



FACULDADE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

TEMA:

**Avaliação da actividade larvicida dos extractos e do óleo essencial das
folhas de *Corymbia citriodora* sobre as larvas do mosquito *Anopheles
gambiae***



AUTOR: António Albino Elija

Maputo, Novembro de 2015



FACULDADE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

TEMA:

**Avaliação da actividade larvicida dos extractos e do óleo essencial das
folhas de *Corymbia citriodora* sobre as larvas do mosquito *Anopheles
gambiae***

AUTOR: António Albino Elija

SUPERVISORA: dra. Amélia Limónio Furvela

CO-SUPERVISOR: Prof. Doutor Cristiano Macuamule

Maputo, Novembro de 2015

DEDICATÓRIA

Ao Senhor meu Deus

Pela vida, saúde e protecção durante toda a minha formação académica

Aos meus pais Albino Manuel Elija e Luísa António Maeiene, pelo apoio incondicional, paciência, dedicação e carinho que fornecem, em todos os momentos da minha vida e por tudo que fizeram para que eu pudesse dar continuidade aos meus estudos desde os primeiros anos de escolaridade.

Ao meu irmão Celso Elija, pela inspiração, motivação, apoio incondicional e sobretudo por ter confiado, insistido e persistido sempre para que eu me dedicasse aos estudos.

Às minhas irmãs Aquina da Conceição, Benvinda Elias e Dulce Elias, pela motivação e por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida.

A minha namorada Quirinita André Uachisso, pela amizade, atenção, companheirismo, compreensão, carinho, incentivo, e por todo amor incondicional que me têm proporcionado.

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

(Augusto Cury)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pai todo-poderoso pela concepção do dom da vida e pela presença em todos os momentos da minha vida.

Agradeço à minha supervisora **dra. Amélia Furvela** pela atenção, paciência, ensinamentos e conselhos concedidos durante a realização deste trabalho.

Ao co-supervisor **Prof. Doutor Cristiano Macuamule**, pelo apoio, disponibilidade imediata, orientação, ensinamentos, visão crítica e atenção que tem demonstrado por mim.

À **Prof^a. Doutora Fung Dai Kin** pela revisão e correcção do trabalho.

À dra. Maria Rodolfo, dra. Zália, Sr. Basílio, Sr. Carmona, dona Natércia, pela disponibilização do material laboratorial sempre que necessitei para realização deste trabalho.

Agradeço aos funcionários do Laboratório de Entomologia do Instituto Nacional de Saúde, em especial à Chefe do laboratório dra. Ana Paula Abílio, aos investigadores e técnicos: dr. Ayubo Kampango, Sr. Matússe, Sr. Machoe, Dário e Gastão e Gulamo, pela colaboração e disponibilidade mostrada durante a realização dos ensaios larvicidas.

Aos meus colegas do curso: Basílio Rungo, Sérgio Chilengue, Egídio Muianga, dra. Josefina Gutemberg, Ancha Munira, dra. Denise Mathe, dr. Manuel Félix, dr. Salomão Langa, Celso Cossa, dr. Avelino Úamusse, dr. Erasmo Domingos, dr. Agnaldo Neve, Mário Ouana. E em especial aos do ramo de Química Pura: dr. Alberto Nhatave, dr. Isménio Nhaca, dr. Rui Mauiae, Leonardo Jossias, Nelma João, dra. Onízia Cumbane, Djesse Sitóe e Sambo João.

Aos funcionários do Departamento de Química: Sr. João Macuácuca, Sr. Hognélio, Sr. Ramiro, Sr. Américo, Sr. Néilson, pela partilha de conselhos e opiniões prestadas.

Aos meus amigos Elias Tembe, Moniz Gonçalves, Mussá Tualibudine, Júlio Massingue pela amizade de longos e vários anos.

A todos aqueles que de algum modo contribuíram durante a minha formação e não foram referidos, o meu muito obrigado.

DECLARAÇÃO DE HONRA

Declaro por minha honra que o presente Trabalho de Licenciatura foi concebido no Departamento de Química e desenvolvido por mim, com uso de recursos e fontes bibliográficas que se encontram referenciadas no trabalho.

Maputo, Novembro de 2015

(António Albino Elija)

RESUMO

O agravamento do processo de resistência dos mosquitos aos insecticidas, aliado ao reduzido número de compostos activos disponíveis para uso na saúde pública e o custo relativamente alto dos insecticidas sintéticos, evidenciam a necessidade da prospecção de pesquisas, a fim de fornecer medidas alternativas de controle, mais seguras e acessíveis contra doenças vectoriais. Este trabalho teve como objectivo avaliar a actividade larvicida dos extractos etanólico, etanólico 25% e do óleo essencial das folhas de *Corymbia citriodora* sobre as larvas do terceiro estágio de desenvolvimento do mosquito *Anopheles gambiae*, um dos principais vectores de parasitas da malária em Moçambique. Os extractos foram obtidos por maceração usando etanol 96% como solvente, durante 10 dias, sob agitação de dois em dois dias, enquanto o óleo essencial extraído quantitativamente através do método de hidrodestilação usando aparelho de Clevenger. Os testes fitoquímicos preliminares para identificação de metabólitos secundários basearam-se em reacções colorimétricas e de precipitação. As análises físico-químicas do óleo essencial foram realizadas para determinação da densidade, índice de refração, solubilidade em álcool, cor e aparência. Na actividade larvicida avaliou-se a toxicidade do extrato etanólico, extracto etanólico 25% e do óleo essencial sobre larvas do terceiro estágio de *Anopheles gambiae*. A concentração letal para matar 50% da população amostral (CL₅₀), o intervalo de confiança à 95% calculou-se através dos métodos de Reed-Muench e Pizzi respectivamente. O rendimento médio das extracções do óleo essencial foi de 1,64% (p/p). Os testes fitoquímicos realizados nos três extractos das folhas de *Corymbia citriodora* revelaram a presença de alcalóides, saponinas, taninos, fenóis e esteróides/triterpenóides. Os valores de CL₅₀ para o intervalo de confiança à 95% do extracto etanólico, etanólico 25% e óleo essencial foram de 120,50 ($\pm 2,23$), 136,46 ($\pm 2,22$), e 93,11 ($\pm 2,23$) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ respectivamente. Os resultados obtidos indicam que o óleo essencial, assim com os extractos etanólico e etanólico 25% das folhas de *Corymbia citriodora* são constituídos por substâncias que possuem actividade larvicida sobre as larvas de *Anopheles gambiae*.

ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
DECLARAÇÃO DE HONRA.....	iii
RESUMO.....	iv
ÍNDICE GERAL.....	v
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. OBJECTIVOS	3
2.1. Objectivo Geral	3
2.2. Objectivos Específicos	3
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Metabólitos secundários.....	4
3.2. Óleos essenciais.....	5
3.2.1. Composição química dos óleos essenciais.....	6
3.2.2. Factores que influenciam a composição de óleos essenciais	9
3.2.3. Plantas com propriedades insecticidas e larvicidas	10
3.3. Descrição e caracterização taxonómica de <i>Corymbia citriodora</i>	11
3.3.1. Óleo essencial de <i>Corymbia citriodora</i>	12
3.4. Métodos de extracção de óleos essenciais.....	14
3.4.1. Hidrodestilação	14
3.4.2. Maceração	15

3.5. Mosquitos	15
3.5.1. A larva.....	17
3.6. Malária	18
IV. METODOLOGIA	19
V. PARTE EXPERIMENTAL.....	21
5.1. Material vegetal.....	21
5.1.1. Colheita e identificação das folhas	21
5.2. Extracção do óleo essencial.....	23
5.3. Determinação das características físico-químicas do óleo essencial	24
5.4. Obtenção dos extractos.....	25
5.4.1. Testes fitoquímicos qualitativos	26
5.5. Avaliação da actividade larvicida dos extractos e óleo essencial de <i>C. citriodora</i> sobre as larvas de <i>Anopheles gambiae</i>	28
VI. RESULTADOS SUA ANÁLISE E DISCUSSÃO.....	32
6.1. Resultados	32
6.2. Discussão dos Resultados.....	43
VII. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	47
7.1. Conclusões	47
7.2. Recomendações.....	48
VIII. BIBLIOGRAFIA	49
ANEXOS	b

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Diversos compostos que constituem os óleos essenciais.....	8
Tabela 2: Principais constituintes do óleo essencial de <i>C. citriodora</i> e suas propriedades físico-químicas.....	13
Tabela 3: Resultados e rendimento obtidos durante as extracções do óleo essencial.....	32
Tabela 4: Parâmetros físico-químicos do óleo essencial obtido das folhas de <i>C. citriodora</i> .	33
Tabela 5: Resultados dos testes fitoquímicos do extracto não concentrado	33
Tabela 6: Resultados dos testes fitoquímicos dos extractos concentrados	33
Tabela 7: Mortalidade das larvas de <i>Anopheles gambiae</i> após 24 horas de exposição a várias concentrações do extracto etanólico das folhas da espécie vegetal <i>Corymbia citriodora</i>	34
Tabela 8: Mortalidade das larvas de <i>Anopheles gambiae</i> após 24 horas de exposição a várias concentrações do extracto etanólico 25% das folhas da espécie vegetal <i>Corymbia citriodora</i>	37
Tabela 9: Mortalidade das larvas de <i>Anopheles gambiae</i> após 24 horas de exposição a várias concentrações do óleo essencial das folhas da espécie vegetal <i>Corymbia citriodora</i>	39
Tabela 10: Valores de CL ₅₀ dos larvicidas testados ao Intervalo de confiança à 95% de Probabilidade	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos de alguns mono e sesquiterpenos oxigenados e não oxigenados	7
Figura 2: Exemplos de alguns constituintes principais de óleos essenciais	7
Figura 3: Exemplos de alguns fenilpropanóides encontrados nos óleos essenciais	8
Figura 4: Principais factores que podem influenciar no acúmulo e na composição dos óleos essenciais.....	9
Figura 5: Exemplos de alguns componentes presentes nos óleos essenciais com propriedades insecticidas.....	11
Figura 6: Imagem ilustrativa da planta Corymbia citriodora.....	12
Figura 7: Exemplos de algumas reacções do citronelal.....	14
Figura 8: Imagem ilustrativa do aparelho utilizado na hidrodestilação.....	15
Figura 9: Composição do mosquito.....	16
Figura 10: Representação esquemática do ciclo de vida dos mosquitos	16
Figura 11: Larvas de <i>Anopheles gambiae</i> do terceiro estágio.	17
Figura 12: Mapa de localização do distrito de Namaacha.	21
Figura 13: Esquema geral seguido para realização do trabalho.....	22
Figura 14: Ilustração do sistema de aparelhagem da extração do óleo essencial.	23
Figura 15: Sistema de vaporização rotativa utilizado.....	26
Figura 16: Ensaio da actividade larvicida realizados no Laboratório do INS.....	29

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Taxa de mortalidade das larvas do mosquito <i>Anopheles gambiae</i> expostas a seis concentrações diferentes do extracto etanólico das folhas de <i>Corymbia citriodora</i> , após 24 horas.....	35
Gráfico 2: Acumulado das larvas mortas, em função do logaritmo decimal das doses aplicadas do extracto etanólico das folhas de <i>Corymbia citriodora</i>	35
Gráfico 3: Acumulado das larvas vivas, em função do logaritmo decimal das doses aplicadas do extracto etanólico das folhas de <i>Corymbia citriodora</i>	36
Gráfico 4: Estimativa da CL ₅₀ do extracto etanólico das folhas de <i>Corymbia citriodora</i> , pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal das doses aplicadas.....	36
Gráfico 5: Taxa de mortalidade das larvas do mosquito <i>Anopheles gambiae</i> expostas a seis concentrações diferentes do extracto etanólico 25% das folhas de <i>Corymbia citriodora</i> , após 24 horas.....	37
Gráfico 6: Acumulado das larvas mortas, em função do logaritmo decimal das doses aplicadas do extracto etanólico 25% das folhas de <i>Corymbia citriodora</i>	38
Gráfico 7: Acumulado das larvas vivas, em função do logaritmo decimal das doses aplicadas do extracto etanólico 25% das folhas de <i>Corymbia citriodora</i>	38
Gráfico 8: Estimativa da CL ₅₀ do extracto etanólico 25% das folhas de <i>Corymbia citriodora</i> , pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal das doses aplicadas.	39
Gráfico 9: Taxa de mortalidade das larvas do mosquito <i>Anopheles gambiae</i> expostas a seis concentrações diferentes do óleo essencial das folhas de <i>Corymbia citriodora</i> , após 24 horas.....	40
Gráfico 10: Acumulado das larvas mortas, em função do logaritmo decimal das doses aplicadas do óleo essencial das folhas de <i>Corymbia citriodora</i>	40
Gráfico 11: Acumulado das larvas vivas, em função do logaritmo decimal das doses aplicadas do óleo essencial das folhas de <i>Corymbia citriodora</i>	41
Gráfico 12: Estimativa da CL ₅₀ do óleo essencial das folhas de <i>Corymbia citriodora</i> , pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal das doses aplicadas.....	41
Gráfico 13: Comparação entre as taxas de mortalidade das larvas do mosquito <i>Anopheles gambiae</i> dos extractos etanólico, etanólico 25% e óleo essencial.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>An. gambiae</i>	<i>Anopheles gambiae</i>
<i>An. Funestus</i>	<i>Anopheles funestus</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
<i>C. citriodora</i>	<i>Corymbia citriodora</i>
CS ₂	Dissulfeto de Carbono
CL ₅₀	Concentração letal para matar 50% da população amostral
DEET	N,N-dietil-m-toluamida
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
FM	Fórmula molecular
HIV	Vírus de Imunodeficiência Humana
INS	Instituto Nacional de Saúde
ISCTEM	Instituto Superior de Ciências e Tecnologia de Moçambique
ISO	International Standard Organization
MISAU	Ministério da Saúde
MM	Massa Molar
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
OE	Óleo essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNCM	Programa Nacional de Controle da Malária
PE	Ponto de ebulição
P. FULGOR	Ponto de fulgor
ppm	Partes por milhão

SD	Desvio padrão
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
UEM	Universidade Eduardo Mondlane
WHO	World Health Organization

ÍNDICE DE ANEXOS

Figura A 1: Reacção de hidrólise da acetilcolina e

Figura A 2 : Alguns experimentos laboratoriais realizados..... e

Tabela A1: Controle da mortalidade das larvas utilizando o extracto etanólico 25% c

Tabela A2: Controle da mortalidade das larvas utilizando o extracto etanólico c

Tabela A3: Controle da mortalidade das larvas utilizando o óleo essencial..... d

Tabela A4: Cálculo do Intervalo de Confiança pelo método de Pizzi no Excel..... f

I. INTRODUÇÃO

Em relação às doenças parasitárias do sangue de grande relevância na saúde pública, a malária é uma das que mais se destacam, estimativas globais indicam que a taxa de incidência da malária entre os anos 2000 e 2013 situou-se em cerca de 30%, com uma taxa de mortalidade de cerca de 47% (Rey, 1992 citado por Guisseve, 2006; WHO, 2014). Aproximadamente 82% dos casos de malária registam-se em África, com taxas de mortalidade estimadas em cerca de 90% por todo continente, sendo que as crianças com idade inferior a 5 anos e as mulheres grávidas representam os grupos mais vulneráveis (WHO, 2014).

Nos últimos anos o governo Moçambicano e a população em geral preocupam-se com a elevada incidência de casos de malária no país, que a cada ano se intensifica no verão e exige práticas e cuidados intensivos para o seu combate. A malária é um dos principais problemas de saúde pública em Moçambique, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a problemática da malária só será solucionada quando houver uma profunda mudança na infraestrutura sanitária das grandes cidades (MISAU, 2012).

A malária ou paludismo é uma doença de carácter infeccioso, cuja transmissão é feita através do contágio indirecto por inoculação viral, por meio do mosquito *Anopheles* fêmea. O mosquito adapta-se facilmente aos ambientes domésticos e urbanos sendo resistente à larvicidas e insecticidas. O registo de tantos casos da doença torna imprescindível a divulgação de seus sintomas e formas de prevenção (Freitas, 2007).

Segundo Roel (2001) citado por Freitas (2007), novas alternativas têm sido estudadas para o controle de pragas e vectores, principalmente devido ao impacto ecológico causado pelos pesticidas ao meio ambiente, bem como o aumento da resistência dos insectos devido ao uso indiscriminado dos insecticidas. Após constatar-se os graves problemas causados pelos insecticidas químicos tais como N,N-dietil-m-toluamida (DEET) e diclorodifeniltricloroetano (DDT), intensificou-se as investigações de plantas que apresentam propriedades insecticidas.

No que concerne às propriedades farmacológicas e insecticidas dos vegetais, segundo De Paula (2002), as plantas têm sido uma importante fonte de fármacos, bem como de insecticidas. Os princípios activos responsáveis por essas actividades são principalmente moléculas originárias dos metabólitos secundários que desempenham funções importantes na interacção da espécie vegetal com o ambiente, tais como proteger de doenças causadas por

microorganismos (fungos e bactérias), repelir insectos e atrair espécies úteis (insectos polinizadores).

Inicialmente, as próprias plantas eram utilizadas e, durante o decurso dos anos, os óleos essenciais começaram a ser extraídos. Porém, durante a idade média a destilação era usada para a preparação de água aromatizada e, quando o óleo aparecia na superfície da água era considerado uma impureza. Com o decurso do tempo, o produto de interesse das destilações tornou-se o óleo a partir dessa época começaram a desenvolver-se métodos de extracção dos óleos essenciais (Teisseire, 1994 citado por Falcão, 2012).

