurrado pelo esôfago até o estômago - USP), em dose única no primeiro dia do experimento. Todos os animais dos diferentes grupos foram observados ao longo de 14 dias.

Tabela 2 - Protocolo experimental.

Grupos	Descrição
CTL-	água destilada
DMSO	água destilada com DMSO 2%
OP 120	óleo puro na dose de 120mg/kg
OE 120	óleo esterificado na dose de 120mg/kg
OP 600	óleo puro na dose de 600mg/kg
OE 600	óleo esterificado na dose de 600mg/kg
OP 1200	óleo puro na dose de 1200mg/kg
OE 1200	óleo esterificado na dose de 1200mg/kg

CTL- = Controle negativo; DMSO = controle com DMSO 2%; OP = óleo essencial puro (não esterificado); OE = óleo essencial esterificado.

Foram realizadas observações clínicas comportamentais segundo Malone (1983), nos tempos de: 15 min, 30 min, 1, 2, 4 e 8 h após a administração e, a partir de então, de quatro em quatro dias, até o décimo quarto dia. Sinais de toxicidade, a época do seu aparecimento, a intensidade, a duração e a progressão dos mesmos foram anotados, tabulando-os numa escala de 0 a 3 (0 - ausente, 1 - pouco, 2 - moderado, 3 - intenso), para posterior análise.

Além disso, durante o experimento foram anotados o peso corporal, consumo de água e ração. No décimo quinto dia, os animais dos diferentes grupos foram

previamente anestesiados com Zoletil IM50 para posterior eutanásia em câmara de CO₂. O abdômen foi incisado para a análise macroscópica e coleta dos seguintes órgãos: fígado, rins, cérebro e baço; com o objetivo de verificar uma possível toxicidade.

4.3.4 Análise Estatística

A análise dos dados de toxicidade foi feita através da análise estatística ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey, usando software validado (IBM SPSS Statistics) e pelo Kruskal Wallis do Bioestat, seguido do teste Student-Newman-Keuls. Foi considerado um nível de significância de 5%. Os resultados foram expressos através de média ± desvio padrão (Média ± DP).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição Química do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*

A Figura 1 apresenta o perfil cromatográfico do óleo essencial de citronela, obtido por CG-EM. Na Tabela 2 observa-se a composição química do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*), apresentando como composto majoritário o citronelal (27,52%), citronelol (15,10%) e geraniol (13,09%).

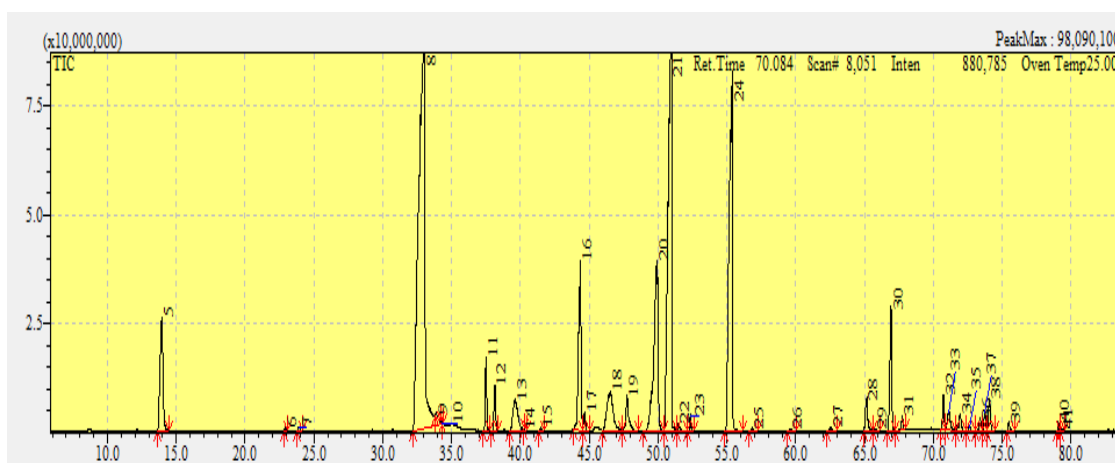


Figura 2- Cromatograma do óleo essencial de Citronela.

Tabela 3 - Compostos majoritários do óleo essencial de Citronela.

Número	Composto	Área (%)
5	L- Limoleno	3,62
8	Citronelal	27,52
11	Linalol	1,09
13	β – Elemeno	1,70
16	Citronelil acetato	4,27
29	Cedreno	0,06
19	Geranial	1,08
33	Δ – Cadineno	0,61
20	Geranil Acetato	7,37
21	Citronelol	15,10
24	Geraniol	13,09
18	Germacren-4-ol D	2,54
30	Elemol	2,43
TOTAL		80,5%

Em análise da constituição química do óleo essencial de Citronela, Pandu (2014) encontrou 20 constituintes do óleo, destes 3 foram semelhantes: citronelal (30,6-33,0%), citronelol (5,4-6,9%) e geraniol (19,2-26,7%). De acordo com Marco et al. (2007) diferenças na composição química dos óleos essenciais extraídos de plantas da mesma espécie são comuns e dependem de alguns fatores como época, local da coleta, variações climáticas, espaçamento entre as plantas, altura em que são cortadas e pH do solo, entre outros.

5.2 Produção do éster

Visando avaliar o efeito das variáveis independentes na produção de acetato de citronelila e acetato de geranila, a partir de óleo de citronela, realizou-se um planejamento experimental 2^2 com triplicata do ponto central, totalizando 7 experimentos. As variáveis estudadas foram concentração de enzima (m/m substratos) e razão molar anidrido acético/óleo. A Tabela 3 apresenta a matriz do planejamento com os valores reais e codificados das variáveis independentes e as conversões de acetato de citronelila e acetato de geranila para a lipase comercial Novozym 435.

De acordo com a Tabela 4, pode-se observar que o ensaio 2 conduziu a uma maior conversão em acetato de citronelila, alcançando um valor de 99,60% de produto nas condições: razão molar 5:1 (anidrido acético/óleo), concentração de enzima de 1% (m/m substratos), na temperatura de 50 °C, 150 rpm por 6 horas. A conversão máxima obtida para o acetato de geranila foi de 99,59, nas condições: razão molar 3:1 (anidrido

acético/óleo), concentração de enzima de 5,5% (m/m substratos), na temperatura de 50 °C, 150 rpm por 6 horas.

Tabela 4 - Matriz do planejamento experimental (valores codificados e reais) com as respostas em termos de conversão em acetato de Citronelila e acetato de Geranila, a 50°C, 150 rpm e 6 horas.

Ensaio	RM (anidrido acético/óleo)	[E] (m/m substratos)	Conversão de acetato de citronelila (%)	Conversão de acetato de geranila (%)
1	-1 (1:1)	-1 (1%)	87,80	88,45
2	1 (5:1)	-1 (1%)	99,60	98,70
3	-1 (1:1)	1 (10%)	35,85	47,45
4	1 (5:1)	1 (10%)	91,24	88,42
5	0 (3:1)	0 (5,5%)	99,12	99,59
6	0 (3:1)	0 (5,5%)	99,24	99,50
7	0 (3:1)	0 (5,5%)	99,21	99,59

Os dados apresentados na Tabela 4 foram tratados estatisticamente e os efeitos das variáveis independentes na produção de acetato de citronelila e acetato de geranila estão apresentados na Figura 3.

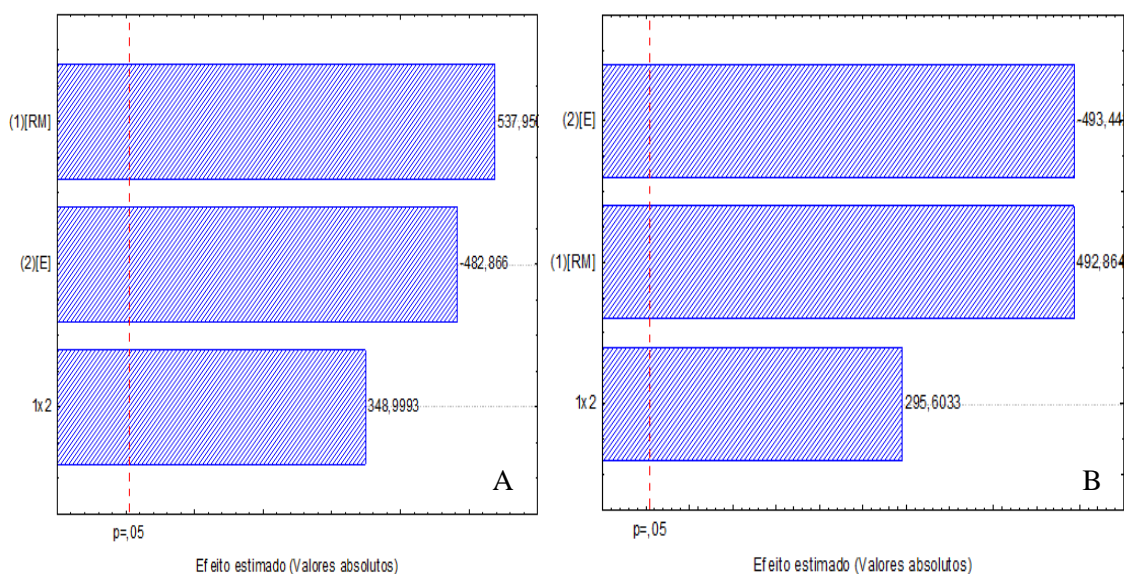


Figura 3 - Gráfico de Pareto da produção de acetato de Citronelila (A) e acetato de geranila (B) (6 horas de reação a 50°C).

Nas Figuras 3A e 3B é possível observar que a variável razão molar apresentou efeito significativo positivo, indicando que maiores níveis conduzem a maiores conversões, já a variável concentração de enzima, mostrou efeito significativo negativo

indicando que menores níveis conduzem a maiores conversões, tanto de acetato de citronelila quanto de acetato de geranila.

O efeito negativo da concentração de enzima na produção de acetato de citronelila e acetato de geranila indica que, reduzindo-se a concentração de enzima, as altas taxas de produção podem ser mantidas, possibilitando a economia de enzima.

Paroul (2011) utilizou a técnica de planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta para otimizar as condições de produção de oleato de citronelila e propionato de citronelila. Em 6 horas de reação o maior rendimento em oleato de citronelila foi de 98,9%, obtido para razão molar dos reagentes de 1:1 e concentração de enzima 10% (m/m substratos). Os efeitos das variáveis independentes para este éster mostraram que a razão molar e concentração de enzima tiveram efeitos significativos ($p < 0,05$) negativo e positivo, respectivamente. Os maiores rendimentos para propionato de citronelila (92,9%) foram obtido em 6 horas de reação com concentração de enzima de 10% (m/m substratos), razão molar de 1:1 e temperatura de 60°C. A partir da análise estatística dos dados obtidos observou-se que em 6 horas de reação todas as variáveis tiveram efeitos significativos ($p < 0,05$). A concentração de enzima apresentou um efeito positivo, e temperatura e a razão molar apresentaram efeitos negativos.

