

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS NATURAIS**

**“COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE
Lippia gracilis SCHAUER E β -CICLODEXTRINA: UMA
ALTERNATIVA NO CONTROLE DAS LARVAS DE *Aedes*
aegypti”**

PATRICIA CERPE

**SÃO CRISTOVÃO
2013**

PATRICIA CERPE

**“COMPLEXO DE INCLUSÃO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia
Gracilis* E β -CICLODEXTRINA: UMA ALTERNATIVA NO
CONTROLE DAS LARVAS DE *Aedes Aegypti*”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia na área de concentração Biotecnologia em Recursos Naturais.

Orientadora Prof^a. Dr^a. Rogéria de Souza Nunes

**SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE - BRASIL
2013**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

C416c Cerpe, Patrícia
"Complexo de inclusão óleo essencial de *Lippia Gracilis* e β -Ciclodextrina : uma alternativa no controle das lavras de *Aedes Aegypti*" / Patricia Cerpe ; orientadora Rogéria de Souza Nunes. – São Cristóvão, 2013.
53 f. ; il.

Dissertação (mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) –Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2013.

1. Plantas medicinais. 2. *Aedes aegypti*. 3. *Lippia gracilis*. 4. Carvacrol. 5. Óleos essenciais. 6. Complexo de inclusão. 7. Ciclodextrina. I. Nunes, Rogéria de Souza. II. Título

CDU: 606:595.77

PATRICIA CERPE

“COMPLEXO DE INCLUSÃO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia gracilis* E β -CICLODEXTRINA: UMA ALTERNATIVA NO CONTROLE DAS LARVAS DE *Aedes Aegypti*”

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Biotecnologia em Recursos naturais da Universidade Federal de Sergipe, como requisito à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia em Recursos Naturais.

Aprovada em 20/02/2013.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Rogéria de Souza Nunes

Prof^o. Dr^o. Arie Fitzgerald Blank

Prof^o Dr^o. Ricardo Neves Marreto

*“Comece fazendo o que é necessário,
depois, o que é possível, e, de repente,
você estará fazendo o impossível”*

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

Enfim, chegou o momento de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para que mais esse sonho se realizasse.

A Deus, força sublime que me conduz na luta diária e me motiva a não desistir, nunca!

Aos meus pais, que me ensinaram que as adversidades que a vida impõe podem ser superadas diante de determinação, muito esforço e humildade.

Agradeço a minha irmã Marilena, por dividir alegrias e tristezas por todos esses anos e pela cumplicidade de sempre. Aos meus outros irmãos, todo o carinho dado a mim.

A professora Rogéria, que me recebeu em seu laboratório e confiou em minha capacidade. Sou muito grata por ter me dado essa oportunidade!

Aos demais professores que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Aos amigos do LADEF que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando.

Aos grandes e inesquecíveis amigos que conquistei: Quênnia, Viviane, Nicole, Amanda, Clisiane, Adélia, Darlisson. Agradeço a amizade sincera e recíproca, sem o apoio e o carinho de vocês seria impossível conseguir!

É impossível citar todos que colaboraram para concretização de mais essa etapa, dentre eles, professores e colegas que se tornaram especiais e tiveram parcela nessa conquista.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1-INTRODUÇÃO	6
2-REFERENCIAL TEÓRICO	8
2.1-Dengue	8
2.1.2- <i>Aedes aegypti</i>	8
2.1.3-Casos de dengue	10
2.1.4-Controle de vetores	11
2.2-Óleos essenciais	12
2.2.1-Óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i> Schauer	13
2.3-Ciclodextrinas	14
2.3.1-Estrutura e propriedades das ciclodextrinas	16
2.3.2-Complexos de inclusão	17
CAPÍTULO I - Complexo de inclusão óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i> e β - Ciclodextrina: uma alternativa no controle das larvas de <i>Aedes aegypti</i>	19
CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXOS	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CDs : Ciclodextrinas