Óleo essencial refere-se a um grupo de substâncias naturais aromatizantes que são extraídos de diferentes órgãos das plantas através de um método específico. Os óleos essenciais são constituídos por numerosos compostos voláteis, como terpenos e sesquiterpenos, com tensões de vapores elevadas, odoríferos, insolúveis em água, porém solúveis em álcool e solventes apolares (Castro *et al.*, 2007 citado por Andrade 2011).

De acordo com Costa (2005); Murugan *et al* (2007) citados por Teles (2009), os óleos essenciais produzidos no metabolismo secundário das plantas, destacam-se como fontes naturais com actividade insecticida, larvicida e repelente.

O presente trabalho visa realizar o estudo fitoquímico preliminar das folhas da planta *Corymbia citriodora* de modo a identificar os principais compostos metabólicos secundários e testar a actividade larvicida dos extractos e do óleo essencial.

II. OBJECTIVOS

2.1. Objectivo Geral

- ✓ Avaliar a acção larvicida dos extractos e do óleo essencial das folhas de *C. citriodora* sobre as larvas do mosquito *Anopheles gambiae*, vector de parasitas da malária.

2.2. Objectivos Específicos

- ✓ Obter extractos etanólicos a diferentes concentrações por maceração e óleo essencial por hidrodestilação das folhas de *Corymbia citriodora*;
- ✓ Realizar testes fitoquímicos qualitativos para identificação das classes de metabólitos secundários existentes nos extractos das folhas de *C. citriodora*;
- ✓ Avaliar a actividade larvicida dos extractos etanólico, etanólico 25% e do óleo essencial das folhas de *C. citriodora* sobre as larvas do mosquito *Anopheles gambiae*.
- ✓ Determinar a concentração letal a 50% (CL₅₀) através do método de Reed-Muench.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Metabólitos secundários

Dá-se o nome de metabolismo ao conjunto de reacções químicas que ocorrem continuamente em cada célula. Os compostos químicos formados, degradados ou simplesmente transformados durante essas reacções são chamados de metabólitos. Essas reacções visam, principalmente, ao aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula: energia (ATP), poder redutor (NADPH) e biossíntese das substâncias essenciais à sua sobrevivência (macromoléculas celulares). Por serem considerados processos essenciais à vida e comuns aos seres vivos, têm sido definidos como integrantes do metabolismo primário. Segundo Martins *et al* (1994), metabólitos secundários são expressões da individualidade química dos seres biológicos e diferem de espécie em espécie, qualitativa e quantitativamente, sendo produzidos em pequenas quantidades. Gottlieb e Salatino (1987) citados por Santos (2012), em sua definição diferenciam os metabólitos primários dos secundários, como sendo os fornecedores de energia e matéria prima para a síntese dos metabólitos secundários, designados pelos autores como especiais.

Antigamente os metabólitos secundários eram considerados como dejectos celulares, porém, sabe-se hoje em dia que esses metabólitos são de larga importância e aplicação, podendo agir como sinais químicos que permitem à planta responder a estímulos ambientais, fornecer defesa contra herbívoros, patógenos, protecção contra radiação solar, ou ainda contribuir para a dispersão de pólen e sementes (Raven, *et al.*, 2001 citados por Kempt, 2009).

A composição quantitativa e qualitativa dos metabólitos secundários das plantas é alterada acentuadamente durante as fases de crescimento. A sua produção varia de acordo com a idade das plantas, o estado reprodutivo, as opções metabólicas determinadas pelo efeito de hormonas com ciclos de síntese de substâncias influenciada pelas estações ou horas do dia e com condições de cultivo (Castro *et al.*, 2010 citado por Santos, 2012).

O elevado número e a grande diversidade de metabólitos secundários vêm despertando interesse de pesquisadores de vários ramos da ciência, que encontram nestes metabólitos uma fonte promissora de novas moléculas potencialmente úteis ao homem. As rotas metabólicas secundárias não são muito generalizadas quanto as primárias, pois são activadas durante alguns estágios particulares do crescimento e desenvolvimento ou em períodos de estresse causados por limitações nutricionais ou ataques microbiológicos (Kempt, 2009).

De acordo com Taiz e Zeiger (1998), os metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos principais: terpenóides, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Os terpenóides são sintetizados a partir do Acetil Coenzima A (Acetil – CoA), via rota do ácido mevalónico. Os compostos fenólicos são substâncias aromáticas formadas via rota do ácido chiquímico ou ácido acético. Os compostos nitrogenados são sintetizados a partir de aminoácidos (Santos, 2012).

3.2. Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OEs) são metabólitos secundários produzidos pelas plantas, constituídos por misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas á temperatura ambiente. Os seus principais componentes são terpenóides e fenilpropanóides, sendo os terpenóides encontrados em maior percentagem (Simões *et al.*, 1999). As designações dadas a esta classe de óleos são devidas às suas características físico-químicas. São considerados óleos por apresentarem as seguintes características:

- ✓ São líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente;
- ✓ São voláteis;
- ✓ Possuem um aroma agradável e intenso.

Outras características que podem ser identificadas nos óleos essenciais são:

- ✓ *Sabor*: geralmente ácido e picante;
- ✓ *Coloração*: após extraídos, os óleos essenciais são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados;
- ✓ *Estabilidade*: normalmente os óleos essenciais são instáveis face a alguns factores como a presença de ar, luz, calor, humidade e metais;
- ✓ A maioria dos óleos essenciais possuem índices de refacção e são opticamente activos (Brito & Vitti, 2003).

Os óleos essenciais são produzidos como metabólitos secundários por plantas das famílias da Apiaceae, Asteraceae, Laureaceae, Fabeaceae, Myrtaceae, Myristaceae, entre outras, de zonas temperadas e quentes, como a região mediterrânea e em países tropicais. Eles podem ser sintetizados em todos os órgãos da planta: caule, folhas, sementes, frutos, raízes e até mesmo

na casca de frutos, sendo depois armazenados em estruturas específicas da planta, tais como células secretoras e epidérmicas (Bakkali, 2008 citado por Dias 2011).

É característico dos óleos essenciais a presença de terpenos, fundamentalmente monoterpenos e sesquiterpenos, mas também contêm grupos como ésteres, álcoois, aldeídos, cetonas, acetais e fenóis (Romero *et al.*, 2003). Os óleos essenciais podem apresentar actividade citotóxica, em geral, essa actividade é atribuída principalmente devido à presença de fenóis, aldeídos e álcoois. Esta actividade citotóxica é de grande importância nas aplicações dos óleos essenciais contra certos patógenos e parasitas de humanos ou animais (Sacchetti *et al.*, 2005 citado por Pereira, 2010).

3.2.1. Composição química dos óleos essenciais

Os óleos essenciais constituem misturas complexas com mais de 200 compostos que podem ser agrupados basicamente em duas fracções, designadamente fracção volátil e fracção não volátil. A fracção volátil constitui 90 a 95% do óleo, e a fracção não volátil corresponde entre 5 - 10% do resíduo do óleo (Furia e Belanca, 1975 citados por Vilaça *et al.*, 2005).

Os óleos essenciais são geralmente constituídos de compostos à base de carbono, hidrogénio, oxigénio e raramente nitrogénio e enxofre. São quimicamente bem diversificados, assim como apresentam diferentes modos de acção, contrariamente aos produtos quimicamente sintéticos que apresentam basicamente um único modo de acção, de acordo com Tyrrel (1990) citado por Vilaça Vilaça *et al* (2005), dois óleos essenciais dificilmente possuem o mesmo modo de acção, na **tabela 1** são apresentados os diversos compostos que constituem os óleos essenciais.

Dentre os diversos compostos orgânicos que compõem os óleos essenciais destacam-se predominantemente monoterpenos, sesquiterpenos (**figura 1**), fenilpropanóides, ésteres, aldeídos, cetonas e outros compostos de baixo peso molecular, característica esta que lhes fornece alta volatilidade e que permite a sua extracção através do arraste com vapor de água. Alguns terpenos como o limoneno, são encontrados em diferentes espécies vegetais, enquanto outros tais como aldeídos aromáticos e fenóis, ocorrem como componentes principais em algumas plantas, tal como é o caso do composto citronelal no óleo de eucalipto citriodora, o linalol no óleo de pau de rosa (**figura 2**). O aroma característico do óleo de

cravo, por exemplo, é devido ao eugenol, seu principal componente (Araújo, 1999; Zamboni, 1983 citados por Aguiar, 2003).

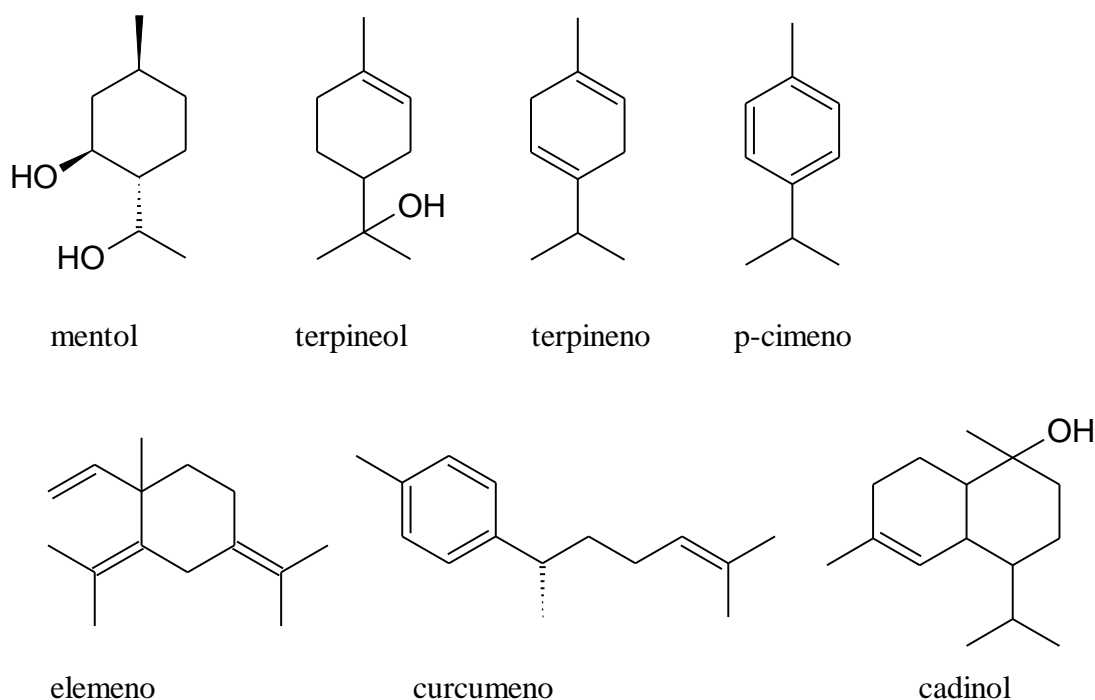


Figura 1: Exemplos de alguns mono e sesquiterpenos oxigenados e não oxigenados. (Fonte: Sarker e Nahar, 2007)

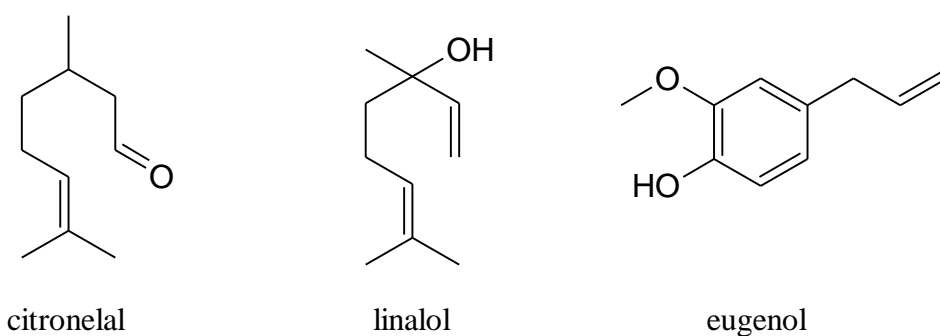


Figura 2: Exemplos de alguns constituintes principais de óleos essenciais. (Fonte: Sarker e Nahar, 2007)

A segunda classe de compostos de maior ocorrência nos óleos essenciais é dos fenilpropanóides. Na (figura 3), ilustram-se alguns dos representantes desta classe que se caracterizam estruturalmente pela presença de um anel aromático e uma cadeia lateral alifática, comumente com três átomos de carbono (Kempt, 2009).

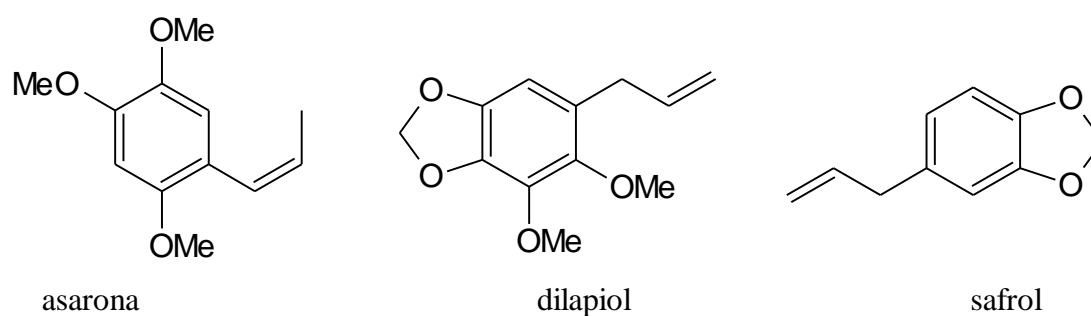


Figura 3: Exemplos de alguns fenilpropanóides encontrados nos óleos essenciais. (Fonte: Kempt, 2009)

Tabela 1: Diversos compostos que constituem os óleos essenciais

Classe de compostos	Tipo de substituinte (função)	Exemplos
<i>Monoterpenos</i>	Carbonetos	Mirceno, ocimeno, pinenos Terpinenos, falandrenos
	Álcoois	Geraniol, linalool, carveol Mentol, fenchol, lavandulol
	Aldeídos	Citral, neral, citronelal
	Cetonas	Cânfora, fenchona, carnova Pulegona, mentonas
	Ésteres	Acetato citronelil Mentil acetato isobornil
	Éteres	1,8 cineole, mentofurano
	Fenóis	Timol, carvacrol
	<i>Sesquiterpenos</i>	Carbonetos
Álcoois		Farnesol, cedrol, carotol
cetonas		Germacrone, turmerones
<i>Aromáticos</i>	Aldeídos	Cinanaldeido
	Álcoois	Álcool cinámico
	Fenóis	Chavicol, eugenol

Fonte: Dias, 2011.

3.2.2. Factores que influenciam a composição de óleos essenciais

A variação genética em populações naturais de plantas e animais é a razão da sua existência, perante as pressões do ambiente, sendo a matéria-prima da selecção natural. As plantas que ocorrem ao longo de um gradiente ambiental, por exemplo, variam quanto à constituição genética e actividade fisiológica, condicionadas pelo processo de selecção natural; embora pertencendo á mesma espécie, podem responder de modos diferentes ao grau de tensão ambiental. Existem alguns factores que podem influenciar na composição química de óleos essenciais tais como: luminosidade, humidade, radiação solar, vento, temperatura, estação do ano, período do dia em que a amostra foi colectada, altitude, ritmo circadiano, poluição atmosférica, como ilustrado na (figura 4) (Kempt, 2009).

O ambiente no qual a planta se desenvolve e o tipo de cultivo influenciam significativamente na composição química dos óleos essenciais. A temperatura, a humidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o período de ventos também exercem uma influência directa, sobretudo sobre as espécies que possuem estruturas histológicas de armazenamento na superfície. Nos vegetais em que a localização das estruturas histológicas é mais profunda, a qualidade dos óleos é mais constante (Simões *et al.*, 1999).

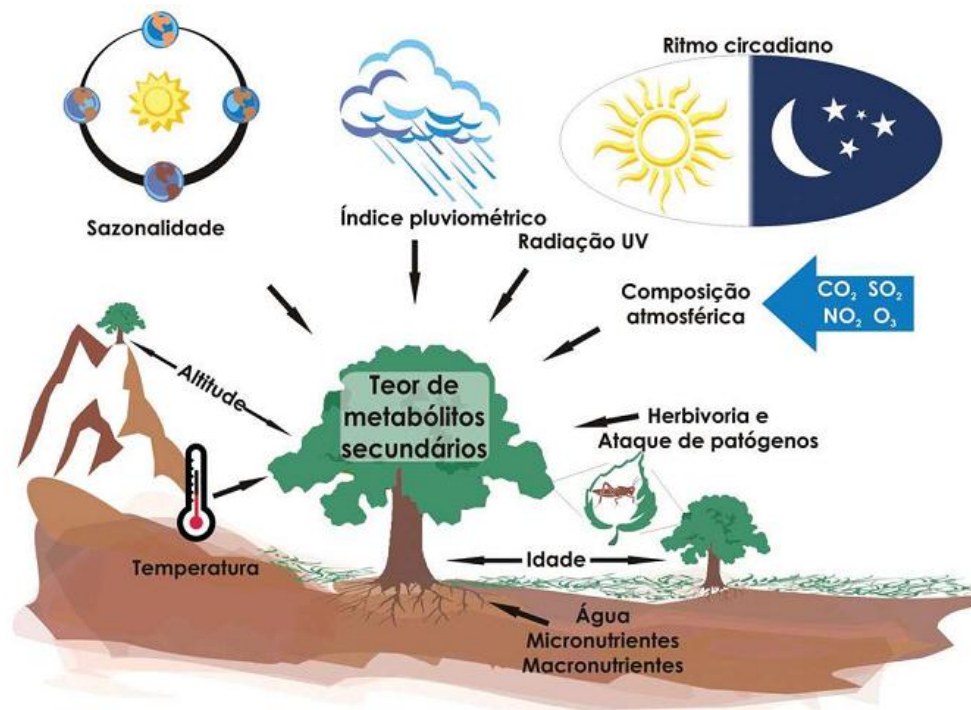


Figura 4: Principais factores que podem influenciar no acúmulo e na composição dos óleos essenciais. (Fonte: Kempt, 2009)

3.2.3. Plantas com propriedades insecticidas e larvicidas

O grande potencial insecticida dos extractos e óleos essenciais extraídos de plantas têm impulsionado o desenvolvimento de pesquisas direccionadas aos métodos alternativos de controle vectorial. Compostos químicos obtidos de plantas podem ser usados como larvicidas, repelentes e atractivos de oviposição (Kewka *et al.*, 2008 citados por Nascimento, 2014).