5.3 Toxicidade frente às larvas de *Aedes aegypti*

Em 6 horas de exposição, o percentual máximo de mortalidade (100%), para o óleo essencial bruto foi observado na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, com $\text{CL}_{50} = 122,24 \mu\text{g/mL}^{-1}$. Já para o óleo essencial esterificado o percentual máximo de mortalidade (100%), foi observado na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ e $\text{CL}_{50} = 136,9 \mu\text{g/mL}^{-1}$.

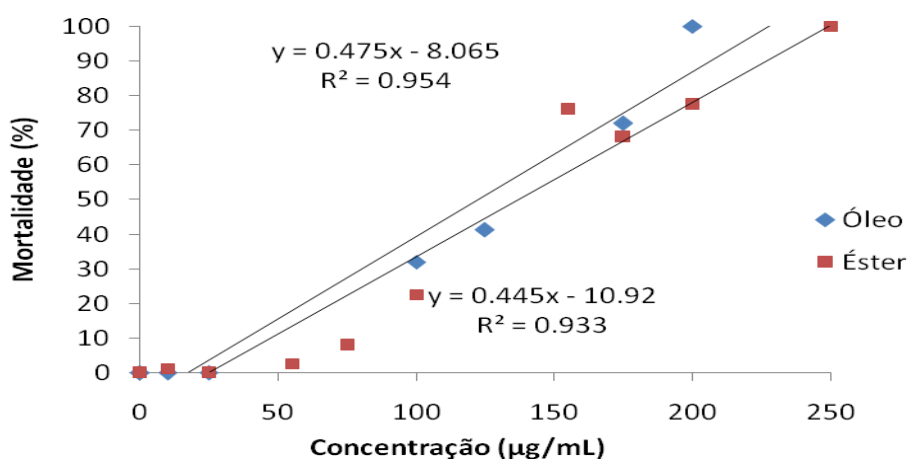


Figura 4 - Percentual de mortalidade de *Aedes aegypti* de acordo com as concentrações de óleo essencial de Citronela esterificado e bruto em 6 horas de exposição.

Em 24 horas de exposição (Figura 5), o percentual máximo de mortalidade (100%), para o óleo essencial bruto foi observado na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, com $\text{CL}_{50} = 99,95 \mu\text{g/mL}^{-1}$. Já para o óleo essencial esterificado o percentual máximo de mortalidade (100%), foi observado na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, com $\text{CL}_{50} = 124,57 \mu\text{g/mL}^{-1}$.

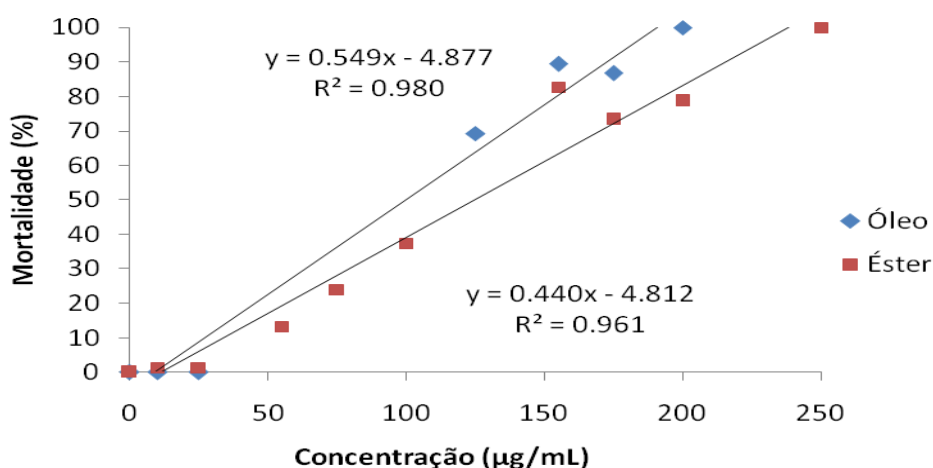


Figura 5 - Percentual de mortalidade de *Aedes aegypti* de acordo com as concentrações de óleo essencial de Citronela em 24 horas de exposição.

Os resultados obtidos na avaliação da dose letal média necessária para haver morte de 50% das larvas de *A. aegypti* em 6 horas ($\text{CL}_{50} = 122,24 \mu\text{g/mL}^{-1}$) e em 24 horas ($\text{CL}_{50} = 99,95 \mu\text{g/mL}^{-1}$) para o óleo essencial bruto de Citronela, em comparação ao óleo essencial esterificado ($\text{CL}_{50} = 136,9 \mu\text{g/mL}^{-1}$ e $\text{CL}_{50} = 124,57 \mu\text{g/mL}^{-1}$) para 6 e 24 horas respectivamente, mostram que, apesar da pequena diferença de maior toxicidade do óleo essencial bruto, o óleo essencial esterificado possui um bom potencial bioativo/tóxico conforme Meyer et al. (1982), agregando a maior estabilidade do éster em relação ao óleo bruto.

Na literatura, há diversos trabalhos que utilizam a metodologia de teste das concentrações letais mínimas e da atividade larvicida dos mais diversos óleos essenciais perante larvas de *Aedes aegypti* (COSTA et al., 2008; PORTO et al., 2008; GOMES et al., 2016, RAMOS et al., 2016, ROSA, et al., 2016; MACHADO et al., 2017), fazendo utilização do óleo essencial de Citronela podemos encontrar Furtado et al. (2005) que comprova a atividade larvicida de alguns óleos essenciais, dentre estes óleos, encontramos o óleo essencial de Citronela, onde obtiveram $\text{CL}_{50} = 54.700 \mu\text{g/mL}^{-1}$, sendo que no presente trabalho o resultado obtido foi de $99,95 \mu\text{g/mL}^{-1}$. No ano de

2016, Phasomkusolsil e Soonwera utilizando o óleo essencial de Capim Limão (*Cymbopogon citratus*), que é uma planta pertencente ao mesmo gênero que a Citronela, e também fazendo utilização do óleo de cravo, determinaram a taxa de mortalidade, alterações morfológicas e persistência quando utilizando os mesmos em larvas de *Aedes aegypti* e *Anopheles dirus*. Ambos os óleos causaram alterações morfológicas, e todas as concentrações causaram mortalidade, sendo então possível a utilização dos mesmos no controle larvicida contra ambos os mosquitos. Comparando os estudos, é possível concluir, que utilizar o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* e plantas do mesmo gênero, como bioinseticidas é uma forma viável de combater o *Aedes aegypti* ainda em sua fase larval.

5.4 Toxicidade sobre náuplios de *Artemia salina*

Em relação aos ensaios de toxicidade com ambos os óleos essenciais (óleo e éster), observa-se que o percentual de mortalidade aumenta com o aumento do tempo de exposição, independentemente da concentração, podendo obter-se alta toxicidade com concentrações maiores em pouco tempo ou concentrações menores com mais tempo de exposição. Com 6 horas de exposição ao tratamento, o percentual máximo de mortalidade (100%) para o óleo essencial (óleo) pode ser observado na concentração de 100 µg/mL, sendo determinada uma $CL_{50} = 39,91 \mu\text{g/mL}^{-1}$; já para o éster o percentual máximo de mortalidade (100%) também ocorreu com a concentração de 100 µg/mL⁻¹ com $CL_{50} = 62,7 \mu\text{g/mL}^{-1}$ (Figura 6).

Em relação aos ensaios de toxicidade com ambos os óleos essenciais (óleo e éster), é possível observar que há uma relação entre a concentração do óleo essencial utilizada e a mortalidade dos indivíduos, onde se visualiza que em independente das concentrações utilizadas, há um aumento na mortalidade conforme o aumento do tempo de exposição, podendo obter-se alta toxicidade com concentrações maiores em pouco tempo ou concentrações menores com mais tempo de exposição (Figura 4).

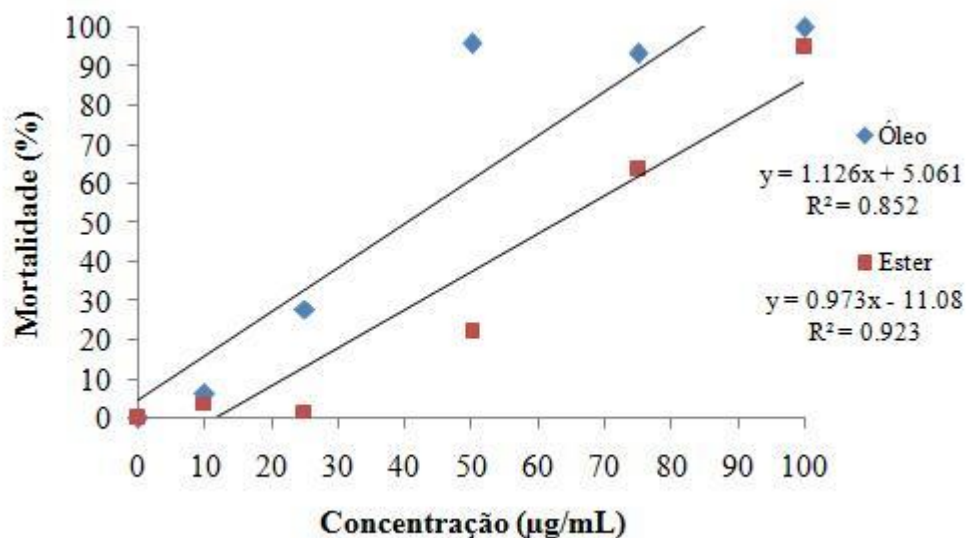


Figura 6- Percentual de mortalidade de *Artemia salina* em relação a diferentes concentrações dos óleos essenciais (óleo e éster) de Citronela em 6 horas de exposição.

Entre os componentes químicos do óleo de *C. winterianus*, são encontrados em maiores quantidades o citronelal, o citronelol e o geraniol. Esses componentes são referidos pela sua eficácia contra insetos e, segundo Furtado et al. (2005), são os responsáveis pela mortalidade larval do *A. aegypti*. Dessa forma, podemos sugerir que os componentes majoritários encontrados na composição do óleo essencial de citronela, influenciaram diretamente e de forma positiva na mortalidade de *Artemia salina* verificada neste trabalho.