α -CD : Alfa-Ciclodextrina

β -CD: Beta-Ciclodextrina

γ -CD: Gama-Ciclodextrina

OE: Óleo essencial

OELG: Óleo essencial de *Lippia gracilis*

MAH : Malaxagem com água

MAE: Malaxagem com água e etanol

MF: Mistura física

COH : Co-evaporação com água

COE: Co-evaporação com água e etanol

ΔG : Energia livre de Gibbs

ΔH : Variação de entalpia

ΔS : Variação de entropia

TG: Termogravimetria

DTG: Derivada Termogravimétrica

DSC: Calorimetria exploratória diferencial

CG: Cromatografia gasosa

CG-EM: Cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas

DRX: Difractometria de raios-X

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

IC: Intervalo de confiança

CL₅₀ : Concentração letal necessária para matar 50% da população exposta

ppm: Partes por milhão

ϵ : constante dielétrica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> .	9
Figura 2. Larvas de <i>Aedes aegypti</i> .	10
Figura 3. Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	10
Figura 4. Estrutura química do Carvacrol	14
Figura 5. Estrutura e propriedades de α , β e γ -CD	15
Figura 6 Estrutura da ciclodextrina, característica estrutural tronco-cônica e disposição das hidroxilas.	16

Capítulo I

Figura 7. Curvas de DSC do óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i> (OELG), β -CD, mistura física (MF), malaxagem (MAH e MAE), Co-evaporação (COH e COE)	30
Figura 8. Curvas de TG/DTG do óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i> (OELG), β -CD, mistura física (MF), malaxagem (MAH e MAE), Co-evaporação (COH e COE).....	31
Figura 9. Espectros de FTIR do óleo essencial de <i>lippia gracilis</i> (OELG), β -CD, mistura física (MF), malaxagem (MAH e MAE), Co-evaporação (COH e COE).....	33
Figura 10. Diagrama de solubilidade de fases obtido em 25°, 35° e 45° C.....	34
Figura 11. Difratoograma de Raios-X da Beta-ciclodextrina (β -CD), Mistura-física (MF), dos complexos malaxagem com água (MAH), malaxagem água/etanol (MAE), coevaporação com água (COA) e coevaporação água/etanol (COE).....	35
Figura 12. Imagens da MEV em 10.000 x e 5.000 x de β -CD pura e malaxagem MAH.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da α , β e γ - ciclodextrina.....	17
---	----

Capítulo 1

Tabela 2. Acessos de <i>Lippia gracilis</i> presentes no BAG de plantas da UFS.....	23
--	----

Tabela 3. Composição química do óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i> e dos complexos de inclusão com β -CD obtidos por malaxagem com água (MAH) e malaxagem com etanol (MAE).....	28
--	----

Tabela 4. Composição química do óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i> e dos complexos de inclusão com β -CD obtidos por co-evaporação com água (COA) e co-evaporação com etanol (COE).....	29
--	----

Tabela 5. Perda de massa do OELG, β -CD e do complexo formado Malaxagem (MAH) e determinação volumétrica da água obtida pelo método de Karl Fischer.....	30
---	----

Tabela 6. Valores da constante de estabilidade e dos parâmetros termodinâmicos do complexo de inclusão MAH em diferentes temperaturas.....	36
---	----

Tabela 7. Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i> (OELG), carvacrol e do complexo de inclusão MAH.....	37
--	----

RESUMO

CERPE, Patricia. **Complexo de inclusão óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer e β -Ciclodextrina: uma alternativa no controle das larvas de *Aedes aegypti*.** Sergipe: UFS, 2013. 53 p. (Dissertação - Mestrado em Biotecnologia).