Em muitas plantas são encontradas substâncias com potencial actividade insecticida, larvicida ou repelente. Estas substâncias são geralmente voláteis e podem ser detectadas pelas antenas ou tarsos de insectos. Dentre elas destacam-se os monoterpenos (citronelal, linalol, mentol, α e β – pinenos, mentona, carvona e limoneno), os sesquiterpenos (farnesol, nerolidol), os fenilpropanóides (safrol, eugenol), entre outros. Os monoterpenos α e β - pineno (**figura 5**) estão presentes no óleo essencial extraído da resina de pinheiro, armazenado pela larva da vespa *Neodiprion* (Hymenoptera). Quando a lagarta é atacada por um predador, estas substâncias são libertas, causando repelência e fazendo com que ele desista do ataque (Panizzi e Para, 1991; Simões e Sptizer, 2004; Harborne, 1993 citados por Prado, 2007).

O citronelal pode ser encontrado em várias plantas como capim – citronela (*Cymbopogon nardus* R.), e em espécies de eucalipto, principalmente em *Eucalyptus citriodora* Hook pesquisas de Penteado (1999) citado por Prado (2007), recomendam o óleo de eucalipto no controle de pragas de produtos armazenados, como *Tribolium castaneum* (Herbs) e *S. zeamais*. Segundo estes autores, o citronelal e o 1,8 – cineol (**figura 5**) são responsáveis por esta actividade biológica.

Uma importante aplicabilidade das plantas e de seus subprodutos é no controle de formas larvárias de insectos vectores de parasitas humanos e animais. Até o ano de 1988, já haviam sido descritas mais de 140 espécies de plantas com acção tóxica sobre as larvas de mosquitos (Rozo *et al.*, 2008 citado por Nascimento, 2014).

Diversos compostos químicos destacam-se por apresentar acção larvicida, dentre eles pode-se citar as amidas, quinonas, flavonóides e rotenóides, os quais são amplamente encontrados em plantas pertencentes às famílias Rutaceae, Piperaceae e Boraginacea (Garcez *et a.l.*, 2013).

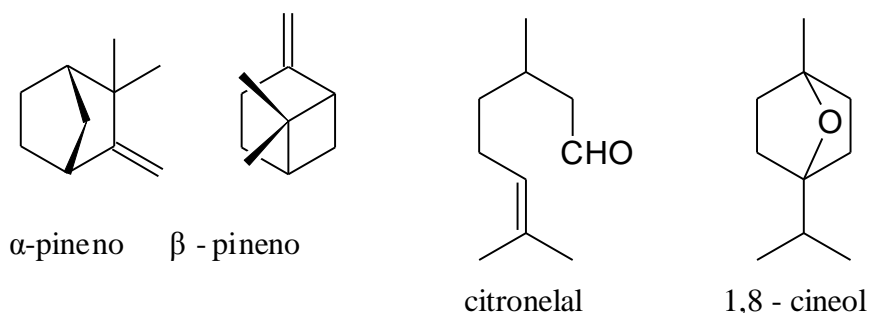


Figura 5: Exemplos de alguns componentes presentes nos óleos essenciais com propriedades insecticidas. (Fonte: Do Prado, 2007)

3.3. Descrição e caracterização taxonómica de *Corymbia citriodora*

A história do género *Eucalyptus* cita: “A descrição do género deu-se em 1788, por L’Heeretier de Brutelle, e publicada no *Sertum Angelicum*, 18, T. 20, Paris”. Em estudos baseados em características morfológicas e moleculares, o género *Eucalyptus* foi reclassificado, formando um novo género denominado *Corymbia*. Neste novo género foram incluídas 113 espécies, entre elas o *Eucalyptus citriodora* classificada como *Corymbia citriodora* (Hook) K.D. Hill & L.A.S. Johnson (Vieira, 2004). Neste trabalho a nomenclatura adoptada é *Corymbia citriodora* género *Corymbia*, secção *Ochraria*, série *Maculatae*.

C. citriodora, também conhecida como *Lemon scented gum* ou *spotted gum*, é uma planta originária da parte oriental do estado de Queensland, na Austrália, de porte médio, ocasionalmente podendo atingir 50 m de altura. Na fase adulta as suas folhas são alternadas, pecioladas, com comprimento variando de 8-16 cm e 0,5-1,8 cm de largura, apresentando uma tonalidade verde-clara. Os tipos de solo onde melhor se desenvolve são argilo-arenosos, avermelhados, bem drenados e profundos, podendo também adaptar-se em solos pobres. Quanto às exigências climáticas, esta espécie ocorre em regiões tropicais, com precipitação pluviométrica anual de 600 a 1000 mm (Dogenski, 2013).

Em Moçambique devido as condições de relevo favoráveis para o desenvolvimento da espécie *Corymbia citriodora* alguns autores recomendam a colheita de folhas da espécie no distrito de Namaacha, situado na região Sul da província de Maputo para obtenção de melhores rendimentos nas extracções de óleo essencial, pois plantas que encontram-se em altas altitudes produzem maiores quantidades de óleos essenciais.

O distrito possui pequenas planícies de 100 – 200 m nos vales aluvionares ao longo dos rios. A superfície de aplanção desce para Leste, com vários rios a cortar as montanhas no sentido Oeste-Este. Nestas superfícies os solos são basálticos avermelhados e pretos, com profundidades variáveis (Ministério Da Administração Estatal, 2005).

A **figura 6** representa uma planta de *C. citriodora* do distrito de Namaacha e sua classificação taxonómica.



Nome vernacular: Eucalipto

Reino: Plantae

Divisão: Angiospermae

Ordem: Myrtilales (Myrtaceae)

Família: Myrtaceae

Género: *Corymbia*

Espécie: *Corymbia citriodora*

Série: Maculatae

Figura 6: Imagem ilustrativa da planta *Corymbia citriodora*

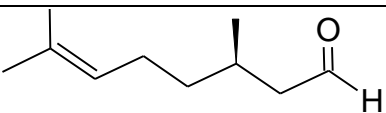
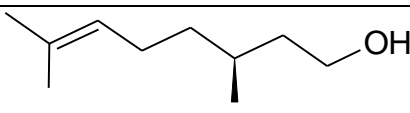
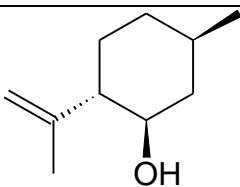
A colheita das folhas para extracção de óleo essencial (OE), inicia-se normalmente aos 18 meses após o plantio, quando as plantas se encontram com a altura variando entre 2 a 4 m. Durante a colheita das folhas retira-se aproximadamente dois terços da parte inferior da copa das árvores e o processo aplica-se geralmente em intervalos de 12 meses (Brito e Vitti, 2003).

3.3.1. Óleo essencial de *Corymbia citriodora*

O OE de *C. citriodora* é conhecido pelo seu agradável odor de limão, amplamente utilizado na indústria de fragrâncias, e têm como constituintes principais os terpenos oxigenados: o citronelal em maior quantidade e, em menor quantidade, o citronelol e isopulegol (Brito e Vitti, 2003). As características físico-químicas destes componentes são ilustradas na **tabela 2**.

Para além de seu uso como ingrediente para produção de fragrâncias, o OE de *C. citriodora* tem sido estudado devido ao seu amplo espectro de actividade biológica. O óleo pode ser utilizado como herbicida contra ervas daninhas como a *parthenium hysterophorus*, *Zea mays*, *Cassia accidentalis*, no controle de carrapatos pelo seu efeito repelente e acaricida. Combrink *et al* (2011) citados por Dogenski (2013), relataram que o OE de *C. citriodora*, na concentração de 2000 µL/L, foi 100% efectivo contra *Penicillium digitatum* FB001 e Q370 e *Botrytis cinérea*, causadores de deterioração em frutas.

Tabela 2: Principais constituintes do óleo essencial de *C. citriodora* e suas propriedades físico-químicas

	Citronelal	Citronelol	Isopulegol
<i>estrutur</i> <i>ra</i>			
<i>F. M.</i>	C ₁₀ H ₁₈ O	C ₁₀ H ₂₀ O	C ₁₀ H ₁₈ O
<i>M.M</i>	154,25	156,27	154,25
<i>P.E</i>	206,5°C	221,5°C	220°C
<i>Densid</i> <i>ade</i>	0,856	0,857	0,911
<i>%</i>	65-80	4,0 – 5,0	2,5 – 3,5
<i>P.</i> <i>fulgor</i>	78°C	79°C	78°C

Fonte: Dogenski, 2013

O citronelal (principal componente do óleo essencial de *C. citriodora*) é um composto de grande importância para sínteses químicas. Exemplos de algumas reacções do citronelal estão ilustradas na (**figura 7**). A sua redução com amálgama de sódio conduz à formação de citronelol (composto amplamente utilizado na indústria de fragrâncias). A oxidação com ozono conduz à formação de ácido 3 – metil adípico (um dos compostos utilizados para produção de fibras têxteis de poliamida) e acetona (composto amplamente utilizado como solvente) (Mussane, 1998).

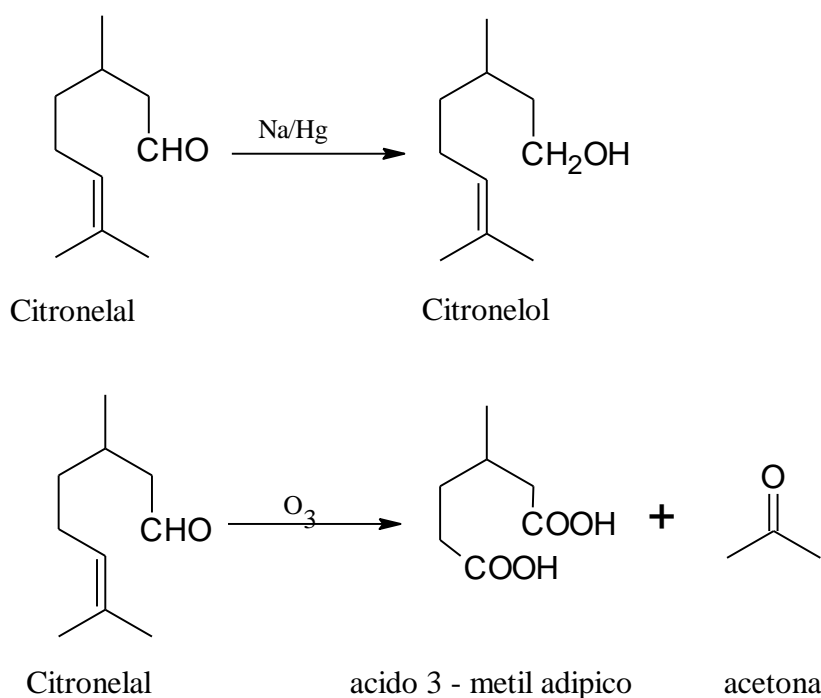


Figura 7: Exemplos de algumas reacções do citronelal. (Fonte: Mussane, 1998)

3.4. Métodos de extracção de óleos essenciais

Os métodos de extracção dos óleos essenciais variam de acordo com a região da planta em que o óleo se encontra, bem como com a finalidade de uso do mesmo. Os mais comuns são: enfloração, arraste por vapor de água (hidrodestilação), extracção com solventes orgânicos, prensagem (ou expressão) e extracção com CO₂ supercrítico (Craveiro, 1981; Chaar, 2000 citados por Teles, 2009). No presente trabalho o método adoptado para extracção do óleo essencial foi a hidrodestilação e maceração para obtenção dos extractos.

3.4.1. Hidrodestilação

A hidrodestilação é um dos métodos mais comuns utilizados para obtenção de OEs a partir de diferentes partes das plantas. O material botânico é submerso na água em um aparelho tipo Clevenger normal ou modificado (**figura 8**) e submete-se ao aquecimento. O vapor, o qual contém compostos voláteis, passa pelo condensador e chega a um compartimento onde o OE e a água são separados por decantação devido á diferença de densidades (Cazes, 2005 citado por Dogenski, 2013). O tempo de destilação varia de 2 – 4 horas. Os rendimentos da extracção do OE de *Corymbia citriodora* variam de 1 – 1,6% e a concentração de citronelal

varia de 65 – 85%, valores estes que dependem da época de colheita, condições ambientais, variabilidade genética, idade da folha e método de extracção (Brito e Vitti, 2003).



Figura 8: Imagem ilustrativa do aparelho utilizado na hidrodestilação.

3.4.2. Maceração

A maceração é uma técnica em que a extracção é realizada em um recipiente fechado, a temperatura ambiente, durante algum período (horas ou dias), sob agitação ocasional e não necessita da renovação do solvente extractor. Esta técnica também utiliza solventes em função da polaridade. Pela sua natureza, o método não conduz ao esgotamento da matéria-prima vegetal devido à saturação do líquido extractor (Rodrigues, 2002).

3.5. Mosquitos

Estima-se que existem mais de 2700 espécies de mosquitos em todo o mundo. Os géneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* são os que possuem mais mosquitos. Os mosquitos são insectos que em fase adulta são constituídos por três partes (**figura 9**): a cabeça onde se encontram todos os sensores; o tórax, onde estão fixadas as asas e as 6 pernas, e o abdómen. Eles são responsáveis pela transmissão da maior parte de doenças aos seres humanos, tais como a malária, a dengue, a febre-amarela, vírus do Nilo Ocidental entre outras (Melo, 2009).

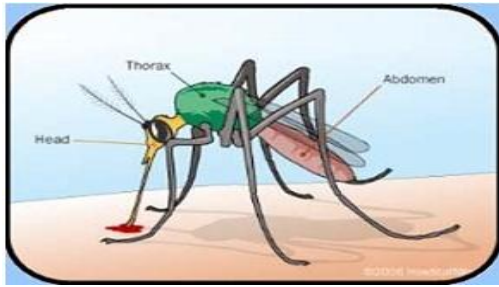


Figura 9: Composição do mosquito (Fonte: Melo, 2009)

Os *Culicidae* são dípteros de corpo delgado e pernas longas, cujo desenvolvimento pós – embrionário se faz por holometabolismo, ou seja, inclui metamorfose completa. Assim sendo apresentam vários estágios que se sucedem, designadamente: ovo, larva (com quatro estágios), pupa e a fase adulta (**figura 10**). Os três primeiros estágios são aquáticos e o último é terrestre (Forattini, 2002 citado por Miranda, 2005).

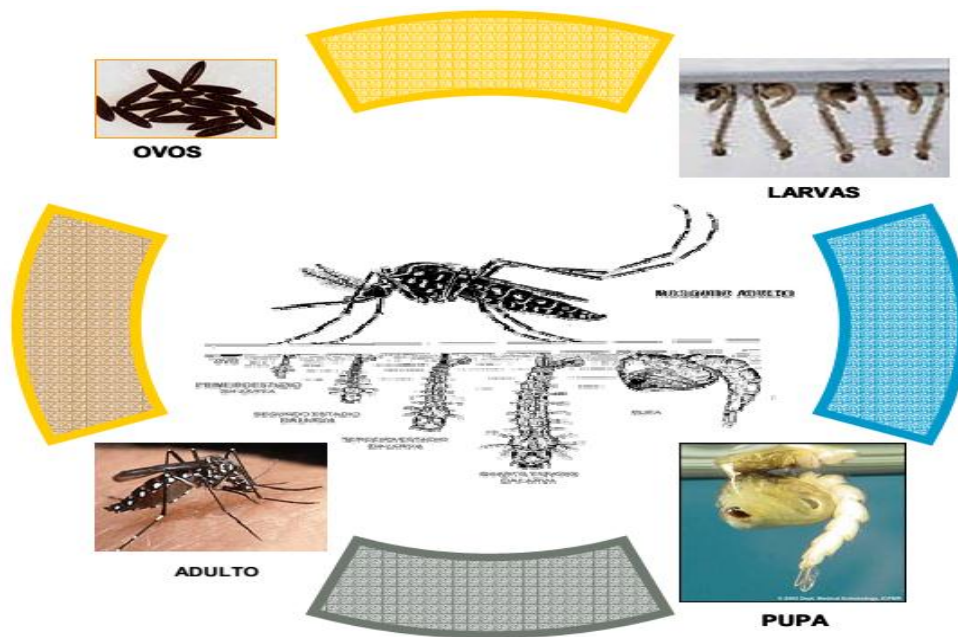


Figura 10: Representação esquemática do ciclo de vida dos mosquitos. (Fonte: Miranda, 2005)

Os ovos são depositados isoladamente ou aglomerados, e levam cerca de 1 a 2 dias a eclodir e quando eclodem geram larvas de ambiente aquático que passam por quatro estágios sucessivos. Após o quarto estágio, a larva sofre uma metamorfose para pupa, apesar da pupa

não se alimentar, ela mantém-se activa durante 1 a 2 dias após os quais o adulto emerge apresentando uma cabeça, tórax e abdómen distintos. Apenas as fêmeas picam os animais e humanos, utilizando para tal uma tromba comprida para se alimentarem do sangue necessário para a produção dos ovos. As fêmeas são as principais responsáveis pela transmissão de parasitas de doenças aos seres humanos (Melo, 2009).