Os resultados do ensaio toxicológico de ambos os óleos com 24 horas (Figura 7) de exposição aos óleos, demonstraram que o percentual de morte vai aumentando conforme a concentração, atingindo o percentual máximo de mortalidade (100%) na concentração de $75 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ em 24h para o óleo esterificado, obtendo-se uma $CL_{50} = 35,2 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. Já referindo-se às 24 horas do óleo essencial (óleo) o percentual máximo de mortalidade (100%) foi observado com a concentração de $50 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, e o valor CL_{50} foi estimado em $26,3 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para 24 horas.

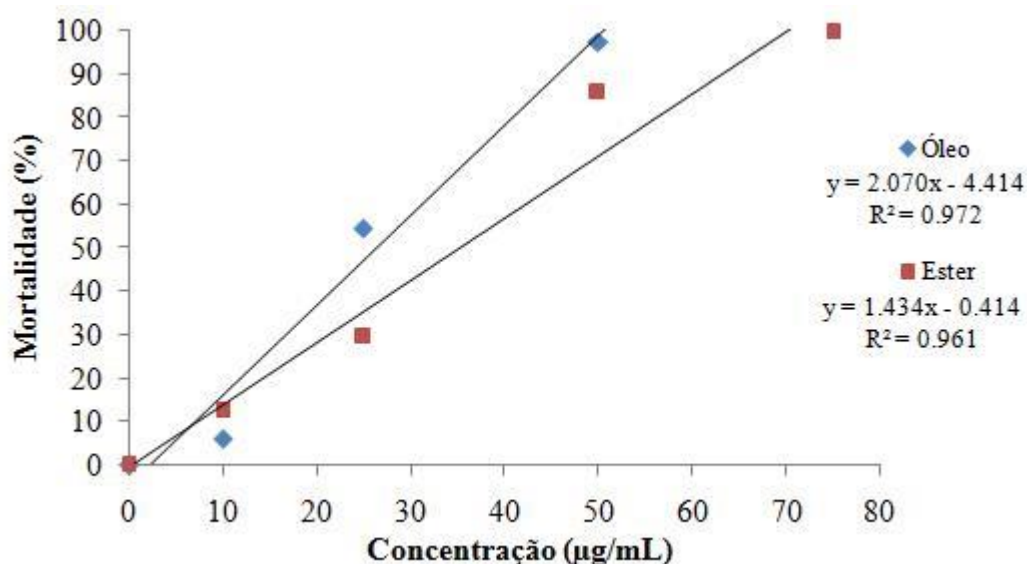


Figura 7 - Percentual de mortalidade de *Artemia salina* em relação a diferentes concentrações dos óleos essenciais de Citronela (óleo e éster) em 24 horas de exposição.

Os resultados obtidos na avaliação da concentração letal média necessária para haver morte de 50% dos náuplios de *A. salina* em 6 horas ($CL_{50} = 62,7 \mu\text{g/mL}^{-1}$) e em 24 horas ($CL_{50} = 35,2 \mu\text{g/mL}^{-1}$) para o óleo essencial esterificado de citronela, indicam que o óleo essencial esterificado pode ser considerado com bom potencial bioativo/tóxico, visto que Meyer et al. (1982) definem substâncias tóxicas em testes com *A. salina* quando estas apresentam $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$.

Vários trabalhos publicados na literatura indicam a toxicidade de vários óleos essenciais, incluindo a toxicidade do óleo essencial de *C. winterianus*.

Sendo *A. salina* um microcrustáceo amplamente utilizado como indicador de toxicidade em bioensaios que utilizam DL_{50} como parâmetro de avaliação da atividade biológica, muitos autores, fazem utilização deste organismo modelo em estudos de diversas atividades, incluindo testes de toxicidade (RODRIGUES, et al., 2013; COSTA et al., 2008; PEREIRA et al., 2014; VANIN et al., 2014; ROSA et al., 2016). Sendo o trabalho de Rodrigues (2013), que fez a utilização do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus*, encontrou uma DL_{50} de $181 \mu\text{g/mL}$, frente aos náuplios de *A. salina*, valor este aproximadamente 7 vezes maior que a encontrada no presente trabalho ($26,3 \mu\text{g/mL}^{-1}$). Esta diferença pode estar relacionada com diferenças metodológicas mas, principalmente, com diferenças na composição química do óleo, que varia qualitativamente em função do clima, época e horário de coleta, tipo de solo, etc. (FERNANDES et al., 2011).

5.5. Toxicidade aguda camundongos Swiss

5.5.1 Sinais clínicos

No decorrer do experimento não houve morte dos animais nos diferentes grupos, mostrando nenhuma letalidade do óleo essencial e do óleo esterificado. Na Tabela 5, é possível observar os sinais clínicos ao longo dos 14 dias de experimento, nos grupos de óleos essenciais (puro e esterificado) e controles nas doses testadas.

Dentre os diferentes parâmetros analisados dos sinais clínicos de toxicidade, somente o eriçamento de pelo e a redução da atividade motora, foram constatados, conforme mostrado nas tabelas 5, 6 e 7. Na Tabela 5, podemos notar diferença significativa no período de 08 horas e no 7º Dia para o parâmetro eriçamento de pelos. Ainda na tabela 5 houve significância na redução da atividade motora em apenas 1 hora após o tratamento.

Conforme mostra a Tabela 6, no parâmetro eriçamento de pelos, houve um aumento significativo no tempo de 08 horas entre os grupos de OP (120 e 600) e OE (600) em relação ao grupo CTL-, e do grupo OP120 em relação ao grupo DMSO. Para o 7º Dia, pode-se observar que os grupos de OE (120 e 600) tiveram um aumento significativo no eriçamento de pelos em relação aos grupos controles (CTL- e DMSO).

Na Tabela 7, podemos observar que no parâmetro redução da atividade motora, houve um aumento significativo no tempo de 1 hora de experimento, sendo em relação ao grupo controle (DMSO) somente os grupos OP600 e OE600.

A falta de correlação (*Kruskal Wallis*) entre o aumento da concentração das doses e a redução da atividade motora em comparação a DMSO, pode indicar que os valores significativos encontrados devem-se à outros fatores que não foram avaliados e não propriamente a toxicidade dos óleos essenciais utilizados (puro ou esterificado).

Tabela 5 - Sinais clínicos observados no grupo de óleos essenciais (puro e esterificado) e controles nas diferentes doses durante 14 dias.

Valores de p			
Tempo	Eriçamento de Pêlos	Redução da atividade motora	Lamber-se
15 minutos	0,1882	0,4739	0,9763
30 minutos	0,0896	0,0827	0,9771
1 hora	0,0917	0,0419*	0,2832
2 horas	0,1263	0,2048	0,5094
4 horas	0,0652	0,0586	0,3217
8 horas	0,0132*	0,1396	0,9963
24 horas	0,3261	0,0725	0,3324
4° Dia	0,0606	0,3026	0,2832
7° Dia	0,0397*	0,4156	1,0000
10° Dia	0,5489		0,7515
14° Dia	0,9992		

* Significância estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal wallis.

Tabela 6 - Comparativo do parâmetro Eriçamento de pelos nos grupos tratados com óleos essenciais (puro e esterificado) e controles nas diferentes doses, durante 14 dias.

Eriçamento de Pêlos			
8 horas		7° Dia	
Tratamentos	valor de p	Tratamentos	valor de p
CTL- x OP120	0,0392	CTL- x OE120	0,0305
CTL- x OP600	0,0457	CTL- x OE600	0,0115
CTL- x OE600	0,0457	DMSO x OE600	0,0438
DMSO x OP120	0,0456	OE120 x OP1200	0,0305
OP120 x OP1200	0,0161	OE120 x OE1200	0,0305
OP120 x OE1200	0,0315	OE600 x OP1200	0,0115
OE120 x OP1200	0,0398	OE600 x OE1200	0,0115
OP600 x OP1200	0,0164	Valor de p geral	0,0397
OP600 x OE1200	0,0357		
OE600 x OP1200	0,0164		
OP600 x OE1200	0,0357		
Valor de p geral	0,0132		

CTL- = Controle negativo; DMSO = controle com DMSO 2%; OP = óleo essencial puro (não esterificado); OE = óleo essencial esterificado. Significância estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal wallis.

Tabela 7 - Comparativo do parâmetro de toxicidade redução da atividade motora nos grupos tratados com óleos essenciais (puro e esterificado) e controles nas diferentes doses, durante 14 dias..

Redução da Atividade Motora	
Tratamentos	Valores de p
DMSO x OP600	0,0438
DMSO x OE600	0,0438
OE120 x OP1200	0,0305
OP600 x OP1200	0,0115
OE600 x OP1200	0,0115
Valor de p geral	0,0419

DMSO = controle com DMSO 2%; OP = óleo essencial puro (não esterificado); OE = óleo essencial esterificado. Significância estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal wallis.

Assim sendo, a toxicidade de plantas e seus constituintes, como é o caso dos óleos essenciais, pode ser verificada quando animais intoxicados apresentam sinais clínicos como: vômito, diarreia, tremores, sinais de stress (ericação de pêlo, irritabilidade), e em casos de intoxicação mais grave podem ser observadas convulsões e mortalidade (FRASER et al., 1991). No caso da toxicidade aguda os sinais devem aparecer nas primeiras 24 horas após a administração (OLIVEIRA, 2009). Neste estudo as doses utilizadas foram de 120, 600 e 1200 mg/kg do óleo essencial puro e do óleo essencial esterificado de *Cymbopogon winterianus* Jowitt, e administrados uma única vez, via gavagem. Os resultados mostraram sinais de estresse e desconforto físico nos animais nos parâmetros comportamentais avaliados, tais como: o ericação de pelos, redução da atividade motora e lambar-se, embora sem relação dose efeito.

Padilha de Paula (2003), utilizando o óleo essencial de *Ocimum* spp., fez o teste de toxicidade aguda, onde o óleo essencial foi administrado em camundongos Swiss adultos, não sendo percebidos efeitos adversos em doses até 1250 mg/kg. Mortes e sintomas (hipoatividade, ataxia e letargia, etc) só foram observados em doses maiores ≥ 1500 mg/kg, sendo fêmeas mais suscetíveis que os machos. Sendo assim, o óleo essencial avaliado apresentou baixa toxicidade.