Em termos de morbidade e mortalidade, a dengue é considerada atualmente a mais importante doença viral humana transmitida por mosquitos, causada por vírus da família *Flaviridae*, transmitida, no Brasil, através do mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus, sendo um dos principais problemas de saúde pública no mundo, devido ao grande potencial para o desenvolvimento de formas graves e letais da doença. Outro problema enfrentado no controle da dengue é à existência de populações de *Aedes aegypti* resistentes a toxicidade de inseticidas químicos, como o temefós. Este trabalho envolveu a obtenção e caracterização do complexo de inclusão entre óleo essencial de *Lippia gracilis* (OELG), com atividade larvicida contra as larvas de *Aedes aegypti* em β -ciclodextrina (β -CD), objetivando melhorar a solubilidade do óleo em meio aquoso servindo de estratégia para obtenção de novos produtos larvicidas. Para os complexos obtidos por malaxagem e co-evaporação foi avaliada a influência do uso de um co-solvente na preparação dos complexos, pelos métodos malaxagem com água (MAH), malaxagem com etanol/água (MAE), co-evaporação com água (COH) e co-evaporação etanol/água (COE). A determinação do teor do OELG foi obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG/EM), onde o complexo (MAH) mostrou-se superior na inclusão do carvacrol, com teor de 15,25 %, em relação as outras técnicas de preparação. Os complexos foram caracterizados por termogravimetria (TG/DTG), determinação do teor de umidade por Karl-Fischer, calorimetria exploratória diferencial (DSC), difratometria de raios-X (DRX), espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e na região do ultra violeta (UV-vis), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ensaios de solubilidade. Os ensaios larvicidas contra as larvas de *Aedes aegypti* foram realizados com as larvas da linhagem Rockefeller no terceiro estágio (L₃), sendo verificado a mortalidade após 24 horas. De acordo com os resultados obtido por CG/EM o principal constituinte do OELG, foi o carvacrol (46,7%). Nas curvas TG/DTG e DSC dos complexos revelaram deslocamento no intervalo de degradação térmica do óleo para faixas de temperaturas mais elevadas indicando um ganho de estabilidade térmica. Nas análises de (DR-X) dos complexos demonstraram redução do grau de cristalinidade, quando comparado a β -CD pura. Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) pode-se observar mudanças na morfologia do complexo, quando comparado com a β -CD pura. No estudo do diagrama de fases em diferentes temperaturas, os valores da constante de associação do complexo (MAH), demonstrou serem interações estáveis e que o complexo OELG/ β -CD e solúvel em água. As larvas de *Aedes Aegypti* foram suscetíveis à composição do OELG, carvacrol e do complexo (MAH), utilizando o método de análise *Probit*. A atividade larvicida do complexo (MAH) foi de CL₅₀ 33 ppm, próxima ao do óleo puro de CL₅₀ 39 ppm, podendo ser uma alternativa biolarvicida adequada aos programas de controle da dengue.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; complexo de inclusão; óleo essencial de *Lippia gracilis*; ciclodextrinas; carvacrol.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rogéria de Souza Nunes – Universidade Federal de Sergipe – São Cristóvão, SE.

ABSTRACT

CERPE, Patricia. **Inclusion complexation of *Lippia gracilis* Schauer essential oil in β -cyclodextrin: An ecologically safe alternative to *Aedes aegypti* larvae control.** Sergipe: UFS, 2013. 65 p (Master thesis in Biothechnology).

In terms of morbidity and mortality, dengue is considered the important human viral disease transmitted by mosquitoes, caused by virus of the family Flaviridae, one of the main problems in public health in the world, due to the great potential for the development of several forma and lethal disease. Another problem about dengue control is the population of *Aedes aegypti* resistant to toxicity of chemical insecticides, such as temephos. This work involved the formulation and characterization of inclusion complex of essential of *Lippia gracilis* (LGEO), with potent larvicidal effect against *Aedes Aegypti* Linnaeus larvae in β -cyclodextrin (β -CD), aiming to improve oil solubility in aqueous serving as a strategy for obtaining new products larvicides. Inclusion complexes were obtained by kneading and coevaporation. The complexes obtained by paste and co-evaporation was assessed the influence of the co-solvent used to preparation the complexes by paste with water (PMW), kneading with ethanol / water (PME) co-evaporation with water (COW) and co-evaporation of ethanol / water (COE) methods. The chemical LGEO constituents were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometer (GC / MS) where the complex (PMW) was superior in the inclusion of carvacrol with a content of 15.25% compared with the another techniques preparation. The complexes were characterized by thermogravimetry (TG / DTG), the moisture content by Karl-Fischer, differential scanning calorimetry (DSC), X-ray diffraction (X-RD), spectroscopy in the infrared with Fourier transform (FTIR) and ultra violet (UV-vis), scanning electron microscopy (SEM) and solubility tests. According to the results obtained by GC / MS the major constituent of OELG was carvacrol (46.7%). In TG / DTG and DSC revealed the complex displacement in the range of thermal degradation of the oil to higher temperature ranges indicating a gain of thermal stability. In the analyzes of (X-RD) of the complexes showed the loss of crystalline order compared to pure β -CD. The scanning electron microscopy (SEM) showed changes in particle shapes and morphology of the complex when compared with pure β -CD. The larvicidal assay against *Aedes aegypti* larvae were carried out with the Rockefeller strain in the third stage (L₃), and mortality was observed after 24 hs. The phase solubility diagram at different temperatures, the values of the stability complex of the constant (PMW), was demonstrates be stable and water soluble the interaction complex OELG / β -CD. *Aedes aegypti* larvae were susceptible to the composition of OELG, carvacrol and complex (PMW) using the method of Probit analysis. The larvicidal activity of the complex (PMW) LC₅₀ was 33 ppm, close to that of pure oil LC₅₀ 39 ppm and may be a suitable alternative to biolarvicida dengue control programs.