3.5.1. A larva

As larvas (**figura 11**), alimentam-se de substâncias orgânicas, bactérias, fungos e protozoários existentes na água. A duração da fase larval, em condições favoráveis de temperatura (25 a 29 °C) e boa alimentação, pode atingir 10 dias, podendo prolongar-se por algumas semanas. As larvas movimentam-se em forma de serpente, em forma de “S”. São sensíveis a movimentos bruscos na água, movimentam-se com rapidez e refugiam-se no fundo do recipiente (Teles, 2009).



Figura 11: Larvas de *Anopheles gambiae* do terceiro estágio.

O género *Anopheles* é de grande importância médica por possuir inúmeras espécies de mosquitos transmissores da malária humana. Aproximadamente 24 das cerca de 400 espécies do género *Anopheles* são consideradas potenciais vectores da malária (De Paula, 2002).

3.6. Malária

A malária é uma doença causada por parasitas transmitidos através da picada de uma fêmea (*Anopheles*) de mosquito infectada. Os principais vectores da malária em Moçambique pertencem aos géneros *Anopheles funestus* e *gambiae*. O *Plasmodium falciparum* é o parasita mais frequente, sendo responsável por mais de 90% de todas as infecções maláricas, enquanto que infecções por *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale* são observados em 9% e 1% respectivamente. No corpo humano, os parasitas multiplicam-se no fígado, e em seguida infectam os glóbulos vermelhos (hemácias). Os sintomas da malária, incluem: febres, dores de cabeça, e vômitos, geralmente sentem-se entre 10 e 15 dias após a picada do mosquito (MISAU, 2012; WHO, 2014).

A World Health Organization (WHO, 2014) estima que cerca de 3.3 bilhões de pessoas, em 97 países estão em risco de contrair a malária. As pessoas que vivem em países pobres, particularmente em África, são mais susceptíveis á contrair a doença. Em Moçambique a malária é uma doença endémica, e toda população estimada em cerca de 26 milhões de habitantes está em risco de contraír a malária. Dados do Inquérito de Pesquisas de Mortalidade realizado em 2008 no País, indicam que a malária é responsável por cerca de 29% de todas as mortes, seguida pelo HIV-SIDA com taxa de mortalidade estimada em cerca de 27% (Malaria Operational Plan FY 2015).

Dados do Inquérito Demográfico da Saúde realizado em 2011, mostraram através de Testes Rápidos de Diagnóstico (RDTs), que as taxas de prevalência da malária são geralmente elevadas na região Norte do País cerca de 43,3 – 52,1% comparativamente as regiões Centro cerca de 30 – 37% de prevalência e Sul com cerca de 1,5 – 36,8% de prevalência. Sendo que as taxas de prevalência nas zonas rurais é três vezes maior que nas zonas urbanas (46% contra 16% respectivamente). Segundo dados divulgados pelo Ministério da Saúde, registaram-se no País no ano 2014 mais de 5.485.327 (cinco milhões quatrocentos e oitenta e cinco mil trezentos e vinte sete) casos de malária, dos quais causaram 3.245 (três mil duzentos e quarenta e cinco) óbitos (Malaria Operational Plan FY 2015).

O clima quente e húmido de Moçambique propicia condições ideais para proliferação e propagação de mosquitos e as altas temperaturas contribuem para o desenvolvimento dos parasitas da malária nos mosquitos. A transmissão da malária atinge o pico durante e após a estação chuvosa (Dezembro a Abril). A intensidade varia de ano para ano e de região para região, dependendo de factores como precipitação, altitude e clima (Nweti, 2010).

IV. METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado obedecendo á seguinte sequência:

a) *Revisão bibliográfica*

A revisão bibliográfica consistiu na recolha de informação em manuais, artigos científicos, revistas electrónicas e fontes da internet sobre a composição química do óleo essencial de *Corymbia citriodora*, métodos de extracção de óleos essenciais, doenças transmitidas pelos mosquitos, as características do mosquito transmissor, metodologias para avaliação da actividade larvicida.

b) *Parte Experimental*

O armazenamento das folhas, a preparação da amostra (folhas), extracção do óleo essencial, obtenção dos extractos e testes fitoquímicos qualitativos realizou-se no laboratório de Química da BUSCEP, Departamento de Química da Faculdade Ciências da Universidade Eduardo Mondlane.

i) *Colheita e identificação botânica da amostra*

A colheita da amostra foi feita no distrito de Namaacha, província de Maputo no dia 20 de Março de 2015. A identificação botânica foi feita no herbário do Instituto de Investigação Agronómica de Moçambique.

ii) *Preparação da amostra*

A preparação da amostra consistiu na selecção das folhas pela aparência visual, seguida da remoção do pecíolo.

iii) *Extracção do óleo essencial e preparação dos extractos para testes fitoquímicos*

A extracção do óleo essencial das folhas foi realizada pelo método de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger modificado durante 3 horas. Os extractos foram preparados usando a maceração sob agitação constante à temperatura ambiente e concentrados em vaporizador rotativo no laboratório de Química do ISCTEM.

iv) *Testes qualitativos de identificação de metabólitos secundários*

Para identificação de metabólitos secundários, foram realizados ensaios colorimétricos e de precipitação.

v) *Testes de actividade larvicida*

Os ensaios larvicidas foram realizados no laboratório de Entomologia do INS, com larvas do terceiro estágio de desenvolvimento de *Anopheles gambiae*.

c) Resultados, sua análise e discussão

Baseou-se na:

- ✓ Apresentação dos resultados na forma de gráficos e tabelas e sua análise, confrontando os resultados obtidos com os de estudos similares disponíveis na literatura consultada.

d) Elaboração do relatório final

O relatório engloba as informações obtidas na revisão bibliográfica sobre o tema em estudo, procedimentos seguidos na execução do trabalho laboratorial até apresentação e discussão dos resultados, respeitando o regulamento dos trabalhos de licenciatura do Departamento de Química da UEM.

V. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Material vegetal

5.1.1. Colheita e identificação das folhas

A colheita das folhas de *Corymbia citriodora*, foi feita no distrito de Namaacha, que dista a 76 quilómetros da cidade Maputo, situada a sudoeste da província de Maputo e que faz fronteira a Oeste com a República da África do Sul e Reino da Suazilândia, a Norte com o Distrito de Moamba, a Este com o Distrito de Boane e a Sul com o Distrito de Matutuíne (Ministério Da Administração Estatal, 2005). A colheita fez-se nas primeiras horas da manhã do dia 20 de Março de 2015, horário antes do início da incidência de raios solares, colheu-se as folhas dos rebentos das plantas e foram colocadas em sacos de ráfia para o transporte. A identificação foi feita pelo técnico Agrónomo Jossias no herbário do Instituto de Investigação Agronómica de Moçambique a partir de um exemplar da espécie (n° 23155).



Figura 12: Mapa de localização do distrito de Namaacha. (Fonte: www.telecentros.org.mz/namaacha.htm)

As folhas foram armazenadas à temperatura ambiente no Laboratório de Química da BUSCEP até ao dia do início das extracções.

O esquema que se segue (**figura 13**) ilustra a sequência do procedimento seguido para realização do trabalho:

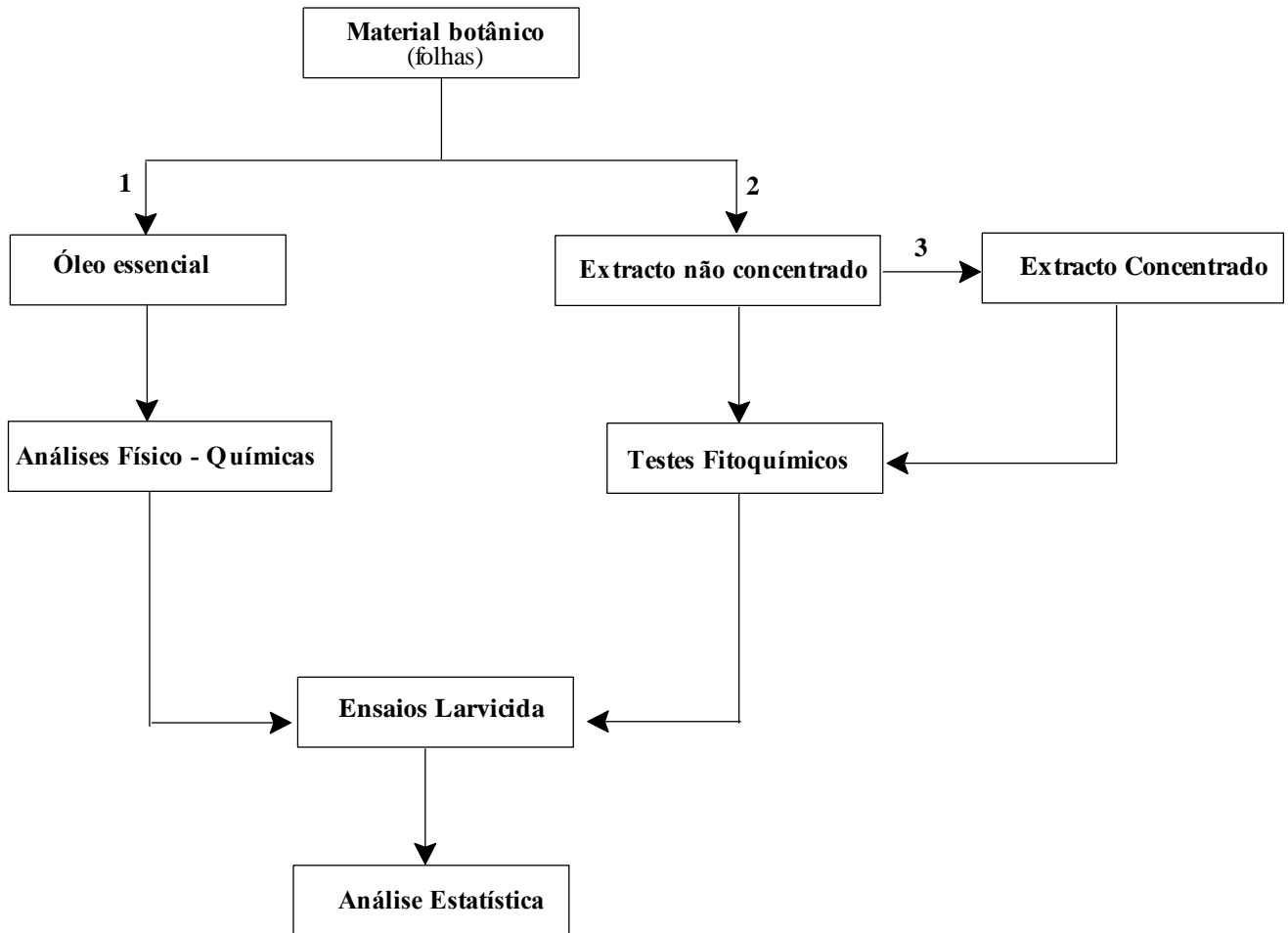


Figura 13: Esquema geral seguido para realização do trabalho.

Legenda:

- 1 – Extração por hidrodestilação em aparelho Clevenger durante 3 horas
- 2 - Maceração com etanol por 10 dias
- 3 – Concentração em Vaporizador Rotativo

5.2. Extracção do óleo essencial

Após a secagem as folhas foram seleccionadas pelo aspecto visual para serem submetidas à hidrodestilação usando um aparelho de Clevenger modificado sob aquecimento numa placa *J.R Selecta S.A* por um período de 3 horas. Para cada extracção usou-se 400g de folhas e 1.5 L de água. O óleo essencial obtido foi armazenado na geleira até ao dia da sua utilização. Na **figura 14** é ilustrado o sistema de extracção de óleo essencial utilizado.



Figura 14: Ilustração do sistema de aparelhagem da extracção do óleo essencial.

Determinação da percentagem de rendimento na obtenção do óleo essencial

Para determinação da percentagem de rendimento da extracção, o óleo foi pesado em uma proveta e usou-se a seguinte relação (**Fórmula 1**):

$$ROu(\%) = \frac{M}{Bm} \times 100$$

onde:

ROu = rendimento percentual em massa do óleo essencial

M = massa do óleo extraída [(*peso da proveta + óleo*) – *peso da proveta vazia*]

Bm = biomassa vegetal, (em gramas)

5.3. Determinação das características físico-químicas do óleo essencial

✓ Determinação da solubilidade do óleo essencial em álcool

Para determinar a solubilidade, foi colocado um volume constante do óleo essencial e adicionado volume proporcional da solução alcoólica previamente preparada a 80% (v/v) até á solubilização total (Oliveira, 2012).

✓ Cor e Aparência

Foi utilizado o método de observação directa, onde, sob um fundo branco, se comparou a cor do óleo essencial com cores conhecidas e para aparência fez-se a verificação do óleo no que diz respeito á sua transparência ou limpidez (Assunção, 2013)

✓ Determinação da densidade relativa $_{20}d^{20}$

A densidade relativa do óleo essencial de *C. citriodora* foi determinada através do método do picnómetro, através da comparação das massas de igual volume de amostra e água destilada a 20°C.

Colocou-se no picnómetro limpo e seco água destilada a 25°C. Ajustou-se a temperatura da amostra a 20°C e encheu-se o picnómetro com a amostra, removeu-se o excesso e pesou-se logo que a temperatura alcançou os 25°C (Romero *et al.*, 2003).

✓ Determinação do índice de refracção

O índice de refracção do óleo essencial de *C. citriodora* foi obtido utilizando o refractómetro Fisher Scientific, série 5645 a 25 °C. Para a medida foram usadas pipetas de Pasteur em vidro para adicionar as amostras do óleo essencial directamente sobre o prisma do refractómetro, realizando assim as leituras (Assunção, 2013).

5.4. Obtenção dos extractos

Passados três dias após a colheita das folhas de *C. citriodora*, foram submetidas à extracção por maceração a temperatura ambiente de modo a obter extractos etanólico, etanólicos 25 e 50%. Selecionou-se consoante o aspecto visual das folhas, escolheu-se as mais sadias e vistosas e seguiu-se o procedimento seguinte:

a) Extracto etanólico 25%

Pesou-se cerca 100g de folhas, introduziu-se no erlenmeyer, adicionou-se cerca de 125 ml de etanol 96% e perpez-se o volume final com água destilada. O erlenmeyer foi fechado e embrulhado com papel parafilm e armazenado num local sem interferência da luz por dez dias e durante esse período, a solução era agitada de dois em dois dias. Por fim a solução foi filtrada utilizando funil e papel de filtro (Whatman[®] 113) e concentrada em vaporizador rotativo (*Buchi R-210*) (**figura 15**) e posteriormente armazenada sob refrigeração até á realização dos ensaios.

b) Extracto etanólico 50%

Cerca de 100g de folhas foram pesadas e introduzidas no erlenmeyer, adicionou-se cerca de 250 ml de etanol 96% e perpez-se o volume final com água destilada. O erlenmeyer foi fechado e embrulhado com papel parafilm e armazenado num local sem interferência da luz por dez dias e durante esse período, a solução era agitada de dois em dois dias. Por fim a solução foi filtrada utilizando funil e papel de filtro (Whatman[®] 113) e concentrada em vaporizador rotativo (*Buchi R-210*) (**figura 15**) e posteriormente armazenada sob refrigeração até á realização dos ensaios.

c) Extracto Etanólico

Pesou-se cerca de 100g de folhas e adicionou-se cerca de 500 ml de etanol 96% ao erlenmeyer contendo as folhas. O erlenmeyer foi fechado e embrulhado com papel parafilm e armazenado num local sem interferência da luz por dez dias e durante esse período, a solução era agitada de dois em dois dias. Por fim a solução foi filtrada utilizando funil e papel de

filtro (Whatman[®] 113) e concentrada em vaporizador rotativo (Buchi R-210) (figura 15) e posteriormente armazenada sob refrigeração até á realização dos ensaios.



Figura 15: Sistema de vaporização rotativa utilizado.

5.4.1. Testes fitoquímicos qualitativos

Os extractos das folhas de *C. citriodora* foram submetidos a testes de classe de substâncias para esteróides/terpenóides, flavonóides, alcalóides, saponinas e taninos e fenóis (Zucula, 2011).

✓ *Teste de reconhecimento de Esteróides e Triterpenóides*

a) Reacção de Liebermann – Buchard

Os extractos foram dissolvidos em 1 ml de clorofórmio (CHCl_3) em tubos de ensaio. De seguida, filtrou-se a fracção clorofórmica e adicionou-se 1 ml de anidrido acético ($\text{H}_3\text{CCOOCOCH}_3$) e aproximadamente três gotas de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Alterações na coloração revelam a presença das seguintes substâncias: verde indica teste positivo para esteróides e vermelho positivo para terpenóides.

✓ ***Teste de reconhecimento de flavonóides***

a) **Teste de cianidina ou Schinoda**

Para o reconhecimento de flavonóides, o extracto foi dissolvido em aproximadamente 1 ml de etanol. De seguida, adicionou-se um pequeno pedaço de fita de magnésio, seguido de 0,5 ml de ácido clorídrico concentrado (HCl). O surgimento de coloração vermelha indica teste positivo para flavonóides.