Li et al. (2009), utilizando ésteres de forbol (*Jatropha curcas* - óleo essencial das sementes), teve por objetivo avaliar a toxicidade destes ésteres através da administração intragástrica para determinação da DL_{50} em camundongos Swiss. Como resultados obtidos o DL_{50} e os limites de confiança (95%) e o para camundongos machos foram de 27,34 mg/kg e de 24,9-29,89 mg/kg de massa corporal, respectivamente. Como resultados para histopatologia, não foi constatada nenhuma alteração anormal significativa nos órgãos na dose mais baixa (21,26 mg/kg), em doses $\geq 32,40$ mg/kg

foram encontradas lesões proeminentes, principalmente nos rins e pulmão, na dose mais alta (36,0 mg/kg) foram observados deslocamentos múltiplos de fibras musculares cardíacas e anacromases de neurônios corticais, sendo necessários mais estudos para o desenvolvimento de medidas de segurança para a utilização dos ésteres de forbol.

Costa et al. (2011) investigaram a toxicidade do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*) em camundongos Swiss machos, sendo que a única dose que apresentou toxicidade oral aguda, foi a dose de 3500 mg/kg. Não ocorreram alterações significativas na patologia geral, peso corporal, peso do dos órgãos absolutos ou relativos, histologia (cérebro, coração, rins, fígado, pulmões, estômago, baço e bexiga), urina ou bioquímica clínica foram observados nos camundongos tratados em relação ao grupo controle. Assim sendo, a ingestão de capim limão (nas dosagens testadas) pode ser considerado seguro, como é o caso do óleo essencial testado neste presente trabalho.

5.5.2 Peso corporal e Consumos de água e ração

A avaliação da toxicidade sistêmica pode ser identificada pela diminuição do peso corporal dos animais e por alterações no consumo de água e ração, sendo tais sinais importantes para a avaliação da toxicidade de uma substância, pois fornece informações sobre o estado geral de saúde dos animais (VALADARES, 2006). As análises apresentadas nas Figuras 8 e 9, mostram a média do ganho de massa corporal dos grupos experimentais no 1º e 14º dia e ao longo dos 14 dias de experimento, não havendo diferenças significativas entre os diferentes grupos, o que mostra ausência de toxicidade dos óleos frente a este parâmetro avaliado.

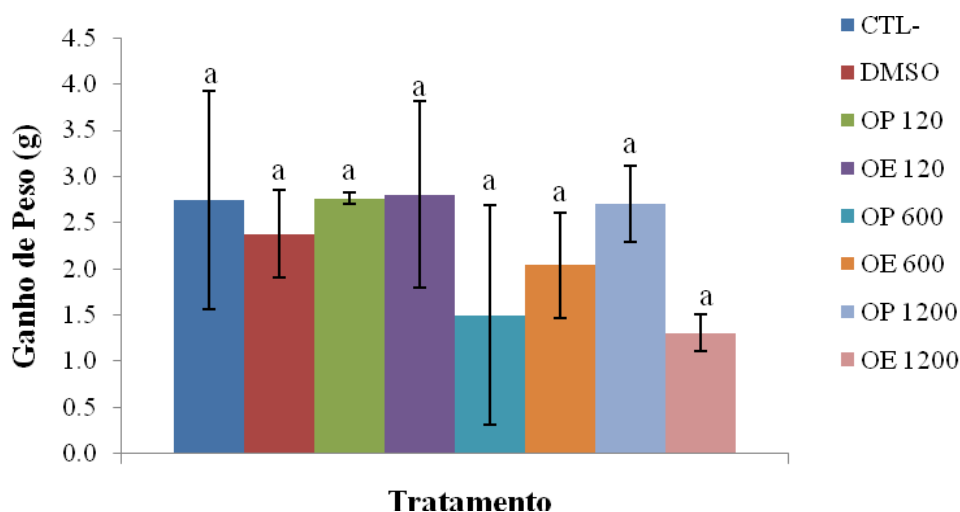


Figura 8 - Ganho de peso (g) dos grupos ao longo do período de tratamento. Os dados estão expressos em média±desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

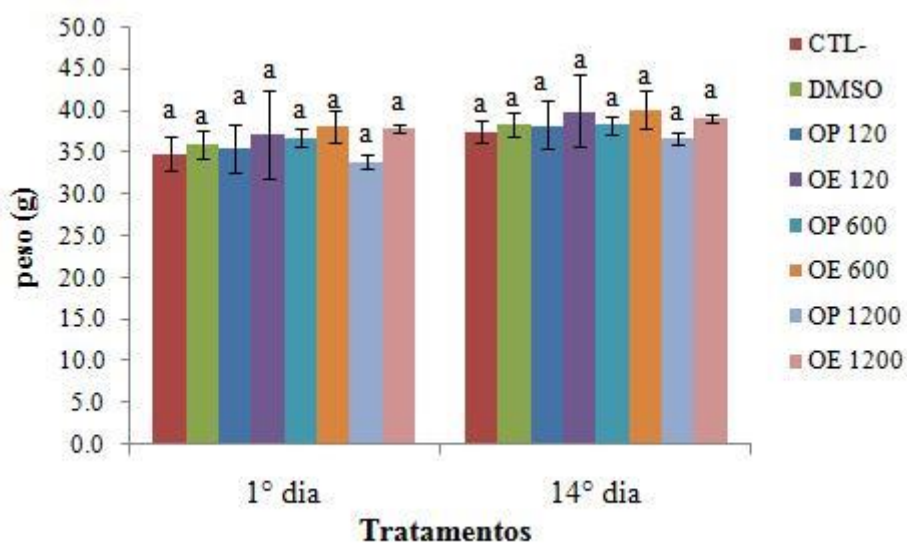


Figura 9 - Peso corporal do 1 e do 14 dia de tratamento dos grupos. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Em relação ao consumo de ração (Figura 10), pode-se observar que houve um aumento significativo nos grupos de animais tratados com o óleo essencial puro e com o óleo essencial esterificado, nas diferentes doses em relação aos grupos controle (CTL- e DMSO), além disso, também foi observado um aumento no consumo de ração nos animais dos grupos OE120 e OP600 em comparação aos demais grupos, o que indica que o óleo essencial de *C. winterianus*, puro ou esterificado, não induz toxicidade, porém induz aumento do apetite.

Desta forma, a ingestão alimentar e o gasto de energia são controlados por sistemas neurais complexos e redundantes, verdadeiros sistemas integradores, que recebem sinais aferentes desde o sistema digestório, passando pelo tecido adiposo e chegando às estruturas centrais, sendo a Leptina (proteína produzida pelo tecido adiposo subcutâneo) a responsável por informar ao cérebro que há presença de excesso do tecido adiposo, tal processo acaba por induzir um bloqueio de um neuropeptídeo (Y), que é responsável por suprir o apetite (DAMINIANI e DAMINIANI, 2010). Sendo assim, sugerimos que algum dos componentes do óleo essencial de Citronela possa estar influenciando a ativação de Leptina, porém a realização de mais estudos se faz necessária.

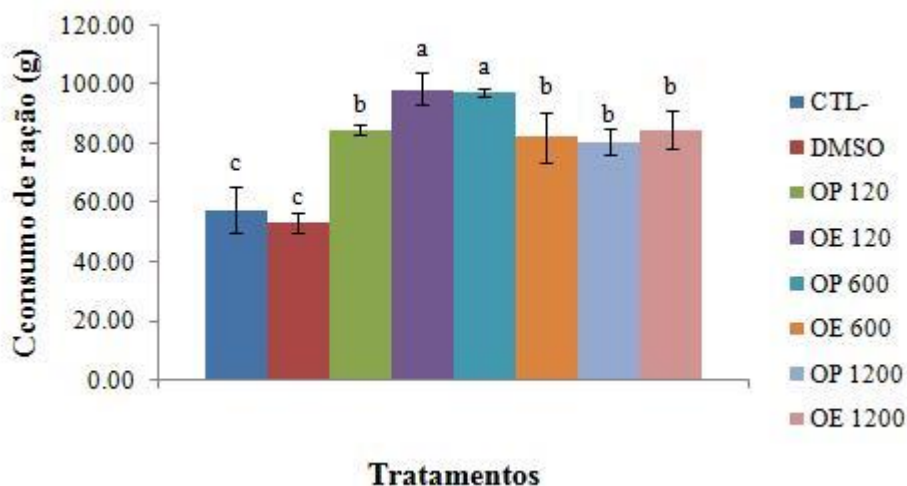


Figura 10 - Consumo de ração ao longo do períodos de tratamento. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Referindo-se ao consumo de água, foi visto um aumento no grupo OP120 em relação aos demais grupos (Figura 11), o que não representa toxicidade. O aumento somente neste grupo, pode ter sido ocasionado devido à dificuldade de controle da quantidade de água que era consumida ou perdida no manuseio dos bebedouros.

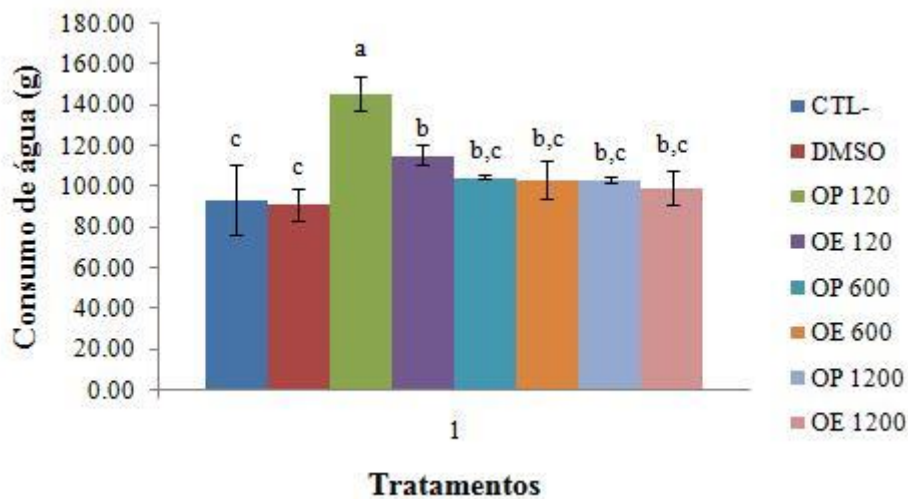


Figura 11 - Consumo de água ao longo do períodos de tratamento. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si, letras diferentes diferem pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Na literatura são apresentados trabalhos que fazem a avaliação da toxicidade aguda de extratos vegetais, onde podem ser observadas alterações nos consumos (água e ração), diminuição ou aumento do peso corpóreo e escores de toxicidade de óleos essenciais em modelo animal.

Como já citado anteriormente, neste trabalho com o óleo essencial de Citronela (*Cymbopogon winterianus*) foram encontrados compostos majoritários como o Citronelal, o Citronelol e o Geraniol. Alguns trabalhos já foram desenvolvidos por outros pesquisadores demonstrando efeitos toxicológicos e/ou terapêuticos com estes compostos, sendo alguns deles citados a seguir.