Keywords: *Aedes aegypti*; inclusion complex; essential oil of *Lippia gracilis*; cyclodextrin; carvacrol.

Supervisor: Prof^a.Dr^a. Rogéria de Souza Nunes – Universidade Federal de Sergipe – São Cristóvão, SE.

I – INTRODUÇÃO

A dengue é considerada a mais importante doença viral humana transmitida por mosquitos, sendo um sério problema de saúde pública dos centros urbanos das áreas tropicais da América do Sul, América Central, África, Sudeste Asiático e Pacífico ocidental (GUBLER, 1989).

No Brasil é transmitida pelo *Aedes aegypti* Linnaeus mosquito domiciliar, que se esconde em lugares escuros e fechados dificultando sua erradicação. Assim, a estratégia efetiva para redução da densidade de mosquitos para um nível em que epidemias de dengue não ocorram é a conscientização da sociedade para a importância da eliminação dos criadouros e o tratamento sistemático desses locais através do uso de larvicidas (BRAGA e VALLE, 2007; SILVA et al., 2008).

Atualmente esse controle é feito com aplicações de inseticidas organofosforados em doses cada vez maiores, o que tem selecionado populações resistentes do mosquito. Bioensaios para detectar a susceptibilidade do *Aedes aegypti* aos inseticidas químicos, temefós e permetrina, mostraram que esta espécie é suscetível a temefós e apresenta resistência a permetrinas reforçando a necessidade de implementar medidas alternativas de controle (CAMPOS, 2001; POUPARDIN et.al., 2008).

O desenvolvimento de tecnologias e estratégias alternativas é fundamental para o aprimoramento do Programa de Controle da Dengue. A utilização de óleos essenciais (OEs), originados do metabolismo secundário das plantas, pode ser uma fonte alternativa de matérias-primas com atividade inseticida, larvicida e repelente (CARVALHO, 2003; SILVA et al., 2008).

Os OEs são recursos renováveis com várias aplicações industriais. Alguns países têm grande potencial na produção de OEs, como: Brasil, China, Índia e Indonésia, que são considerados os quatro grandes produtores mundiais (BIZZO et al., 2009). No estado de Sergipe, além do plantio de *Citrus*, existem outros cultivos de plantas aromáticas, das quais se obtém OE e grande parte destas plantas está localizada na região do semiárido e têm sido bastante estudadas quanto às suas atividades biológicas (ALBUQUERQUE et.al., 2007).

De forma geral, os OEs podem apresentar atividade antimicrobiana, larvicida, inseticida, analgésica, anti-inflamatória e antisséptica. Dentre as ações citadas, a atividade larvicida, em especial contra as larvas do *Aedes aegypti*, tem recebido grande destaque devido ao alto índice de casos de dengue no Brasil (CAVALCANTI et al., 2004; SILVA et al., 2008).

Dentro deste contexto o óleo essencial de *Lippia gracilis* (OELG) tem sido bastante estudado, uma vez que apresenta pronunciada atividade biológica contra as larvas de *Aedes aegypti*. Este efeito pode ser atribuído ao carvacrol, principal constituinte químico deste óleo (SILVA et al 2008). No entanto, algumas limitações são observadas na utilização direta do OE, como: baixa solubilidade em meio aquoso e volatilidade podendo ser rapidamente degradados no meio ambiente. Essas características podem conduzir a baixa retenção no local da aplicação, diminuindo assim o efeito e a eficácia como larvicida (MORETTI et al., 2002; MARRETO et al., 2008).