✓ ***Teste de reconhecimento dos alcalóides livres***

Os alcalóides foram testados em todos os extractos, usando reagente de Mayer, Wagner e Hager.

Solubilizou-se uma pequena quantidade do extracto em 5 ml de HCl a 10%. Em seguida, dividiu-se a solução obtida em 3 tubos de ensaio e posteriormente adicionou-se em cada tubo os seguintes reagentes:

Tubo 1 – Adicionou-se 3 gotas de reagente de Mayer;

Tubo 2 – Adicionou-se 3 gotas de reagente de Wagner;

Tubo 3 – Adicionou-se 3 gotas de reagente de Hager.

Uma leve turbidez ou precipitado respectivamente branco, laranja e amarelo respectivamente, evidencia a possível presença de alcalóides.

✓ ***Teste de reconhecimento de saponinas***

As saponinas foram testadas usando o teste de espuma

a) **Teste de espuma**

Para identificação de saponinas, dissolveu-se uma pequena porção do extracto seco em 5 ml de água destilada. De seguida diluiu-se para 15 ml e agitou-se vigorosamente a solução durante dois minutos em um tubo fechado. Se a camada de espuma permanecer estável por mais de cinco minutos, o teste considera-se positivo para saponinas.

✓ ***Teste de reconhecimento de taninos e fenóis***

Os taninos foram testados usando os seguintes reagentes: acetato de chumbo a 10% e cloreto de ferro a 10%.

a) **Reacção com acetato de chumbo a 10%**

Em um tubo de ensaio contendo uma porção dos extractos adicionou-se 2 gotas de solução de acetato de chumbo a 10%.

A formação de uma turvação e aparecimento de um precipitado castanho e denso indica teste positivo.

b) **Reacção com cloreto de ferro a 10%**

Dissolveu-se uma pequena porção do extracto em 5 ml de água destilada, filtrou-se a solução e de seguida adicionou-se duas gotas de solução de cloreto férrico a 10%. A coloração azul ou verde indica presença de taninos consoante diferindo na estrutura, enquanto o surgimento de coloração variável entre azul e vermelho é indicativo de fenóis.

5.5. Avaliação da actividade larvicida dos extractos e óleo essencial de *C. citriodora* sobre as larvas de *Anopheles gambiae*

As larvas utilizadas para os ensaios pertencem à colónia do insectário do Instituto Nacional de Saúde de Moçambique (INS), onde são mantidas em uma sala nas seguintes condições de temperatura e humidade relativa: $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e $80 \pm 5\%$ respectivamente e alimentadas com mistura de cerelac com ração de peixe. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Entomologia do INS em Maputo.

a) ***Teste de toxicidade***

O teste foi realizado segundo a metodologia proposta por Assunção (2013), com algumas modificações. Inicialmente preparou-se as soluções - mãe dos extractos etanólico, etanólico 25% e do óleo essencial de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ através da pesagem de 50 mg dos extractos, assim como do óleo separadamente para uma solução formada por 49,75 ml de água destilada e 0,25 ml de etanol 96%. Destas soluções foram preparadas seis soluções para os extractos e o

óleo essencial separadamente nas concentrações 70, 90, 100, 120, 130 e 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Para cada concentração foram utilizadas 10 larvas do terceiro estágio de desenvolvimento de *Anopheles gambiae* e 20 ml de cada solução nas concentrações citadas. As larvas foram transferidas utilizando pipetas de Pasteur. Todos os ensaios foram realizados com três repetições para cada concentração testada. Como controle negativo foi utilizada uma solução formada por 49,75 ml de água destilada e 0,25 ml de etanol 96%. Na **figura 16** são ilustradas as larvas sendo transferidas e os recipientes (erlenmeyeres) contendo as soluções preparadas. Para quantificar a eficiência dos larvicidas propostos foram consideradas mortas as larvas que não reagiram ao toque após 24 horas do início do ensaio.



Figura 16: Ensaio da actividade larvicida realizados no Laboratório do INS.

Legenda: **(a)** – Larvas de *Anopheles gambiae* utilizadas nos ensaios sendo transferidas com auxílio de pipeta de Pasteur; **(b)** – larvas seleccionadas nos recipientes com as respectivas soluções nas concentrações testadas).

b) Resistência ao insecticida

O indicador da resistência é a susceptibilidade do vector que é obtida pelo número de vectores (mosquitos) mortos após exposição a uma determinada dose de um tipo de insecticida.

O critério padronizado pela OMS, para determinação da resistência é expresso a seguir:

- ✓ <80% de mortalidade dos mosquitos após o tempo de exposição: a resistência é confirmada;
- ✓ 80 – 98% de mortalidade dos mosquitos após o tempo de exposição: a resistência tem de ser confirmada através de ensaios adicionais;
- ✓ 98 – 100% de mortalidade de mosquito após o tempo de exposição: a população de mosquitos é considerada completamente susceptível (MISAU, 2009).

c) Análise estatística

Após os ensaios, organizou-se os resultados em uma tabela, com os valores das seis concentrações, log das mesmas, o número de larvas mortas após 24 horas (média de três repetições), número de larvas vivas após 24 horas (média de três repetições), o acumulado de larvas mortas (soma das células de mortos abaixo) e acumulado das larvas vivas (soma das células de vivos acima).

A análise dos dados foi realizada de acordo com o método de Reed-Muench (1938), o qual parte do princípio de que, um animal que sobreviva a uma certa dose, também irá sobreviver em qualquer outra dose menor que aquela, conseqüentemente o animal que morrer com uma certa dose, também irá morrer em doses maiores que a estabelecida. A partir de uma tabela contendo os dados de mortalidade para cada concentração testada, é construído um gráfico onde se observa uma curva para o acúmulo de animais mortos em cada concentração e outra curva para o acúmulo de sobreviventes. O ponto de intercepção entre as curvas é a Concentração letal 50%, pois nesse ponto o número de animais sobreviventes é igual ao número de mortos (Teles, 2009).

O intervalo de confiança foi calculado segundo o método de Pizzi (1950). Para o efeito, constrói-se um gráfico da percentagem de mortos vs log da dose. Em seguida determina-se o

valor de “R”, que é a diferença entre o log da dose que mata 75% das larvas e o log da dose que mata 25% das larvas. Calcula-se também a variável “h” que consiste na média das diferenças dos valores de log das doses. Com esses dados determina-se o log do erro padrão

(SE), através da seguinte relação (**Fórmula 2**): $(SE)^2 = 0,79 * h * \frac{R}{20}$

Finalmente, o valor do intervalo de confiança é igual $2 * 10^{SE}$.

O método matemático de Reed-Muench para cálculo de CL₅₀, determina-se com base na seguinte relação (**Fórmula 3**):

$$\text{Log CL}_{50} = \text{Log dose inferior} + B \times \text{Log } A$$

onde:

$$A = \frac{\text{Dose superior}}{\text{Dose inferior}}$$

$$B = \frac{50 - \% \text{ inferior}}{\% \text{ superior} - \% \text{ inferior}}$$

VI. RESULTADOS SUA ANÁLISE E DISCUSSÃO

6.1. Resultados

Os resultados obtidos durante as extracções e do cálculo do rendimento do óleo essencial estão apresentados na **tabela 3**.

Tabela 3: Resultados e rendimento obtidos durante as extracções do óleo essencial

Extracções	V (ml)	Tempo de extracção	Rendimento (% p/p)
1 ^a	7,2	3h	1,48
2 ^a	10	3h	2,10
3 ^a	7,3	3h	1,54
4 ^a	4,6	3h	0,93
5 ^a	9	3h	1,71
6 ^a	11	3h	2,21
7 ^a	11,5	3h	2,27
8 ^a	7	3h	1,25
9 ^a	7	3h	1,42
10 ^a	9	3h	1,76
11 ^a	10	3h	1,98
12 ^a	6	3h	1,21
13 ^a	7	3h	1,25
14 ^a	5	3h	0,92
15 ^a	4,5	3h	0,81
16 ^a	5,5	3h	0,98
17 ^a	6	3h	1,20
18 ^a	9,5	3h	1,86
19 ^a	9,3	3h	1,74
20 ^a	7	3h	1,24
21 ^a	6	3h	1,08
22 ^a	10	3h	2,00
23 ^a	10	3h	2,07
24 ^a	9	3h	1,71
25 ^a	9	3h	1,67
26 ^a	7	3h	1,32
27 ^a	7	3h	1,32
28 ^a	9	3h	1,77
29 ^a	7,5	3h	1,34
30 ^a	5	3h	0,87
31 ^a	14	3h	2,83
32 ^a	13	3h	2,57
33 ^a	12	3h	2,42
34 ^a	13	3h	2,46
35 ^a	12	3h	2,40
Média	8,5	3	1,64
SD	2,56		0,54

✓ **Parâmetros físico-químicos**

Na **tabela 4** estão apresentados os resultados dos parâmetros físico-químicos do óleo essencial.

Tabela 4: Parâmetros físico-químicos do óleo essencial obtido das folhas de *C. citriodora*

Propriedades físico-químicas	Óleo essencial estudado	Óleo essencial <i>C. citriodora</i> (ISO 3044-1974)
Densidade relativa	0,866	0,858 – 0,877
Solubilidade em álcool 80% (v/v)	1:2	1:2
Índice de refração	1,4576	1,4500 – 1,4590
Cor	Incolor	Incolor
Aparência	Límpido	Límpido

✓ **Testes fitoquímicos**

Os resultados dos testes fitoquímicos qualitativos para os extractos não concentrados e extractos concentrado estão apresentados nas **tabelas 5 e 6** respectivamente:

Tabela 5: Resultados dos testes fitoquímicos dos extractos não concentrados

Classe de metabólitos	Teste	Extractos		
		EE25%	EE50%	EE
Alcalóides	<i>Hager</i>	-	+	+
	<i>Mayer</i>	-	-	-
	<i>Wagner</i>	-	-	-
Esteróides e Triterpenóides	<i>Liebermann</i>	+	+	+
	<i>Buchard</i>	-	-	-
Flavonóides	<i>Schinoda</i>	-	-	-
Saponinas	<i>Espuma</i>	+	-	-
Taninos	<i>Acetato de chumbo</i>	-	-	+
	<i>Cloreto de ferro</i>	-	+	+
Fenóis	<i>Acetato de Chumbo</i>	-	-	+
	<i>Cloreto de ferro</i>	+	+	+

EE25% – extracto etanólico 25%; EE50% - extracto etanólico 50%; EE – extracto etanólico 100%. (+) = presente; (-) = ausente

Tabela 6: Resultados dos testes fitoquímicos dos extractos concentrados

Classe de metabólitos	Testes	Extractos		
		EE25%	EE50%	EE
Alcalóides	<i>Hager</i>	+	+	+
	<i>Mayer</i>	-	-	-
	<i>Wagner</i>	-	-	-
Esteróides Triterpenóides	<i>Liebermann</i>	+	+	+
	<i>Buchard</i>			
Flavonóides	<i>Schinoda</i>	-	-	-
Saponinas	<i>Espuma</i>	-	+	-
Taninos	<i>Acetato de chumbo</i>	+	+	+
	<i>Cloreto de ferro</i>	+	+	+
Fenóis	<i>Acetato de Chumbo</i>	-	+	+
	<i>Cloreto de ferro</i>	+	+	+

EE25% – extracto etanólico 25%; EE50% - extracto etanólico 50%; EE – extracto etanólico 100%. (+) = presente; (-) = ausente

✓ *Actividade larvicida*

Os resultados da actividade larvicida do extracto etanólico das folhas de *Corymbia citriodora* sobre as larvas do mosquito *An. gambiae* estão apresentados na **tabela 7**.

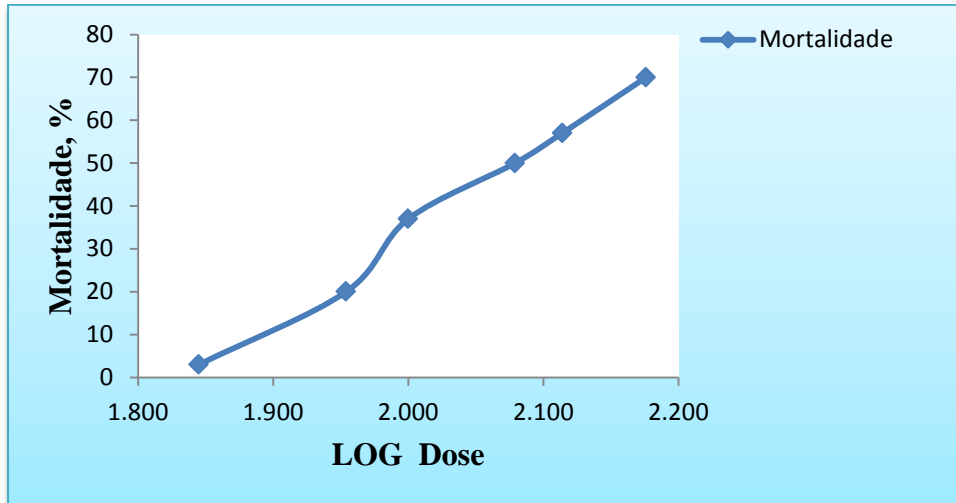
Tabela 7: Mortalidade das larvas de *Anopheles gambiae* após 24 horas de exposição a várias concentrações do extracto etanólico das folhas da espécie vegetal *Corymbia citriodora*

Dose µg/ml	Log dose	Mortos	Vivos	Acumulados mortos	Acumulados vivos	% Mortalidade
150	2,176	7,0	3,0	23,7	3,0	70
130	2,114	5,7	4,3	16,7	7,3	57
120	2,079	5,0	5,0	11,0	12,3	50
100	2,000	3,7	6,3	6,0	18,6	37
90	1,954	2,0	8,0	2,3	26,6	20
70	1,845	0,3	9,7	0,3	36,3	3

Número de larvas (n = 10)

A taxa de percentagem da mortalidade das larvas usando o extracto etanólico é apresentada no **gráfico 1**.

Gráfico 1: Taxa de mortalidade das larvas do mosquito *Anopheles gambiae* expostas a seis concentrações diferentes do extracto etanólico das folhas de *Corymbia citriodora*, após 24 horas em função do logaritmo decimal de cada dose testada, segundo método Reed-Muench.



A seguir são apresentados os resultados que representam as curvas de larvas acumuladas mortas (**gráfico 2**) e acumulados vivos (**gráfico 3**), posteriormente é apresentada a Concentração letal 50% (CL_{50}) para o extracto etanólico das folhas de *Corymbia citriodora* (**gráfico 4**).

Gráfico 2: Acumulado das larvas mortas, em função do logaritmo decimal das doses aplicadas do extracto etanólico das folhas de *Corymbia citriodora* pelo método Reed-Muench.

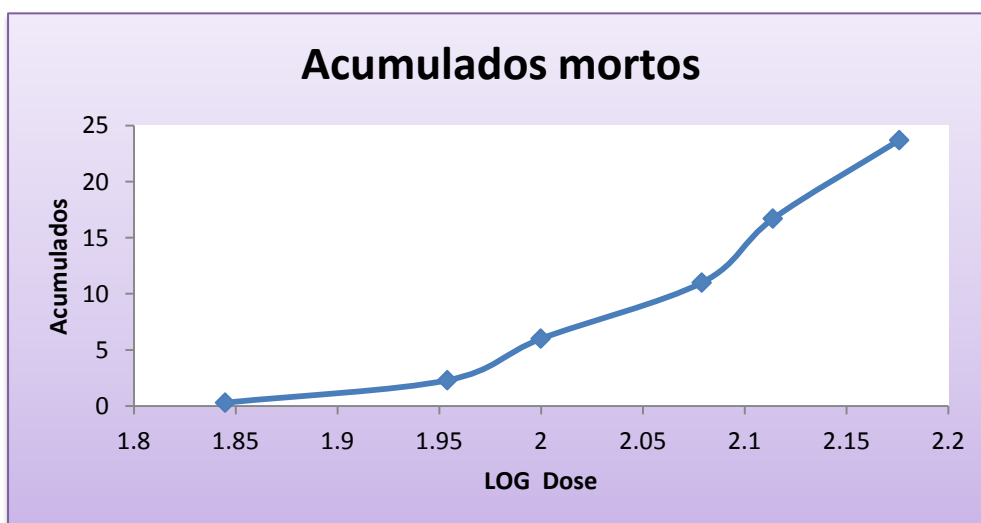


Gráfico 3: Acumulado das larvas vivas, em função do logaritmo decimal das doses aplicadas do extracto etanólico das folhas de *Corymbia citriodora* pelo método Reed-Muench.