Em testes toxicológicos e farmacológicos em ratos, fazendo utilização do óleo essencial de Citronela, Leite et al. (2012), obteve com resultados DL₅₀ de 1,953mg/kg e de 567,3mg/kg, respectivamente. Frente ao teste de movimentação espontânea em ratos após a administração com o óleo essencial de Citronela, foi observada redução no número de cruzamentos e aumento no tempo de sono induzido pelo tiopental (ácido barbitúrico que induz sonolência, sedação e hipnose). Foram observadas também propriedades depressoras, antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante do óleo essencial de Citronela, sem que tais efeitos ocasionassem perda de coordenação motora. Entretanto, no ensaio agudo foram vistas alterações histológicas nos rins e no fígado desses animais tratados com o óleo essencial de Citronela.

Carnesecchi et al. (2004), investigaram o efeito do geraniol na síntese da timidilato e na expressão da timidina quinase em células de câncer de cólon, que foram transplantadas para camundongos Swiss. O Geraniol (150µM) causou uma redução de 2 vezes na timidilato sintase e da expressão de timidina quinase em células cancerosas. Após a administração combinada do fármaco 5-fluoracil (20mg/kg) com geraniol (150mg/kg) obteve-se uma redução de 53% do volume do tumor, enquanto o geraniol administrado sozinho apresentou uma redução de 26%, sendo que 5-fluorouracil sozinho não demonstrou nenhum efeito.

Brito et al. (2013), avaliaram os efeitos antinociceptivos do Citronelol em dor orofacial em camundongos, investigando a principal via envolvida no efeito. Camundongos machos Swiss foram pré tratados com Citronelol (25, 50 e 100 mg/kg via intraperitoneal), morfina (5mg/kg via intraperitoneal) ou veículo (solução salina+tween 80% a 0,2%). Citronelol produziu efeito antinociceptivo significativo (p<0,01), em todas as doses testadas, nos testes de formalina, capsaicina e glutamato. A

imunofluorescência mostrou que Citronelol atua de forma significativa ($p < 0,05$) o bulbo olfativo, o córtex piriforme, o córtex retrosplínico e a área cinzenta periaquedutal do SNC. Tais resultados fornecem evidências iniciais de que o Citronelol atenua a dor orofacial pelo menos em parte, por meio da ativação de áreas do SNC, principalmente do córtex retrosplenial e do eríqueduto.

5.5.3 Peso absoluto e relativo dos órgãos

Nas figuras 12 e 13 pode-se observar os pesos absoluto e relativo dos órgãos dos animais nos diferentes grupos. Foi visto um aumento significativo no peso absoluto do baço somente na maior concentração de óleo esterificado (OE1200) apresentou diferença significativa em relação aos grupos controle (CTL- e DMSO), mas sem diferença em relação aos demais tratamentos (Figura 12). O aumento do baço representa aumento na produção de células de defesa de organismo, já que é um órgão linfóide secundário, sendo o principal local das respostas imunes adaptativas aos antígenos originados do sangue (ABBAS, 2015).

Já o fígado desempenha função central no metabolismo devido à sua interdisposição entre o trato digestivo e a circulação geral do organismo, sendo também o principal órgão envolvido na biotransformação de substâncias exógenas, e possui a capacidade de converter compostos hidrofóbicos em hidrossolúveis, que serão mais facilmente eliminados pelo organismo (CARVALHO et al., 2013). Nossos resultados mostraram que no fígado houve pequena variação entre todos os grupos, sendo o valor mais significativo para o tratamento de óleo essencial esterificado na dose de 120 (OE120), e as menores médias nos grupos CTL-, OP600 e OE1200, indicando não haver correlação entre aumento de concentração da dose dos óleos (puro e esterificado) e do peso absoluto do fígado. O indício de aumento deste órgão no peso absoluto, pode indicar que em tratamentos com doses maiores das que as utilizadas no presente trabalho podem causar hipertrofia do fígado. Este pressuposto é baseado em Aguiar et al., (2011), onde o fígado é capaz de se auto-regenerar, este processo pode ocorrer de duas maneiras: hiperplasia (aumento do número de células) e hipertrofia (aumento do volume celular ou do conteúdo proteico na fase pré-replicação). O indício de aumento deste órgão no peso absoluto, pode indicar que em tratamentos com doses maiores das que as utilizadas no presente trabalho podem causar hipertrofia do fígado.

Referindo-se ao cérebro, os tratamentos variaram entre os grupos que receberam a dose, sendo o valor mais elevado de peso de cérebro no tratamento de OE120, e o

menor no de OP600, porém sem diferenças em relação aos controles, o que indica não haver toxicidade do óleo essencial ou seu éster nas concentrações avaliadas.

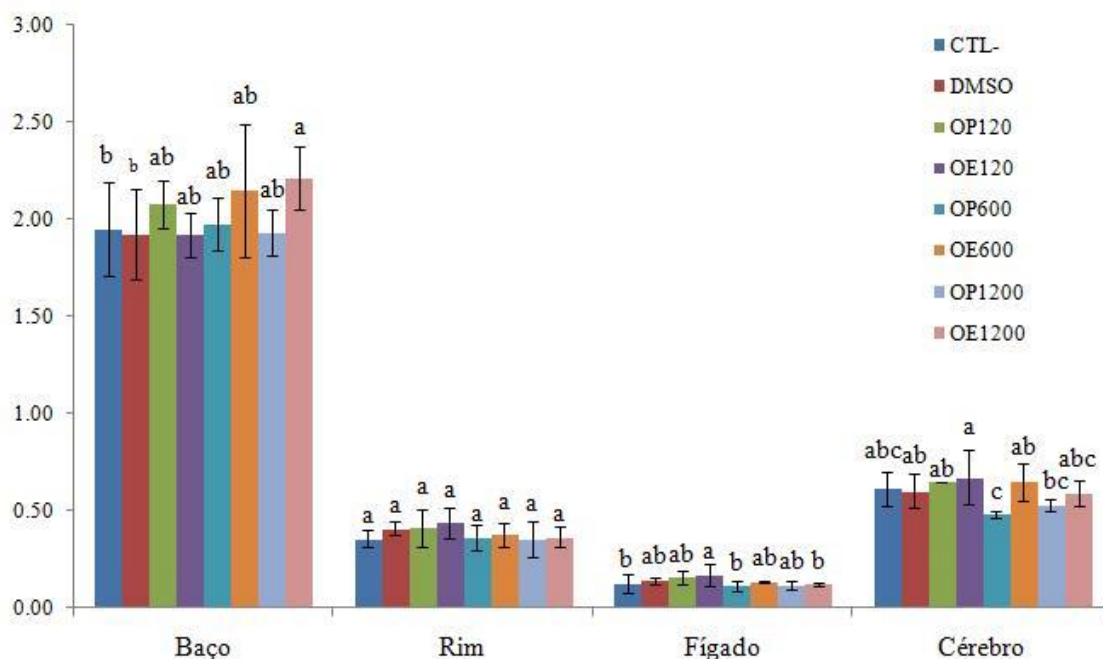


Figura 12 - Peso absoluto dos órgãos no 15º dia de experimento. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Já, referindo-se ao peso relativo dos órgãos (Figura 13), os únicos órgãos que apresentaram variação significativa foram: Baço e Cérebro. Para o Baço, o tratamento de óleo essencial esterificado na dose de 1200 mg/kg (OE1200) diferiu estatisticamente do controle com DMSO e do tratamento OE120. Observa-se também uma tendência de aumento no peso relativo do baço com o aumento da concentração, tanto de óleo essencial como de óleo esterificado, indicando que doses maiores que as avaliadas no presente trabalho podem gerar um aumento significativo no peso do baço.

Pode também ser observado na Tabela 13 um menor peso relativo significativo do cérebro dos animais do grupo OP600 quando comparado com os grupos controles (CTL- e DMSO).

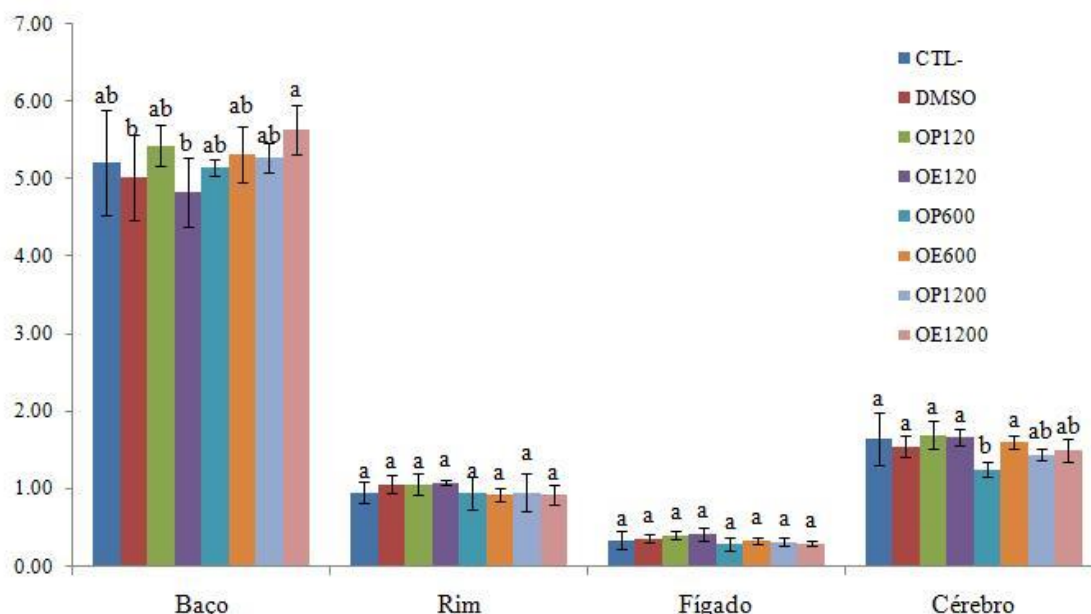


Figura 13 - Peso relativo dos órgãos no 15º dia do experimento. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os resultados mostram alterações no baço e no fígado o que representa indícios de toxicidade causada pelo óleo. Segundo Isman (2006), a toxicidade dos óleos essenciais, incluindo a de *Cymbopogon winterianus*, se dá devido à presença de monoterpênicos e sesquiterpênicos, o que poderia justificar as lesões observadas nos órgãos como: baço, fígado e cérebro em nosso trabalho.