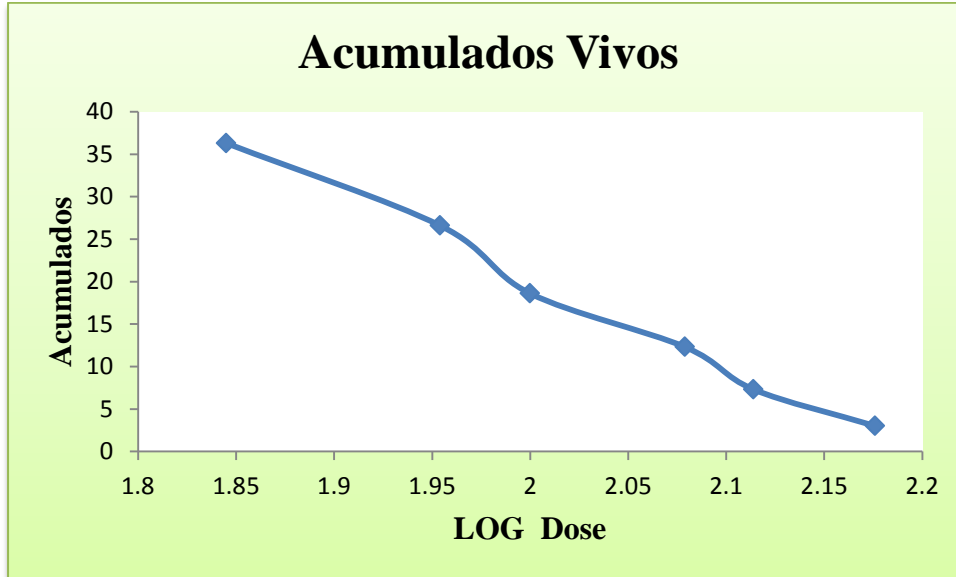
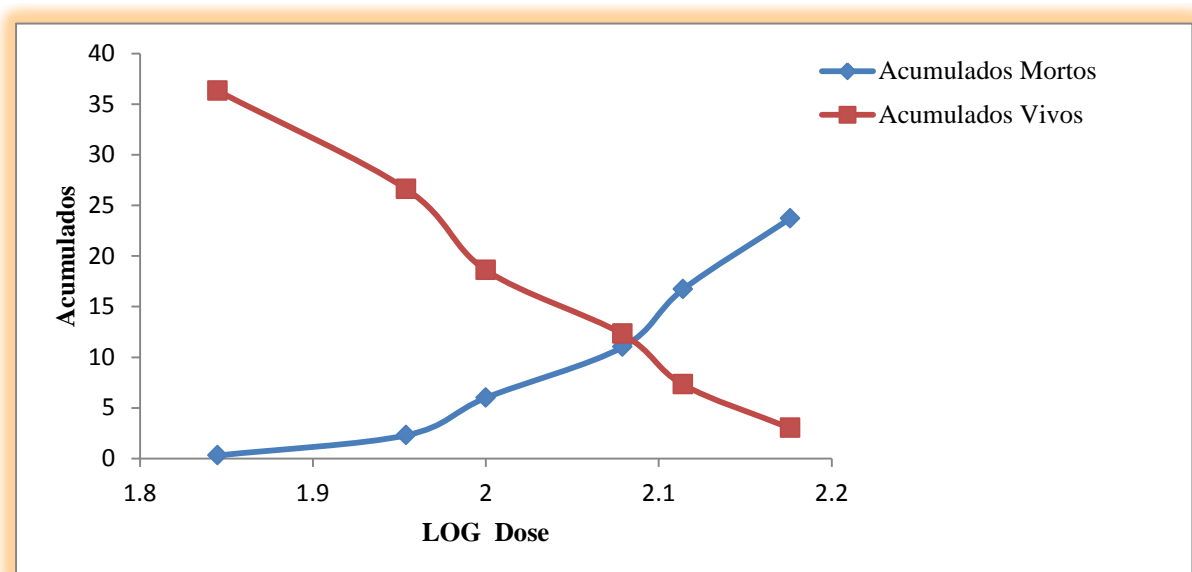


Gráfico 4: Estimativa da CL_{50} do extracto etanólico das folhas de *Corymbia citriodora*, pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal das doses aplicadas. O ponto de intersecção das duas curvas é a dose letal 50% requerida pelas larvas testadas.



Os resultados da actividade larvicida do extracto etanólico 25% das folhas de *Corymbia citriodora* sobre as larvas do mosquito *An. gambiae* estão apresentados na **tabela 8**.

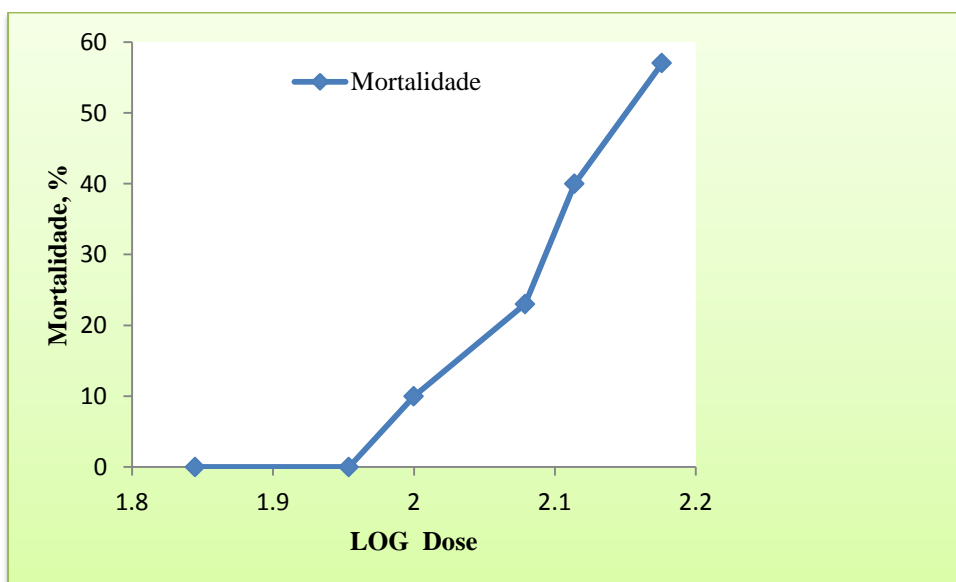
Tabela 8: Mortalidade das larvas de *Anopheles gambiae* após 24 horas de exposição a várias concentrações do extracto etanólico 25% das folhas da espécie vegetal *Corymbia citriodora*

Dose µg/ml	Log dose	Mortos	Vivos	Acumulados mortos	Acumulados vivos	% Mortalidade
150	2,176	5,7	4,3	13	4,3	57
130	2,114	4,0	6,0	7,3	10,3	40
120	2,079	2,3	7,7	3,3	18	23
100	2,000	1,0	9,0	1,0	27	10
90	1,954	0,0	10,0	0,0	37	0
70	1,845	0,0	10,0	0,0	47	0

Número de larvas (n = 10)

A taxa de percentagem da mortalidade das larvas usando o extracto etanólico 25% é apresentada no **gráfico 5**.

Gráfico 5: Taxa de mortalidade das larvas do mosquito *Anopheles gambiae* expostas a seis concentrações diferentes do extracto etanólico 25% das folhas de *Corymbia citriodora*, após 24 horas em função do logaritmo decimal de cada dose testada, segundo método Reed-Muench.



A seguir são apresentados os resultados que representam as curvas de larvas acumuladas mortas (**gráfico 6**) e acumulados vivos (**gráfico 7**), posteriormente é apresentada a

Concentração letal 50% (CL₅₀) para o extracto etanólico 25% das folhas de *Corymbia citriodora* (gráfico 8).

Gráfico 6: Acumulado das larvas mortas, em função do logaritmo decimal das doses aplicadas do extracto etanólico 25% das folhas de *Corymbia citriodora* pelo método Reed-Muench.

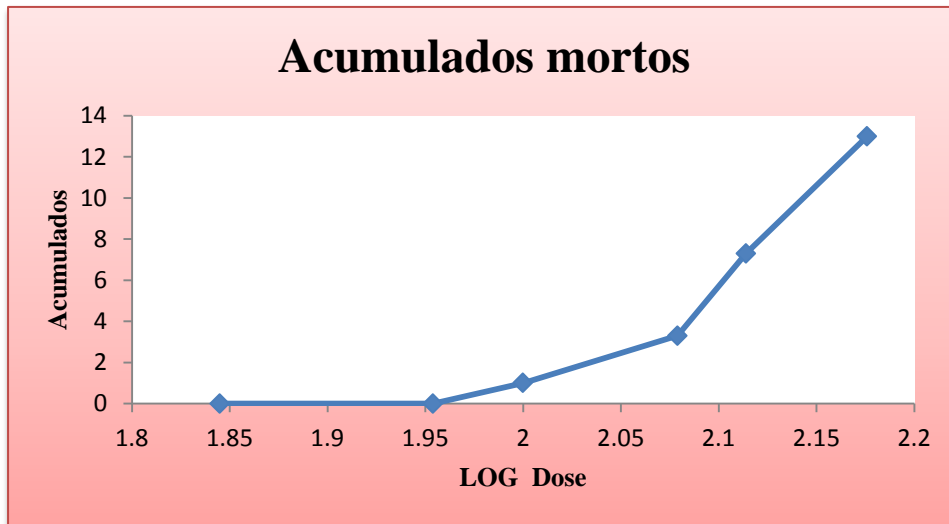


Gráfico 7: Acumulado das larvas vivas, em função do logaritmo decimal das doses aplicadas do extracto etanólico 25% das folhas de *Corymbia citriodora* pelo método Reed-Muench.

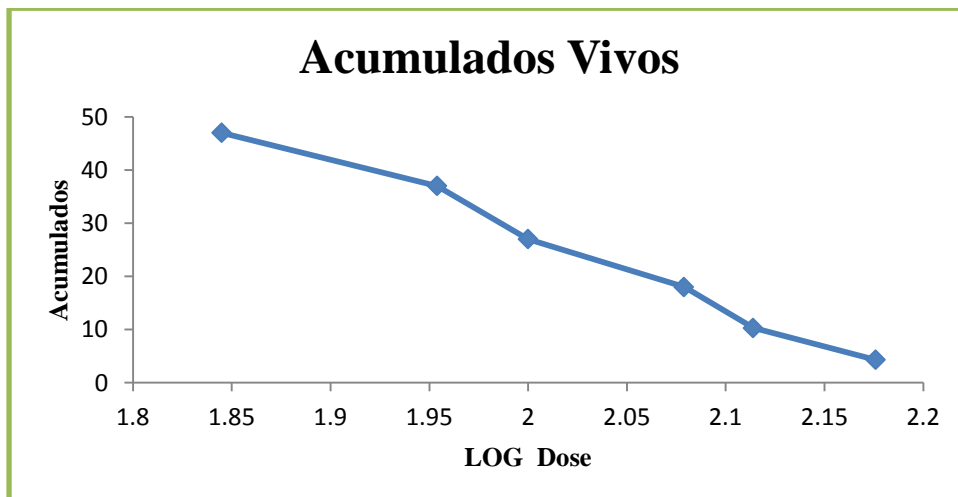
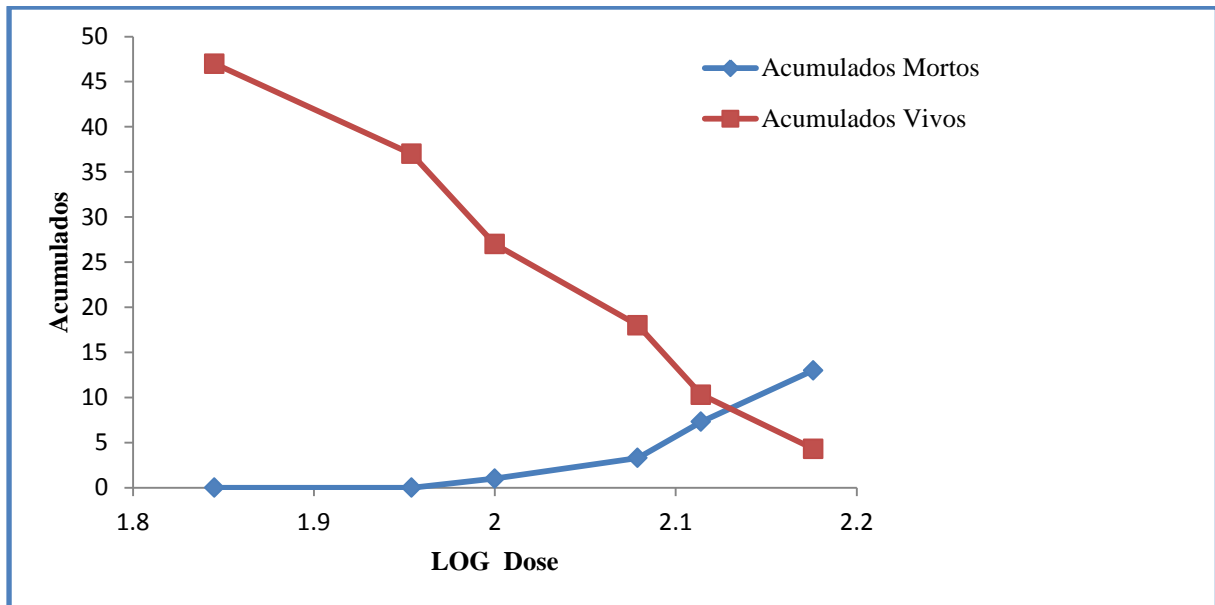


Gráfico 8: Estimativa da CL_{50} do extracto etanólico 25% das folhas de *Corymbia citriodora*, pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal das doses aplicadas. O ponto de intersecção das duas curvas é a dose letal 50% requerida pelas larvas testadas



Os resultados da actividade larvicida do óleo essencial das folhas de *Corymbia citriodora* sobre as larvas do mosquito *An. gambiae* estão apresentados na **tabela 9**.

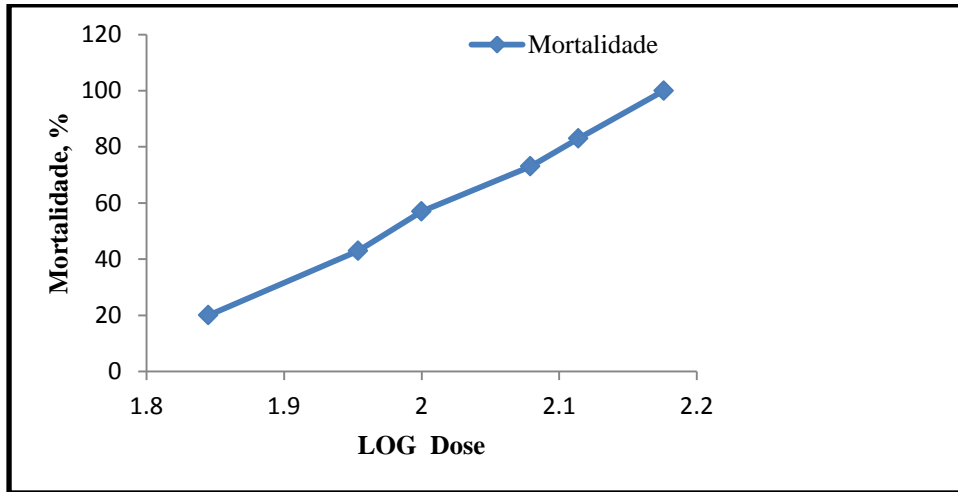
Tabela 9: Mortalidade das larvas de *Anopheles gambiae* após 24 horas de exposição a várias concentrações do óleo essencial das folhas da espécie vegetal *Corymbia citriodora*

Dose $\mu\text{g/ml}$	Log dose	Mortos	Vivos	Acumulados mortos	Acumulados vivos	% Mortalidade
150	2,176	10,0	0,0	37,6	0,0	100
130	2,114	8,3	1,7	27,6	1,7	83
120	2,079	7,3	2,7	19,3	4,4	73
100	2,000	5,7	4,3	12,0	8,7	57
90	1,954	4,3	5,7	6,3	14,4	43
70	1,845	2,0	8,0	2,0	22,4	20

Número de larvas (n = 10)

A taxa de percentagem da mortalidade das larvas usando o óleo essencial é apresentada no **Gráfico 9**.

Gráfico 9: Taxa de mortalidade das larvas do mosquito *Anopheles gambiae* expostas a seis concentrações diferentes do óleo essencial das folhas de *Corymbia citriodora*, após 24 horas em função do logaritmo decimal de cada dose testada, segundo método Reed-Muench.



A seguir são apresentados os resultados que representam as curvas de larvas acumuladas mortas (**gráfico 10**) e acumulados vivos (**gráfico 11**), posteriormente é apresentada a Concentração letal 50% (CL₅₀) para o óleo essencial das folhas de *Corymbia citriodora* (**gráfico 12**).

Gráfico 10: Acumulado das larvas mortas, em função do logaritmo decimal das doses aplicadas do óleo essencial das folhas de *Corymbia citriodora* pelo método Reed-Muench.

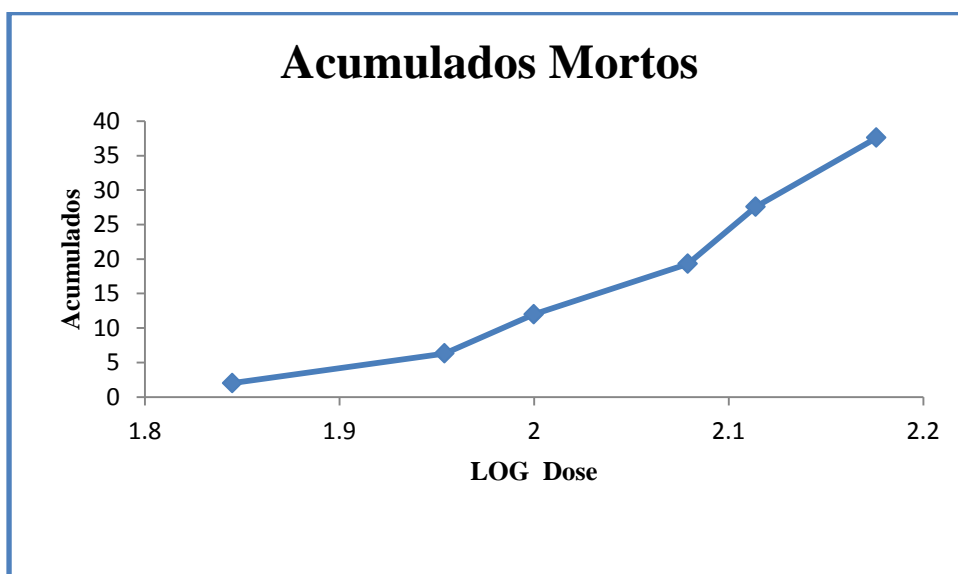


Gráfico 11: Acumulado das larvas vivas, em função do logaritmo decimal das doses aplicadas do óleo essencial das folhas de *Corymbia citriodora* pelo método Reed-Muench.

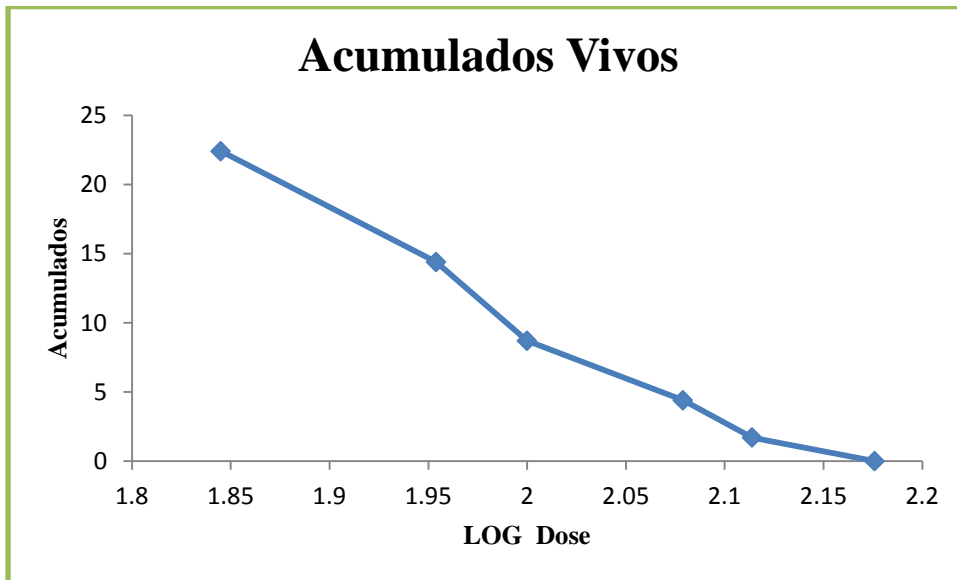
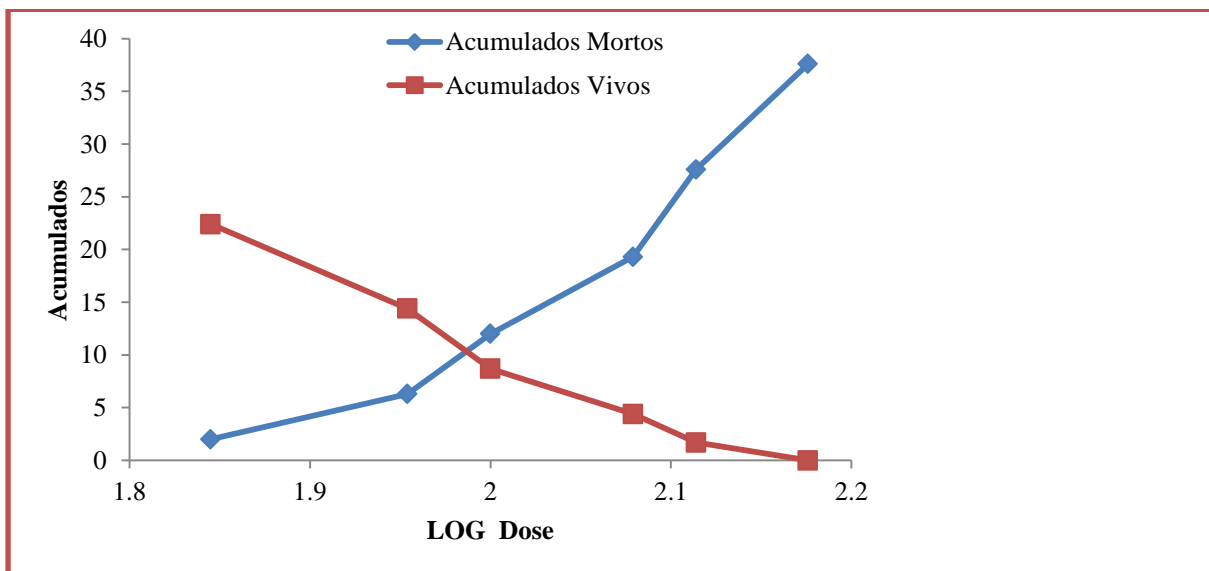


Gráfico 12: Estimativa da CL_{50} do óleo essencial das folhas de *Corymbia citriodora*, pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal das doses aplicadas. O ponto de intersecção das duas curvas é a dose letal 50% requerida pelas larvas testadas.

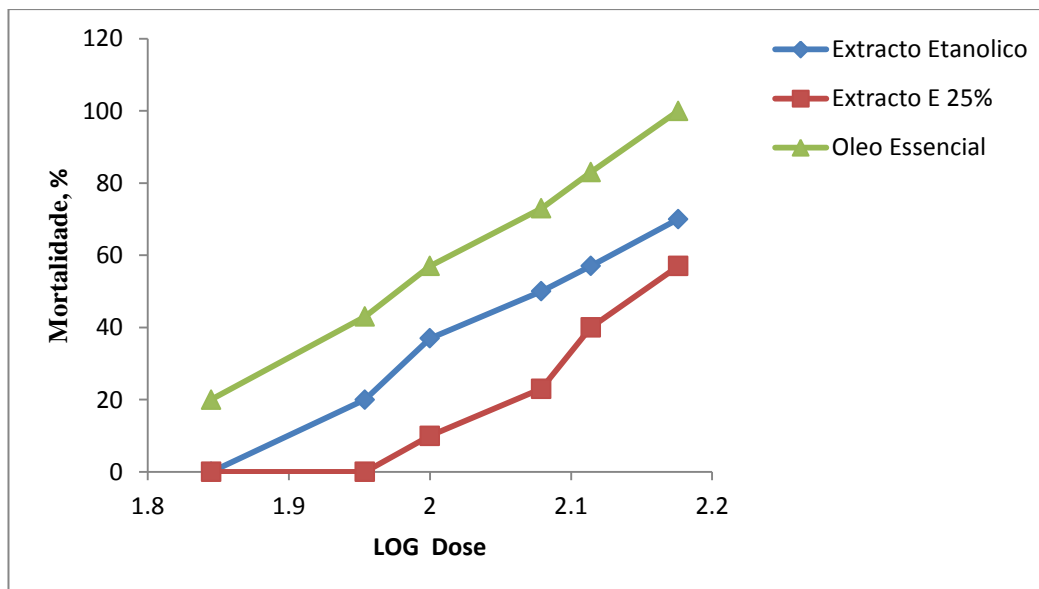


Os valores de CL_{50} obtidos nos ensaios larvicidas para os extractos e óleo essencial calculados através do método Reed-Muench e os respectivo intervalos de confiança que foram calculados pelo método de Pizzi são apresentados na **tabela 10**. No **gráfico 13** é a ilustrada comparação das taxas de mortalidade das larvas expostas aos extractos e óleo essencial.

Tabela 10: Valores de CL_{50} dos larvicidas testados ao Intervalo de confiança á 95% de Probabilidade

Larvicidas testados	CL_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Intervalo de Confiança 95%
Extracto Etanólico	120,50	($\pm 2,23$)
Extracto Etanólico 25%	136,46	($\pm 2,22$)
Óleo Essencial	93,11	($\pm 2,23$)

Gráfico 13: Comparação entre as taxas de mortalidade das larvas do mosquito *Anopheles gambiae* dos extractos etanólico, etanólico 25% e óleo essencial.



6.2. Discussão dos Resultados

✓ *Extracção de óleo essencial e análises físico-químicas*

No total, realizaram-se 35 extracções de óleo essencial das folhas de *C. citriodora*, colhidas no distrito de Namaacha. De acordo com a análise dos rendimentos, percebe-se que os valores estão compreendidos no intervalo de 0,81 a 2,87 (% p/p), sendo a média geral de 1,64 (% p/p). Os valores obtidos para a espécie *C. citriodora* normalmente variam entre 1 e 2% (Castro *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2012 citados por Dogenski, 2013).

As variações dos valores de rendimento podem ser explicadas pelo não seguimento de secagem uniforme das folhas. Os mais baixos valores de teor de óleo essencial obtiveram-se nas extracções em que se usou folhas frescas, com alto teor de humidade. Sendo um aspecto evidente de que a humidade é um dos factores que influencia no rendimento dos óleos essenciais. Em contraparte, a colheita das folhas foi feita em dois talhões, e as folhas não foram retiradas de uma única árvore, partindo desses fundamentos pode-se explicar também as variações de rendimento pela influência de factores abióticos (como stress hídrico, intensidade luminosa, radiação solar) a que as árvores estão submetidas.

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas demonstraram que os valores encontram-se dentro dos limites especificados, indicando a conformidade com a ISO 3044 – 1974. Em relação á densidade, o óleo essencial apresentou densidade inferior à da água, visto que durante a hidrodestilação verificou-se a separação de fases, a fase orgânica (óleo essencial) menos densa ficou por cima da fase aquosa.

Mussane (1998), em seu trabalho sobre análise de óleos essenciais de origem vegetal encontrou os valores de índice de refração e densidade respectivamente: 1,4506 e 0,8020. Esses valores não apresentam uma diferença significativa com os obtidos no presente estudo: 1,4576 e 0,866. O índice de refração e a densidade variam inversamente com a temperatura, assim sendo, torna-se pertinente levar em consideração à temperatura da análise. A densidade do óleo essencial é influenciada pela sua composição química, e variações na composição podem implicar em variações na densidade, sendo desse modo importante tomar em consideração factores que influenciam na composição química do óleo (Cole, 2008).

Os parâmetros físicos – químicos são de grande importância para avaliação da qualidade de um óleo volátil obtido de matéria-prima vegetal ou de um medicamento que o contenha (De Paula, 2002).

✓ *Testes fitoquímicos*

A triagem fitoquímica preliminar dos extractos das folhas da planta *Corymbia citriodora* revelou a presença de diferentes grupos de metabólitos secundários.

A presença de compostos fenólicos e esteróides/triterpenóides nos dois extractos (concentrado e não concentrado) foi mais evidente, tendo sido identificados em todos os extractos, em relação aos outros grupos de metabólitos secundários (alcalóides, saponinas, taninos) que apresentaram variabilidade. Em contrapartida os flavonóides não foram identificados em nenhum dos extractos. Contudo, estes resultados não consubstanciam completamente com os resultados obtidos por Naranjo *et al* (2009), que realizaram a avaliação fitoquímica de extractos naturais hidroalcoólicos de *Eucalyptus citriodora* (tratado no presente trabalho como *Corymbia citriodora*) e evidenciaram a presença de flavonóides, alcalóides, esteróides e triterpenóides, taninos e compostos fenólicos.

Não obstante, os resultados da identificação de grupos metabólitos secundários nos dois grupos de extractos não apresentaram muitas diferenças nas classes identificadas, apenas na intensidade da coloração, na identificação de compostos fenólicos, em que os tubos que continham os extractos não concentrados apresentaram coloração vermelha muito intensa comparados aos tubos que continham os extractos concentrados (**figura A2**).

✓ *Actividade Larvicida*

Pela análise dos dados da actividade larvicida dos extractos e do óleo essencial das folhas de *Corymbia citriodora*, pode-se perceber de um modo geral que os extractos e óleo essencial testados apresentaram diferentes graus de toxicidade contra as larvas do terceiro estágio do mosquito *Anopheles gambiae* e que o óleo essencial apresentou melhor actividade larvicida comparativamente aos extractos, sobretudo nas concentrações mais baixas de 70 e 90 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, onde o óleo essencial apresentou taxas de mortalidade de 20 e 43% respectivamente, o

extracto etanólico apresentou taxas de mortalidade de 3 e 20% respectivamente, e o extracto etanólico 25% não apresentou taxa de mortalidade das larvas nas concentrações citadas. A baixa eficiência larvicida de extractos das plantas pode estar relacionada a parte da planta da qual se usou para obtenção dos extractos. De modo a evidenciar este facto, Feitosa *et al* (2009) citados por Nascimento (2014), testando a actividade larvicida de diferentes partes da espécie vegetal *Rollinia leptopetala* (Annonaceae) contra larvas de *Aedes aegypti*, observaram que a mais baixa toxicidade contra as larvas foi obtida com extractos das folhas da planta. No que diz respeito à actividade larvicida de produtos fitoquímicos, deve-se considerar também um aspecto relevante que é a relação entre a estrutura e actividade dos constituintes fitoquímicos testados. Simas *et al* (2004) demonstraram em seu trabalho de pesquisa sobre produtos naturais para o controle de transmissão da dengue, a importância da lipofilicidade dos terpenos para actividade larvicida contra *Aedes aegypti* (mosquito vector dengue) ao comparar monoterpenos e sesquiterpenos de estruturas correlacionadas, eles observaram também a menor actividade de fenilpropanóides, que contêm núcleos benzénicos com substituintes nucleofílicos, como hidroxila, metoxila e benzodioxila.

Confrontado os resultados com os critérios padronizados pela OMS para determinação da resistência de mosquitos a insecticidas, os extractos etanólico e etanólico 25%, que para todas as concentrações testadas obtiveram taxas de mortalidade inferior a 80% (**gráfico 13**), Consideram os critérios que as larvas apresentam resistência confirmada frente aos dois extractos. Em relação ao óleo essencial considera-se que as larvas são completamente susceptíveis a partir da concentração de 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pois é nessa concentração que se atinge a taxa de mortalidade de 100%. E, nas concentrações menores que 130 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, as larvas apresentam resistência confirmada frente ao óleo essencial segundo critérios da OMS.

Por outro lado, pela análise da Concentração letal 50% (CL_{50}), percebe-se que o óleo essencial das folhas de *Corymbia citriodora* apresentou melhor actividade larvicida contra as larvas de mosquito *Anopheles gambiae*, comparando com a actividade dos extractos etanólico e etanólico 25% das folhas da mesma espécie vegetal (**tabela 10**), com CL_{50} de 93,11 ($\pm 2,23$) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, contra CL_{50} de 120,50 ($\pm 2,23$) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e 136,46 ($\pm 2,22$) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ do extracto etanólico e etanólico 25% respectivamente. Não tendo sido verificada mortalidade das larvas nos controles. Cheng *et al* (2003), consideram que substâncias com valores de CL_{50} menores que 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ são bons agentes larvicidas. Desta forma segundo os autores o óleo essencial pode ser qualificado como um agente larvicida moderado, enquanto os extractos etanólico e

etanólico 25% que apresentam valores de CL_{50} muito acima dos recomendados, estão fora das especificações para o uso como agentes larvicidas.

Segundo Ghosh *et al* (2011), a mais importante actividade dos larvicidas à base de plantas sobre insectos é a sua capacidade de inibição da actividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina (medidor químico, responsável pela transmissão dos impulsos nervosos) em ácido acético e colina (**figura A1**). A respeito da inibição dessa enzima alguns autores destacam que a posição da ligação dupla C=C de compostos presentes nos larvicidas está relacionada com o potencial de inibição da enzima. Destaca-se ainda que compostos com um grupo metil alicíclico apresentam maior poder de inibição da actividade da acetilcolinesterase. Isto sugere que a diversidade estrutural e funcional de compostos constituintes do óleo essencial de *Corymbia citriodora*, alguns com as características relatadas pelos autores, contribui para actividade larvicida do óleo essencial através da inibição da enzima acetilcolinesterase.

Com base nos resultados obtidos, obteve-se uma correlação positiva entre a concentração dos extractos, bem como do óleo essencial e a percentagem de mortalidade, sendo desse modo a actividade larvicida proporcional à concentração do agente larvicida.

Não foram encontradas na literatura informações sobre a actividade larvicida contra as larvas de *Anopheles gambiae* para os extractos e óleo essencial de *Corymbia citriodora* especificamente, sendo este o primeiro trabalho a ser realizado na área de Produtos Naturais, com vista a avaliar a actividade larvicida dos extractos e óleo essencial das folhas de *Corymbia citriodora* contra as larvas do mosquito *Anopheles gambiae*. .

Contudo, para obtenção de resultados mais conclusivos, é necessária a realização de ensaios larvicidas dos constituintes puros do óleo essencial de *Corymbia citriodora* para confirmar qual, ou quais compostos são responsáveis pela actividade larvicida do óleo.

VII. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

7.1. Conclusões

Mediante os resultados, obtidos no presente estudo, correlacionando com os objectivos traçados foi possível chegar às seguintes conclusões:

A extracção do óleo essencial das folhas de *Corymbia citriodora* através da hidrodestilação permitiu obter um rendimento médio moderado (1,64% p/p) considerando os rendimentos obtidos para óleos essenciais da espécie. Em relação a qualidade, que é avaliada pelos parâmetros físico-químicos (cor, aparência, índice de refacção, densidade e solubilidade em álcool), os resultados obtidos estão em conformidade com os padrões da Norma ISO 3044 - 1974.

A avaliação fitoquímica preliminar revelou a presença dos seguintes grupos de metabólitos secundários: alcalóides, esteróides/triterpenóides, fenóis, saponinas e taninos nas folhas da espécie estudada.

Em relação à actividade larvicida, a variação da mortalidade das larvas do terceiro estágio de desenvolvimento do mosquito *An. gambiae* comprovou-se que é dependente da concentração do agente larvicida testado.

As larvas do terceiro estágio de desenvolvimento de *An. gambiae* apresentam resistência confirmada frente aos extractos etanólico e etanólico 25%, mas são completamente susceptíveis a concentrações a partir da concentração de 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ do óleo essencial.