Outro sinal de que uma substância pode ou não ter toxicidade, são as alterações no peso corporal de animais tratados com as mesmas (OLIVEIRA et al., 2013). Desta forma, é recomendada a avaliação da existência de toxicidade pelo fator perda de peso, seja ela ou não, acompanhada da redução do consumo de ração e de água (LOUZADA et al., 2008).

O fato de não terem ocorrido mortes de animais nos diferentes grupos no decorrer do experimento, não significa ausência de toxicidade aguda do óleo essencial puro e do óleo esterificado, pelo fato de terem sido encontrados alguns indicativos de toxicidade. Entretanto, vale ressaltar que a dose de 1200mg/kg é considerada extremamente alta, pois, de acordo com o Sistema de Classificação Global Harmonizado da OCDE (1996), doses letais são consideradas acima de 2000mg/kg-1. Por esta razão, podemos considerar que há um indício de toxicidade, porém é de extrema importância que sejam realizados outros estudos avaliando a toxicidade crônica para maiores esclarecimentos.

Há diversos trabalhos avaliando a toxicidade aguda, entre eles o de Trombeta et al. (2014), nestes trabalhos é possível observar alterações nos consumos de água e ração (ROCHA et al., 2012; TROMBETA et al., 2014), diminuição ou aumento de peso corpóreo e escores de toxicidade (MIKULSKI et al., 2017) sendo esta toxicidade atribuída à diversos óleos essenciais em modelos animais. Testando a toxicidade aguda do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, planta pertencente ao mesmo gênero da Citronela, Lima e colaboradores (2017) obtiveram como resultados baixa toxicidade, assim como em nosso trabalho.

Assim sendo, estudar as propriedades toxicológicas das plantas se faz necessário, pois é importante determinar os seus efeitos potenciais, para então fornecer diretrizes para selecionar a dose mais segura para humanos e animais (CARDOSO et al., 2011; FONSECA et al., 2016). Para tanto, a utilização de testes toxicológicos que permitam perceber a dosagem mínima necessária para causa de toxicidade é de suma importância para a evolução do estudo, e que futuramente seus compostos possam ser usados para vários setores (FONSECA et al., 2016).

6 CONCLUSÕES

Com o referido trabalho, foi possível concluir, que ambos os óleos (puro e esterificado) possuem alto potencial tóxico, nas concentrações testadas, tanto frente aos náuplios de *Artemia salina* quanto às larvas de *Aedes aegypti*. E o mais importante, no teste de toxicidade aguda em mamíferos, a dose máxima utilizada neste experimento, foi extremamente alta e causou somente um indicio de toxicidade. Assim sendo, se faz necessária a realização de estudos complementares, para ter uma melhor base de como estes compostos agem no organismo, como o mesmo o combate, entre outros, para uma melhor compreensão e futura utilização destes compostos em produtos que possam vir a ser utilizados futuramente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8ª edição. 2015
- ABRAMOV, U., PUUSSAAR, T., RAUD, S., KURRIKOFF, K., VASAR, E. Behavioural differences between C57BL/6 and 129S6/SvEv strains are reinforced by environmental enrichment. **Neuroscience Letter**, v. 443, p. 223-227, 2008.
- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4º Ed., Allured Publ. Corp, Carol Stream, 2007.
- AGUIAR, L.R.F.; NASSIF, P.A.N.; RIBAS, C.A.P.M.; CZECZKO, N.G.; RIBAS, M.M.; MARINHO JÚNIOR, C.H.; WENDLER, E. Regeneração do fígado após hepatectomia parcial em ratos submetidos à hipertensão portal pós-hepática. **ABCD - Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v.24, n.2, p.144-151, 2011.
- ANGIOLETTI, A.S.; ZANCANARO FILHO, N.F.; OLIVEIRA, S.T. Análise morfométrica dos túbulos seminíferos de camundongos suplementados com óleo de alho. **Revista Fitos**, v.9, n.3, p.161-252, 2015.
- ALLEVA, E. Assessment of aggressive behavior in rodents. In: Conn MP, editor. *Methods in neurosciences: paradigms for the study of behavior*. **The New York Academy of Sciences**, p. 111-137, 1993.
- ALVES, M.S.; SANTOS, D.P.; SILVA, L.C.P.; PONTES, E.G.; SOUZA, M.A.A. Essential oils composition and toxicity tested by fumigation against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) pest of stored cowpea. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p.2387-2399, 2015.
- ARNDT, S.S., LAARAKKER, M.C., VAN LITH, H.A., VAN DER STAAY, F.J., GIELING, E., SALOMONS, A.R., VAN'T KLOOSTER, J., OHL, F. Individual housing of mice impact on behaviour and stress responses. **Physiology Behavior**, v. 97, p. 385-393, 2009.
- AZEVEDO, MFA; MEYER, A. Tremor essencial em guardas de endemias expostos a agrotóxicos: estudo de caso-controle. **Cadernos de Saúde Pública**, v.33, n.8, p.1-12, 2017.
- BAGAVAN, A.; RAHUMAN, A. A.; KAMARAJ, CH.; ELANGO, G.; ZAHIR, A. A.; JAYASEELAN, CH.; SANTHOSHKUMAR, T.; MARIMUTHU S. Contact and fumigant toxicity of hexane flower bud extract of *Syzygium aromaticum* and its compounds against *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). **Research Parasitology**, v. 109, p. 1329-1340, 2011.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, n. 46, p. 446-475, 2008.
- BEZERRA, J.W.A.; RODRIGUES, F.C.; COSTA, A.R.; BOLIGON, A.A.; DA ROCHA, J.B.T.; BARROS, L.M. Estudo químico-biológico do óleo essencial de *Lantana motevidensis* (chumbinho)(Spreng.) Briq. (*Verbenaceae*) contra *Drosophila melanogaster*. **Revista cubana de Plantas Medicinales**, v.22, n.1, p.1-15, 2018.
- BERGER, R.G. Biotechnology of flavours – the next generation. **Biotechnology letters**, v.31, p.1751-1659, 2009.
- BLYTHE, E.K.; TABANCA, N.; DEMIRCI, B.; BERNIER, U.R.; AGRAMONTE, N.M.; ALI, A.; CAN BASER, K.H.; KHAN, I.A. Composition of the essential oil of Pink Chablis bluebeard (*Caryopteris x clandonensis* 'Durio') and its biological activity against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Natural Volatiles Essential Oils**, v. 2; n. 1; p. 11-21, 2015.
- BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.16, n.4, p.279-293, 2007.

BRASIL. Resolução RDC Nº 2, de 15 de Janeiro de 2007. **Aprova o "Resolução - RDC Nº 2, DE 15 DE JANEIRO DE 2007"**. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/resolu%C3%A7%C3%A3o-2_2007.pdf =>. Acesso em: 04/12/2017.

BRASIL. **Decreto nº 11.794, de 8 de outubro de 2008**. Brasília, DF, outubro de 2008. Disponível em: "http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm". Acesso em: 20 de julho de 2018.

BRITO, Y. C. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Alagoas, Brasil, 2010.

BRITO, R.G.; SANTOS, P.L.; PRADO, D.S.; SANTANA, M.T.; ARAÚJO, A.A.S.; BONJARDIM, L.R.; SANTOS, M.R.V.; LUCCA JÚNIOR, W.; OLIVEIRA, A.P.; QUINTANS-JÚNIOR, L. Citronellol reduces orofacial nociceptive behaviour in mice - evidence of involvement of retrosplenial cortex and periaqueductal grey areas. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.112, p.215-221, 2013.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p. 223-53, 2004.

CANSIAN, R.L.; VANIN, A.B.; ORLANDO, T.; PIAZZA, S.P.; PUTON, B.M.S.; CARDOSO, R.I.; GONÇALVES, I.L.; HONAISSER, T.C.; PAROUL, N.; OLIVEIRA, D. Toxicity of clove essential oil and its ester eugenyl acetate against *Artemia salina*. **Brazilian Journal of Biology**, v.77, n.1, p.155-161, 2017.

CARBALLO, J.L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z.L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M.D. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, v.2, n. 17, 2002.

CARDOSO A. S. et al. O uso de microalgas para obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 542-549, 2011.

CARNESECCHI, S.; GONÇALVES, R.B.; BRADAIA, A.; ZEISEL, M.; GOSSÉ, F.; POUPON, M.F.; RAUL, F. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. **Cancerletters**, v.215, n.1, p.53-59, 2004.

CARVALHO, W.L.; MAIOLI, M.A.; MENDES, L.C.N.; ROZZA, D.B.; MINGATTO, F.E. Mecanismos da intoxicação do fígado de rato causada pelo gossipol. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.3, p.339-344, 2013.

CASTRO, H.G.; VELOSO, R.A.; CARDOSO, D.P.; RAMOS, A.C.C.; AGUIAR, R.W.S.; CHAGAS JÚNIOR, A.F. Efeito larvicida do óleo essencial do Manjerição (*Ocimum basilicum* L.) e do Capim Citronela (*Cymbopogon nardus* L.). CONVIBRA, 2015. Disponível em: (http://www.convibra.org/upload/paper/2015/84/2015_84_10784.pdf), acessado em: 14/05/2018.

CAVALCA, P.A.M.; LOLIS, M.I.G.A.; REIS, B.; BONATO, C.M. Homeopathic and larvicide effect of *Eucalyptus cinerea* essential oil against *Aedes aegypti*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 4, p. 835-843, 2010.

CHAGAS, A.C.S. Controle de parasitos utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n. 1, p. 156-160, 2004.

CHAVES, P.; FLORIANO, J.M.; ROSA, E.; AMARAL, Q.D.F.; ZURAVSKI, L.; OLIVEIRA, L.F.S. **Avaliação da toxicidade da *Euphorbia tirucalli* L. sobre o crustáceo *Artemia salina***. 9º SIEPE - Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 21-23 de novembro de 2017.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. **Organic Chemistry**, Estados Unidos: Oxford University Press, 2007.

COELHO, A.A.M; PAULA, J.E; ESPÍNDOLA, L.S. Atividade larvívica de extratos vegetais sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), em condições de laboratório. **Sociedade Entomológica do Brasil**, v.4, p.3, 2009.

CONSOLI, R.A.G.G.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 225p., 1994.

COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G.; ANGÉLICO, E.C.; PEREIRA, C.K.B.; SOUZA, E.O.; CALDAS, G.F.R.; SILVA, M.R.; SANTOS, N.K.A.; MOTA, M.L.; SANTOS, P.F. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n.4, p. 583-586, 2008.

COSTA, C.A.R.A.; BIDINOTTO, L.T.; TAKAHIRA, R.K.; SALVADORI, D.M.F.; BARBISARI, L.F.; COSTA, M. Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, n.9, p.2268-2272, 2011.