Diante dos resultados alcançados e da necessidade cada vez maior do uso de substâncias para combate de pragas vectoriais de doenças que oferecem maior segurança aos seres humanos e ao ambiente, o óleo essencial das folhas de *Corymbia citriodora* apresenta-se como um agente larvicida natural promissor sobre as larvas do mosquito *Anopheles gambiae*.

7.2. Recomendações

Sendo este o primeiro trabalho realizado com extractos e óleo essencial das folhas de *Corymbia citriodora* sobre as larvas do mosquito *Anopheles gambiae* recomenda-se:

- ✓ A caracterização química do óleo essencial de *Corymbia citriodora* através de técnicas analíticas precisas para substâncias com altos teores de compostos voláteis (como a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa) de modo a identificar e quantificar os constituintes do óleo essencial;
- ✓ A realização de ensaios larvicidas com constituintes puros do óleo essencial de *Corymbia citriodora* para confirmar qual, ou quais compostos são responsáveis pela actividade larvicida do óleo;
- ✓ A realização de mais estudos sobre a actividade larvicida com diferentes plantas nativas de Moçambique, utilizando também extractos de diferentes partes como da raiz, caule.
- ✓ A realização de ensaios com larvas de *Anopheles gambiae* de outros estágios como o primeiro, segundo e quarto de modo a ter-se um melhor controle das formas imaturas do mosquito.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Andrade, A. Machado De. (2000). *Influência de alguns factores não genéticos sobre o teor de óleo essencial em folhas de Eucalyptus citriodora Hook.* Revista de Floresta e Ambiente. V. 7, n. 1: 181 – 189.
- Aguiar, D. L. (2011). *Utilização de óleos essenciais como tecnologia alternativa aos insecticidas sintéticos para o controle do Aedes aegypti (Díptera: Culicidae).* Dissertação de mestrado em Ciências e Tecnologia Ambiental, Universidade Estadual da Paraíba, Brasil.
- Assunção, G.V. (2013). *Caracterização Química e Avaliação da Actividade Larvicida frente ao Aedes aegypti do óleo essencial da espécie Citrus sinensis L. Obseck (Laranja Doce).* Dissertação de mestrado em Química. Universidade Federal de Maranhão, Brasil.
- Brito, J. O. e Vitti, A. M. S. (2003). *Óleo Essencial de Eucalipto.* Documentos florestais, Universidade São Paulo, 17 : 1 – 26.
- Cheng, S. S., Changa, H. T., Chang, S. T., Tsaib, K. H., Chen, W. J. (2003). *Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito Aedes aegypti larvae.* Bioresource Technology, 89: 99 – 102.
- Cole, E. R. (2008). *Estudo Fitoquímico do óleo essencial dos frutos da Aroeira (Schinus terebinthifolius RADDI) e sua eficácia no combate ao dengue.* Dissertação de mestrado em Química. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.
- De Aguiar, E. M. (2003). *Isolamento e Caracterização de Óleos essenciais de Piperáceas no vale do Itajaí, Santa Catarina.* Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Federal da Santa Catarina, Brasil
- De Paula, J. P. (2002). *Estudo da acção repelente do óleo essencial de Ocimum selloi BENTH contra o Anopheles braziliensis CHAGAS.* Dissertação de mestrado em Saúde Pública, Brasil.
- Dias, M. I. M. F. (2011). *Caracterização Química e molecular de amostras de Coriandrum sativum L. obtidas in vivo e in vitro.* Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.

Dogenski, M. (2013). *Extracção do óleo essencial e oleoresina das folhas de Corymbia citriodora utilizando CO₂ em condições sub e supercríticas*. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade São Paulo, Brasil.

Prado, G. P. do (2007). *Caracterização Química e Bioactividade do Óleo essencial de Cunila angustifolia Benth (Lamiaceae) sobre Alphetobius diaperinus (Panzer, 1797)*. Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais, Universidade Comunitária Regional de Chapecó, Brasil.

Falcão, M. A. (2012). *Estudo da Actividade antimicrobiana do Óleo essencial de Capim Limão e suas fracções para produtos de higiene corporal*. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais, Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

Freitas, F. P. (2007). *Efeito de monoterpenos de óleos essenciais presentes em Alpinia speciosa, Cymbopogon citratus e Rosmarinus officinalis sobre ATPases de larvas de Aedes aegypti*. Dissertação de mestrado em Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Brasil.

Garcez, W. S., Garcez, F. R., Silva, L. M., Sarmento, U. C. (2013). *Substâncias de Origem Vegetal com Actividade Larvicida Contra Aedes aegypti*. Revista Virtual de Química, 5 (3): 363 – 393.

Guisseve, A. L. (2006). *Avaliação da eficácia do Larvex 100TM no controlo dos estágios aquáticos dos vectores da Malária*. Trabalho de Culminação do Curso, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Eduardo Mondlane, Maputo.

Gosh, A., Chowdhury, N. e Chandra, G. (2011). *Plant extracts as potential mosquito larvicides*. Indian J Med Res 135: 581 – 598.

Kempt, M. (2009). *Caracterização Química e propriedades físico-químicas do óleo essencial de Baccharis uncinella DC*. Trabalho de Licenciatura em Química, Universidade Regional de Blumenau, Brasil.

Malaria Operational Plan FY. (2015). *President's Malaria Initiative*. USAID – Mozambique.

Martins, E. R., Castro, D. M., Castellani, D. C., Dias, J. E. (1994). *Plantas medicinais*. Trabalhos de Pesquisa. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Melo, O. C. A. (2009). *Desenvolvimento de metodologias de aplicação e avaliação de aditivos anti-mosquito em substratos têxteis*. Tese de Mestrado em Engenharia Química, Universidade do Porto, Portugal.

Miranda, M. C. (2005). *Desenvolvimento de Lipossoma com Produto Repelente de insectos e metodologia analítica*. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

Ministério da Administração Estatal. (2005). *Perfil do Distrito de Namaacha Província de Maputo*. República de Moçambique.

MISAU. (2009). *Procedimentos Padronizados para a Vigilância e Maneio Integrado de Vectores de Doenças*. Programa Nacional de Controle da Malária, República de Moçambique.

MISAU. (2012). *Plano Estratégico da Malária 2012-2016*. Direcção Nacional de Saúde Pública. República de Moçambique.

Mussane, V. E. (1998). *Análise de Óleos Essenciais de Origem Vegetal por Cromatografia em fase gasosa*. Trabalho de Licenciatura em Química, Departamento de Química, Universidade Eduardo Mondlane, Maputo.

Naranjo, J., Guiamet, P., Gómez De Saravia, S. (2009). *Evaluación fitoquímica de extractos naturales de Eucalyptus citriodora y Pinus caribaea com actividad biocida*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. (8): 445-448.

Nascimento, A.M.D. (2014). *Actividade Repelente e Larvicida de Xylopiia laevigata, X. frutescens (Annonaceae) e Lippia pedunculosa (Verbenaceae) Sobre Mosquito Aedes aegypti (Diptera – Culucidae)*. Dissertação de mestrado em Biologia Parasitária, Universidade Federal do Sergipe, Brasil.

Nweti (2010). *Revisão de Literatura sobre Malária*. Moçambique.

Oliveira, M. B. (2012). *Extracção, Caracterização e Avaliação da Actividade Larvicida do Óleo essencial do Citrus limon Linneo (Limão) frente ao Mosquito Aedes aegypti*. Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Federal do Maranhão, Brasil.

Pereira, J. L. (2010). *Composição Química dos óleos essenciais de espécies de Eucalyptus L'Herit (Myrtaceae)*. Dissertação de mestrado em Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

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

Reed, L. J. e Muench, H. (1938). *A simple method of estimating fifty percent end-points*. AMER. J. HYG. (27): 493 – 497.

Rodrigues, M. R. A. (2002). *Estudo dos Óleos essenciais presentes em Manjerona e Orégano*. Tese de Doutorado em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Romero, R., López, G., e Pérez, A. (2003). *Elaboración de una loción repelente a partir de los extractos e aceites esenciales de Ocimum micranthum (Albahaca) y Cymbopogon nardus (Citronela)*. Trabajo de Graduación, Facultad de Química y Farmacia, Universidade de El Salvador, Argentina.

Santos, B, G. F. (2012). *Manejo de espécies medicinais em duas condições de cultivo no Município de Cruz das Almas*. Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Brasil.

Sarker, S.D., e Nahar, L. (2007). *Chemistry for Pharmacy Students. General, Organic and Natural Product Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd, England.

Simas, N. K., Lima, E. da C., Conceição, S da R. (2004). *Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: actividade larvicida de Myroxylon balsamum (óleo vermelho) e de terpenóides e feniliterpenóides*. Química Nova, 27 (1): 46 – 49.

Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosman, G., Mello, J .C .P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R. (1999). *Óleos essenciais. Farmacognosia da planta ao medicamento*, p. 387 – 415.

Telecentro de Namaacha. Disponível em: www.telecentros.org.mz/namaacha.htm. acessado ao 16 de Setembro de 2015.

Taiz, L., e Zeiger, E. (1998). *Plant physiology*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts (2): 792.

Teles, R. M. (2009). *Caracterização Química, Avaliação Térmica e Actividade Larvicida frente ao Aedes aegypti do óleo essencial da Aniba duckei Kostermans*. Tese de Doutoramento em Química, Universidade Federal da Paraíba, Brasil.

Vieira, I. G. (2004). *Estudo de Caracteres Silviculturais e de Produção de óleo essencial de Progênies de Corymbia citriodora (HOOK) K. D. HILL & L. A. S. JOHNSON procedente de Anhembi SP – Brasil, EX. Atherton QLD – Austrália*. Dissertação de Mestrado em Recursos Florestais, Universidade São Paulo, Brasil.

Vilaça, A.C., Bernardes, E.A. e Melo, V.Q. (2005). *Extracção de Óleo essencial de Eucalyptus citriodora*. Revista Uberaba 2: 107 – 117.

WHO (2014). *World Malaria Report 2014*. Geneva, Switzerland.

Zucula, C. V. (2011). *Avaliação in vitro da actividade antifúngica de extractos de plantas Kigelia africana, Combretum molle e Trichilia emética para o controlo de fitopatógenos*. Trabalho de Licenciatura em Química, Departamento de Química, Universidade Eduardo Mondlane, Maputo.

ANEXOS

Anexo 1

a) Preparação dos reagentes para os testes fitoquímicos qualitativos

- **Reagente de Liebermann- Burchard:**

Misturou-se 10 ml de anidrido acético e duas gotas de ácido sulfúrico concentrado.

- **Reagente de Mayer:**

Misturou-se 1,36 g HgCl_2 / 60ml de água e 5 g de KI / 10 ml de água. Diluiu-se a 100 ml.

- **Reagente de Wagner:**

Dissolveu-se 1,27g de iodo e 2 g de iodeto de potássio em 5ml de água e completou-se o volume para 100 ml com água destilada.

- **Reagente de Hager (Ácido pícrico a 2%)**

Dissolveu-se 4,58g de ácido pícrico em 100 ml de água destilada.

b) Fórmula para cálculo da densidade relativa

$$d = \frac{mpa - mp}{mpH_2O - mp}$$

onde:

mpa – Massa do picnómetro com amostra

mp – Massa do picnómetro vazio

mpH₂O – Massa do picnómetro com água.

Anexo 2

Tabela A 1: Controle da mortalidade das larvas utilizando o extracto etanólico 25%

Dose ($\mu\text{g/ml}$)	# Larvas mortas por réplicas em 24 h		
	1^a	2^a	3^a
70	0	0	0
90	0	0	0
100	1	1	1
120	3	2	2
130	4	4	4
150	6	5	6
Controle – (água+etanol)	0	0	0

Tabela A 2: Controle da mortalidade das larvas utilizando o extracto etanólico

Dose ($\mu\text{g/ml}$)	# Larvas mortas por réplicas em 24 h		
	1^a	2^a	3^a
70	1	0	0
90	2	2	2
100	4	3	4
120	5	5	5
130	5	6	6
150	7	7	7
Controle – (água+etanol)	0	0	0

Tabela A 3: Controle da mortalidade das larvas utilizando o óleo essencial

Dose ($\mu\text{g/ml}$)	# Larvas mortas por réplicas em 24 h		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a
70	2	2	2
90	4	5	4
100	6	6	5
120	7	7	8
130	8	8	9
150	10	10	10
Controle – (água+etanol)	0	0	0

Cálculo da CL_{50} pelo método de Reed-Muench

✓ **Para o extracto etanólico 25%**

Log da dose inferior = 1,845.

$$A = \frac{150}{70} = 2,143 \quad \text{Log } A = 0,331$$

$$B = \frac{50 - 0}{57 - 0} = 0,877$$

$$\text{Log } CL_{50} = 1,845 + (0,331 * 0,877) = 2,135$$

$$CL_{50} = 136,46 \mu\text{g. ml}^{-1}$$

✓ **Para o extracto etanólico**

Log da dose inferior = 1,845.

$$A = \frac{150}{70} = 2,143 \quad \text{Log } A = 0,331$$

$$B = \frac{50 - 0}{70 - 0} = 0,714$$

$$\text{Log } CL_{50} = 1,845 + (0,331 * 0,714) = 2,081$$

$$CL_{50} = 120,50 \mu\text{g. ml}^{-1}$$

✓ **Para o óleo essencial**

Log da dose inferior = 1,845.

$$A = \frac{150}{70} = 2,143 \quad \text{Log A} = 0,331$$

$$B = \frac{50 - 20}{100 - 20} = 0,375$$

$$\text{Log } CL_{50} = 1,845 + (0,331 * 0,375) = 1,969$$

$$CL_{50} = 93,11 \mu\text{g. ml}^{-1}$$

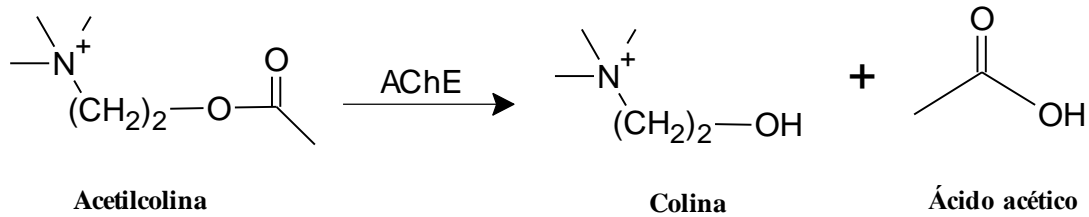


Figura A 1: Reacção de hidrólise da acetilcolina

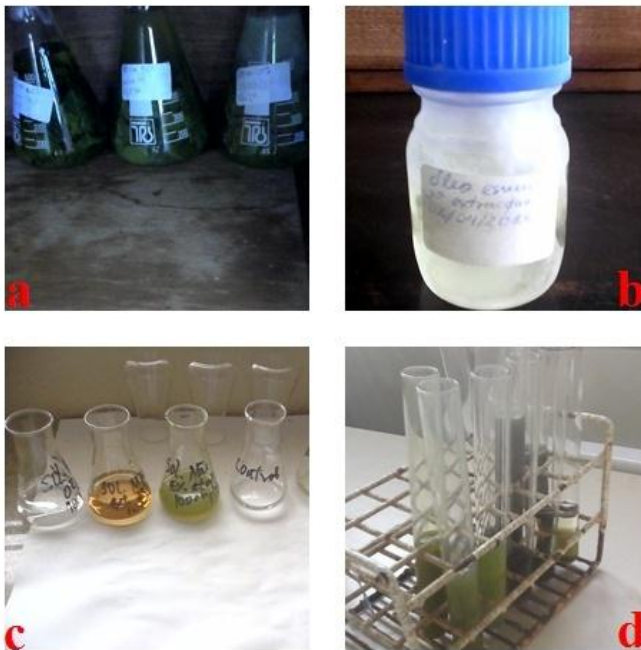


Figura A 2 : Alguns experimentos laboratoriais realizados

Legenda: **(a)** – extractos das folhas armazenados á temperatura ambiente; **(b)** – óleo essencial extraído das folhas de *Corymbia citriodora*; **(c)** – soluções – mãe preparadas para os ensaios larvicidas; **(d)** – tubos de ensaio utilizados na realização dos testes fitoquímicos)

Tabela A 4: Cálculo do intervalo de confiança pelo método de Pizzi no Excel

Log Dose		Diferença dos Logs	Média da diferença (h)		Erro Padrão
2.176		0.062	0.055166667	SE ² :	0.002166009
2.114		0.035		SE:	0.0465404
2.079		0.079		R:	0,99494
2		0.046		IC Extracto Etanólico:	2.22623187
1.954		0.109			
1.845		1.845			
Log Dose		Diferença dos Logs	Média da diferença (h)		
2.176		0.062	0.055166667		
2.114		0.035		SE ² :	0.001993593
2.079		0.079		SE:	0.044649673
2		0.046		R:	0.914877041
1.954		0.109		IC EE 25%:	2.216560904
1.845		1.845			
Log Dose		Diferença dos Logs	Média da diferença (h)		
2.176		0.062	0.055166667		
2.114		0.035		SE ² :	0.002172546
2.079		0.079		SE:	0.046610579
2		0.046		R:	0.99797
1.954		0.109		IC Óleo Essencial:	2.226591643
1.845		1.845			

Legenda: SE² = Quadrado do logaritmo do erro padrão; SE = Logaritmo do erro padrão

R = Diferença entre o Log da dose que mata 75% das larvas e Log da dose que mata 25% das larvas

IC = Intervalo de confiança a 95% de probabilidade