COSTA, A.V.; PINHEIRO, P.F.; RONDELLI, V.M.; QUEIROZ, V.T.; TULER, A.C.; BRITO, K.B.; STINGUEL, P.; PRATISSOLI, D. *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil on *Frankliniella schultzei* (Thysanoptera: Thripidae) and *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). **Ciência e Agrotecnologia**, v.37, n.2, p. 1840-1847, 2013.

CRIEL, G.R.J, WALGRAVE, H.R.M.A. Moulting staging in *Artemia salina* according to Drach's system. **Journal of Morphology**, v. 199, n. 1, p. 41-52, 1989.

CURTIS, C.; LINES, J.; LU, B.; RENZ, A. **Natural and synthetic repellents**. In: Curtis, C.F. (Ed.). *Appropriate Technology in Vector Control*. CRC Press, Florida. Chapter 4. 1989.

DAMINIANI, D.; DAMINIANI, D. Sinalização cerebral do Apetite. **Revista Brasileira Clínica Médica**, v.9, n.2, p.138-145, 2010.

DHAKE, K. P.; THAKARE, D. D. e BHANAGE, B. M. Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, n. 2, p. 71-83, 2013.

DRACH, P. **Mue et cycle d'intermue chez les crustacés Decapodes annuels**. Institute Oceanografie Paris, v.19, p. 103-391, 1939.

FAO. Morphology and life cycle. Disponível em: (<http://www.fao.org/docrep/003/W3732E/w3732e0m.htm#b4-4.1.2.1.%20Morphology%20and%20life%20cycle>) acessado em: 06/02/2018.

FERNANDES, A.P.; RIBEIRO, G.E.; RUFINO, L.R.A.; SILVA, L.M.; BORIOLLO, M.F.G.; OLIVEIRA, N.M.S.; FIORINI, J.E. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* na mutagênese "in vivo", e avaliação antimicrobiana, e interferência no crescimento e diferenciação celular "in vitro". **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 21, n. 3, p. 272-279, 2011.

FIGUEIREDO, A.C.; PEDRO, L.G.; BARROSO, J.G. Plantas aromáticas e medicinais - óleos essenciais e voláteis. **Revista Associação Portuguesa de Horticultura**, v. 114, n. 20, 2014.

FONSECA, L.D.; BASTOS, G.A.; COSTA, M.A.M.S.; FERREIRA, A.V..P.; SILVA, M.L.F.; VIEIRA, T.M.; MORAIS-COSTA, F.; OLIVEIRA, N.J.F.; DUARTE, E.R. Efeitos de extratos aquosos de *Caryocar brasiliense* em camundongos. **Acta Scientias Veterinariae**, v.44, p.1359, 2016.

FORATTINI, O.P. Identification of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, p. 244-245, 1986.

FRASER, C. M., BERGERON, J. A.; AIELLO, S. E. **Parafilaria Infection**. Inc. Oceano / Centrum, 4ª Ed., Spain, 1877-1884, 1991.

FURTADO, R.F.; LIMA, M.G.A.; NETO, M.A.; BEZERRA, J.N.S.; SILVA, M.G.V. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 843-847, 2005.

GOMES, A. dos S., SCIAVICO C.J. de S., EIRAS A.E. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)(Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39 (4), p. 327-332, 2006.

GOMES, P.R.B.; SILVA, A.L.S.; PINHEIRO, H.A.; CARVALHO, L.L.; LIMA, H.S.; SILVA, E.F.; SILVA, R.P.; LOUZEIRO, C.H.; OLIVEIRA, M.B.; FILHO, V.E.M. Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial do *Zingiber officinale* Roscoe (genjibre) frente ao mosquito *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 597-604, 2016.

GONÇALVES, V.M.; HUERTA, M.M.; FREITAG, R.A. Potencial de plantas acaricidas no controle de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, n. 1, p. 014-022, 2016.

GUILARDUCCI, N.V.; ARAÚJO, S.G.; PEREIRA, A.F.; RIBEIRO, R.I.M.A.; LIMA, L.A.R.S.; PINTO, F.C.H. Efeito da administração oral de extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) no desenvolvimento do Tumor sólido de Ehrlich. **Revista Fitos**, v.10, n.1, 2016.

GUSMÃO, N.M.S.; OLIVEIRA, J.V.; NAVARRO, D.M.A.F.; DUTRA, K.A.; SILVA, W.; WANDERLEY, M.M.A. Contact and fumigant toxicity and repellency of *Eucalyptus citriodora* Hook., *Eucalyptus staigeriana* F., *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Foeniculum vulgare* Mill. essential oils in the management of *Callosobruchus maculatus* (FABR.)(Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae). **Journal of Storea Products Research**, v.54, p.41-47, 2013.

HENZ, GP; ALCANTARA, FA; RESENDE, FV. **Produção orgânica de hortaliças: o produtor pergunta, a Embrapa responde**, Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, Embrapa Hortaliças, 2007.

IANNACONE, J.J.; ALVARIÑO, L.; VALLE RUESTRA, V.; IMAÑA, B.; ARGOTA, G.; FIMIA, F.; CARHUAPOMA, M.; CASTAÑEDA, L. Toxicidad de agentes antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre larvas de camarón salino *Artemia franciscana* (Crustacea: Artemiidae). **Revista de Toxicologia**, v.33, n.1, p.31-38, 2018.

ISMAN, M.B. **Plant essential oils for pest and disease management**. Crop Protection. v. 19, p. 603-608, 2000.

ISMAN, M.B. **Plant essential oils as green pesticides for pest and disease management**. In Agricultural Applications in Green Chemistry: Nelson, W.M., Ed.; ACS Symposium Series 887; American Chemical Society: Washington, DC, p. 41-51, 2004.

ISMAN, M.B. **Factors limiting commercial success of neem insecticides in North America and Western Europe**. In *Neem: Today and in the New Millennium*, ed. O Koul, S Wahab, Dordrecht: Kluwer Acad. p. 33-41, 2004.

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

ISMAN, M.B.; MIRESMALLI, S.; MACHIAL, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, p. 197-204, 2011.

KAKARAPARTHI PANDU S.; SRINIVAS, K.V.N.S.; KUMAR, J.K.; KUMAR, A.N.; RAJPUT, D.K.; SARMA, V.U.M. Variation in the essential oil content and composition of *Citronella (Cymbopogon winterianus* Jowitt.) in relation to time of harvest and weather conditions. **Industrial Crops and Products**, n. 61, p. 240-248, 2014.

KATIYAR, C.K. Ayurveda a modern perspective of Ayurveda. **Ayu**. v. 32, p. 304-305, 2011.

- KOIKE, H., IBI, D., MIZOGUCHI, H., NAGAI, T., NITTA, A., TAKUMA, K., NABESHIMA, T., YONEDA, Y., YAMADA, K. Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. **Behavioural Brain Research**, v. 202, p. 114-121, 2009.
- KUMAR, S.; WAHAB, N.; WARIKOO, R. Bioefficacy of *Mentha piperita* essential oil against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p.85-88, 2011.
- LÁSZLÓ, F. Óleos essenciais e seus usos. Disponível em:
http://laszlo.ind.br/userfiles/C3%93leos_essenciais_e_seus_usos.pdf Acesso em 15 de Janeiro de 2018.
- LEITE, B.L.S. **Estudo das propriedades farmacológicas e toxicológicas do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* em roedores**. 2012. 52f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Sergipe, Aracaju-SE, 2012.
- LI, C.Y.; DEVAPPA, R.K.; LIU, J.X.; LV, J.M.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, n.2, p.620-625, 2010.
- LIMA, A.B.; SILVA, P.I.C.; BASTOS JÚNIOR, J.C.; CARDOSO, A.S.; SILVA, L.M.; SILVA, R.C.; BARROS, C.A.L.; FREITAS, J.J.S. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) stapf (Capim-Marinho) em camundongos e ratos. **Pará Research Medical Journal**, v.1, n.1, p.1-7, 2017.
- LOUZADA, A. F.; RAMOS, H.; RODRIGUES, J. K.; SILVA, L. R.; GUERRA, M. D. O.; PETERS, V. M. Desenvolvimento embrionário em ratas tratadas com tracrolimus durante a fase pré – implantação. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 5, p. 219-23, 2008.
- LOZANO, P. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems. **Green Chemistry**, v. 12, p. 555-569, 2010.
- MACHADO, J.R., PEREIRA, G.N., OLIVEIRA, P.S., ZENEVICZ, M.C., LERIN, L., OLIVEIRA, R.R.B., CAVALCANTI, S.C.H., NINOW, J.L., OLIVEIRA, D. Synthesis of eugenyl acetate by immobilized lipase in a packed bed reactor and evaluation of its larvicidal activity. **Process Biochemistry**, v.58, p.114-119, 2017.
- MALONE, M.H. The pharmacological evaluation of natural products - general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **Elsevier**, v. 8, n.2, p.127-147, 1983.
- MARCO, C. A.; INNECCO, R.; MATTOS, S. H; BORGES, N.S.S.; NAGAO, E. O. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. **Horticultura Brasileira**, v.25, p. 429-432, 2007.
- MATTOS, S.H. **Estudos fitotécnicos da *Mentha arvensis* L. var. Holmes como produtora de mentol no Ceará**. 2000. 98p. UFC/CCA, Fortaleza. (Tese doutorado).
- McMURRY, J. **Química Orgânica**, 7ª.ed., Cengage Learning: São Paulo, 2011.
- MADEIRA, N.G.; MACHARELLI, C.A.; CARVALHO, L.R. Variation of the oviposition preferences of *Aedes aegypti* in function of substratum and humidity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 415-420, 2002.
- MENDES, M.P.G.; SOUZA, C.A.J. Aplicação de modelos animais na pesquisa biomédica experimental. **Revista de Saúde da Fiaciplac**, v.4, n.2, p.41-58, 2017.
- MEYER, B.N.; FRERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v.45, p. 31-34, 1982.

MIKULSKI, B.S.; BELUSSO, J.; CANSIAN, R.L.; ROMAN, S.S. Efeito toxicológico do óleo essencial de *Ruta graveolens* L. (Arruda) em camundongos Swiss. **Revista Perspectiva**, v.41, n.153, p.147-157, 2017.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **O Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p. 205-207, 2002.

NATURDATA. *Aedes aegypti*. Disponível em: (<http://naturdata.com/Aedes-aegypti-23773.htm>) acessado em: 20/07/2018.

NOLDIN, V.F.; CECHINEL, F.; VALDIR, M.; FRANCO, D. Chemical composition and biological activities of the leaves of *Cynara scolymus* L. (artichoke) cultivated in Brazil. **Química Nova**, v.26, n.3, p.331-334, 2003.

OECD **Guidelines for the testing of Chemicals**. TT Guideline, O Guideline, 2001.

OLIVEIRA, F. R. M. **Intoxicação em pequenos animais**. Relatório de final de curso. Instituto Politécnico de Viana do Castelo Escola Superior Agrária de Ponte de Lima. 2009.

OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, A. C. J.; SANTOS, A. P. B.; SILVA, B. V.; LACHTER, E. R.; PINTO, A. C. Síntese de Ésteres de Aromas de Frutas: Um Experimento para Cursos de Graduação dentro de um dos Princípios da Química Verde. **Revista Virtual de Química**, v.6, n.1, p.152-167, 2013.

OLIVEIRA, A.C.B.; OLIVEIRA, A.P.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, R.A.; SILVA, F.S.; REIS, S.A.G.B.; RIBEIRO, L. A. A.; ALMEIDA, J.R.G.S. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 244-249, 2013.

PADILHA DE PAULA, J.; GOMES-CARNEIRO, M.R.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, n.2, p.253-260, 2003.

PARRA, A.L., Comparative study of the assay of *Artemia salina* and the estimate of the medium lethal dose (LD50) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v.8., p.395-400, 2001.

PAROUL, N. **Síntese enzimática de ésteres aromatizantes a partir de diferentes substratos em sistema livre de solvente orgânico**. 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, 2011.

PATTANAIAK, B. N.; MANDALIA, H. C. Acetato de etilo: propriedades, processos e aplicações de produção - uma revisão. **International Journal of Research Atual e Revisão**, v. 3, n.12, p. 23-40, 2011.

PEREIRA, V.S.; SARAIVA, C.R.N.; ROCHA, J.E.; LOPES, J.C.; SILVA, M.K.N.; BANDEIRA, S.M.F.; COSTA, J.G.M. Estudo químico, toxicidade e atividade antibacteriana do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 2, 2014.

PEREIRA, L.G.; DE CAMPOS JÚNIOR, E.O.; COCCO, D.D.A. A influência do Açafrão (*Curcuma longa* L.) no controle biológico da Dengue. **GETEC**, v.5, n.9, p.46-56, 2016.

PORTO, K.R.A.; ROEL, A.R.; SILVA, M.M.; COELHO, R.M.; SCHELEDER, J.D.; JELLER, A.H. Atividade larvicida do óleo de *Anacardium humile* Saint Hill sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n. 6, p. 586-589, 2008.

RAMALHO, J.A.; GORGONIO, I.F.; LIRA, A.B.; ALVES, M.F.; RAMALHO, L.S.N.; CARDOSO, R.B.; DIAS, G.E.N.; GUEDES, E.J.R.C.E.; OLIVEIRA, K.M.; ALMEIDA, R.N.; DINIZ, M.F.F.M.; MEDEIROS, I.A. Toxicidade aguda em ratos wistar tratados com o extrato etanólico de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex Benth (*Fabaceae*) (EEDg). **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.18, n.4, p.279-286, 2014.

RAMOS, R.S.; RODRIGUES, A.B.L.; SOUTO, R.N.P.; ALMEIDA, S.S.M.S. Chemical Study, Antioxidant Analysis and Evaluation of the Larvicidal Potential against *Aedes aegypti* Larvae of essential Oil of *Ocimum basilicum* Linn. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2016.

RIBEIRO NETO, J.A.; ALVES, S.N.; SANTOS LIMA, L.A.R. Atividade de um óleo vegetal e seu éster metílico (FAME) sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.2, n.2, p.28-30, 2013.

ROCHA, M.F.G.; AGUIAR, F.L.N.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; TEIXEIRA, C.E.C.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M., PAIVA, M.A.N.; ZEFERINO, J.P.O.; MAFEZOLI, J.; SAMPAIO, C.M.S.; BARBOSA, F.G.; SIDRIM, J.J.C. Extratos de *Moringa oleifera* e *Vernonia* sp. sobre *Candida albicans* e *Microsporium canis* isolados de cães e gatos e análise da toxicidade em *Artemia* sp. **Ciência Rural**, v.41, n.10, p.1807-1812, 2011.

ROCHA, A.O.B.; PITA, J.C.L.R.; OLIVEIRA, K.M.; MOTA, C.A.X.; ESTEVAM, E.C.; VIANA, W.P.; SILVEIRA E SÁ, R.C.; DINIZ, M.F.F.M. Efeito toxicológico do extrato hidroalcoólico de *Pradosia huberi* Ducke em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Farmácia (RBF)**, v.93, n.3, pag. 371-378, 2012.

RODRIGUES, N.R.; NUNES, M.E.M., CUNHA, F.A.B.; PINHO, A.I.; POSSER, T.; FRANCO, J.L. **Atividade inseticida dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* e *Eugenia jambolana* em *Drosophila melanogaster***. Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, v. 4, n. 2, 2012.

RODRIGUES, K.A.F.; DIAS, C.N.; AMARAL, F.M.M.; MORAES, D.F.C.; MOUCHREK FILHO, V.E.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S. Molluscicidal and larvicidal activities and essential oil composition of *Cymbopogon winterianus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 10, p. 1293-1297, 2013.

ROSA, C.S.; VERAS, K.S.; SILVA, P.R.; LOPES NETO, J.J.; CARDOSO, H.L.M.; ALVES, L.P.L.; BRITO, M.C.A.; AMARAL, F.M.M.; MAIA, J.G.S.; MONTEIRO, O.S.; MORAES, D.F.C. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 19-26, 2016.

ROY, N.K.; DUREJA, P. New ecofriendly pesticides for integrated pest management. **Pest World**, v. 3, p. 16-21, 1998.

SANTOS, T.R.B.; CASTRO, N.A.; BRETANHA, L.C.; SCHUCH, L.F.D.; FREITAG, R.A.; NIZOLI, L.Q. Estudo in vitro da eficácia de Citronela (*Cymbopogon winterianus*) sobre carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Science and Animal health**, v.3, n.1, p.135-149, 2015.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de Chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a semana Epidemiológica 25 de 2018. **Boletim Epidemiológico**, v. 49, n. 32, p.1-14, 2018.

SILVA, N.C.; BARBOSA, L.; SEITO, L.N.; FERNANDES, A. Jr. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. **Natural Product Research**, v. 26, n. 16, p. 1510-1514, 2011

SIMMONS, C.P.; FARRAR, J.J.; VAN VINH CHAU, N.; WILLS, B. Dengue. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, p. 1423-1432, 2012.

SINGH, A.; KUMAR, A. Cultivation of Citronella (*Cymbopogon winterianus*) and evaluation of its essential oil, yield and chemical composition in Kannauj region. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 13, n. 2, p. 139-146, 2017.

STROH, J.; WAN, M.T.; ISMAN, M.B.; MOUL, D.J. Evaluation of the acute toxicity to juvenile Pacific coho salmon and rainbow trout of some plant essential oils, a formulated product, and the carrier. **Bulletin environmental contamination toxicology**, v. 60, p. 923-930, 1998.

SUCKOW, M.A., DANNEMAN, P., BRAYTON, C. **The Laboratory Mouse**. Boca Raton: CRC Press. 2001.

TAN, T.; CHEN, B.-Q.; YE, H. Enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl palmitate by lipase immobilized on fabric membranes in the batch reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 29, p. 41-45, 2006.

TAUIL, P.L. Urbanização e ecologia do dengue. **Caderno de Saúde Pública**, v. 17, p. 99-102, 2001.

TEIXEIRA, C.S.; VARGAS, R.; NUNES, C.C.; VALBORI, W.R.; ZAGO, H.B. **Toxicidade de óleos essenciais comerciais à *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, 1885) (Coleoptera: curculionidae)**. XXI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XVII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VII Encontro de Iniciação Científica à Docência - Universidade do Vale da Paraíba. 2017.

TROMBETA, D.C.; PIRES, J.E.P.; SANTOS, M.G.; SPADACCI-MORENA, D.D.; PIRES, F.A.P. Avaliação da toxicidade aguda oral do extrato hidroalcoólico das folhas de Pequi (*Caryocar brasiliense*) em camundongos. **Veterinária em Foco**, v.11, n.2, p.95-103, 2014.

TRONGTOKIT, Y.; RONGSRIYAM, Y.; KOMALAMISRA, N.; APIWATHNASORN, C. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 303-309, 2005.

UNIVERSITY of Hawaii. Botany Department. Poaceae (Gramineae). Disponível em: <<http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/po.htm> . Acesso em: 26 de março. 2018.

USP. GAVAGE. Disponível em: (www.usp.br/bioterio/Artigos/Procedimentos%20experimentais/Gavage.doc) acessado em: 26/07/2018.

VANIN, A.; ORLANDO, T.; PIAZZA, S.P.; PUTON, B.M.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, D.; PAROUL, N. Antimicrobial and antioxidant activities of clove essential oil and eugenyl acetate produced by enzymatic esterification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 4, p. 1286-1298, 2014.

VALADARES, M.C. Avaliação da toxicidade aguda: estratégia após a “Era do Teste DL”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, n. 3, v.2, p. 93-98, 2006.

VAN LOO, P.L., VAN DE WEERD, H.A., VAN ZUTPHEN, L.F.M. Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. **Laboratory Animal**, v. 38, p.178-188, 2004.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v.26, n.3, p.390-400, 2003.

VORIS, D.G.DA R.; AFONSO, C.H.V.; ALMEIDA FILHO, C.A.C.; CONCEIÇÃO O.J.FERNANDES; BRITO, D.Q.M.; MORAES, C.; LIMA, K.S.C.; LIMA, K.S.C.; MIRANDA, M.G.; AVELAR, K.E.S.; FRIEDE, R.; LIMA, A.L.S. Estudos etnofarmacológicos de óleos essenciais com atividade larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti*. **Semioses**, v.11, n.1, p. 86-94, 2017.

XIMENES, S.C.C. **Ensaios Toxicológicos pré-clínicos com extrato bruto seco das folhas de *Petiveria alliacea* Linné**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Recife PE, 2008.

WIJESEKERA, R.O.; JAYEWARDENE, A.L.; FONSEKA, B.D. Varietal differences in the constituents of citronella oil. **Phytochemistry**, v.12, n.11, p.2697-04, 1973.

World Health Organization — WHO. **The importance of pharmacovigilance: safety monitoring of medicinal products**. Geneva: World Health Organization, 2002.

World Health Organization (WHO). **Dengue Prevention and Control**. 2016

World Health Organization (WHO). **Fractional dose yellow fever vaccine as a dose-sparing option for outbreak response**. 2016