A utilização de ciclodextrinas (CDs) tem sido sugerida na formação de complexos de inclusão como alternativa para minimizar a baixa estabilidade dos OEs (MARQUES, 2010). As CDs são oligossacarídeos cíclicos contendo seis, sete ou oito unidades de α -D-glicopiranoose, formando um anel cuja superfície externa é hidrofílica e o interior constitui uma cavidade central hidrofóbica, na qual pode acomodar uma variedade de fármacos e outras substâncias de natureza lipofílica (SALTÃO e VEIGA, 2001; VENTURINI et al.,2008).

O impacto ambiental causado pelos larvicidas clorados e organofosforados, como o temefós, e a ocorrência de resistência do mosquito a estes compostos, apontam para a necessidade de se desenvolver novos larvicidas ambientalmente seguros e dispor de alternativas de controle do vetor (BRAGA e VALLE, 2007). Consequentemente a utilização de produtos naturais extraídos de plantas, como os OEs constituem uma boa alternativa para esse fim (SILVA et al.,2008). Portanto, torna-se pertinente à avaliação do OELG em complexo de inclusão com β -CD, tendo como caráter inovador criar um produto de fácil manuseio, biodegradável e não tóxico, sendo uma ferramenta biotecnológica aplicável no controle larvicida do *Aedes aegypti*.

Os objetivos deste estudo foram a obtenção e caracterização do complexo de inclusão OELG em β -CD, visando melhorar a solubilidade e a atividade biológica do óleo em meio aquoso contra larvas do *Aedes aegypti*. Os objetivos específicos foram: extração e caracterização do OELG através da cromatografia gasosa acoplada a um

espectrômetro de massas (CG-EM); obtenção dos complexos de inclusão contendo o OELG e β -CD, utilizando os métodos da malaxagem com água, malaxagem com etanol/água, co-evaporação com água e co-evaporação etanol/água e mistura física; caracterização dos complexos através de métodos analíticos TG/DTG, DSC, MEV, DR-X, FTIR, UV-Vis e avaliação da atividade larvicida do complexo de inclusão contra larvas do *Aedes aegypti*.

II - REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Dengue

A dengue pode ser transmitida por duas espécies de mosquitos o *Aedes aegypti* Linnaeus e *Aedes albopictus* Skuse, que picam durante o dia e a noite, ao contrário do mosquito comum, que pica durante a noite. A Dengue é uma doença infecciosa, febril aguda e de etiologia viral. As infecções pelo vírus da dengue podem apresentar clinicamente três formas diferentes: Assintomática, Dengue Clássica, Dengue Hemorrágica. Dengue clássica é caracterizada por febre alta de início súbito, cefaleia, exantema, dores musculares e articulares intensas, além de manifestações gastrointestinais. Já a Dengue hemorrágica apresenta os mesmos sintomas da forma clássica, porém é a forma clínica mais perigosa por provocar hemorragias devido à elevada temperatura corpórea, sangramento pelo nariz, boca e gengivas, vômitos persistentes, hepatomegalia, insuficiência circulatória e a letalidade é bastante significativa quando comparada a dengue clássica (BRASIL, 2005).

A infecção é causada por um arbovírus, família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Compreende quatro sorotipos imunologicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (BRASIL, 2005). A vigilância epidemiológica em 2012 destaca o predomínio da circulação do sorotipo DENV 4 no país, presente em 63% das amostras positivas para a doença, seguido do tipo DENV 1 em 32,9% das amostras positivas (BRASIL, 2012).

2.1.2 *Aedes Aegypti*

O *Aedes aegypti* e também o *Aedes albopictus* pertencem ao filo *Arthropoda* (pés articulados), classe *Hexapoda* (três pares de patas), ordem *Diptera* (um par de asas anterior funcional e um par posterior transformado em halteres), família *Culicidae* e o gênero *Aedes*. Têm corpo delgado, delicado, segmentado e apresentam delimitados, a cabeça, o tórax e o abdome mede menos de um centímetro, de aparência inofensiva, cor café ou preta e listas brancas no corpo e nas pernas. Costuma picar nas primeiras horas da manhã e nas ultimas da tarde, evitando o sol

forte, mas, mesmo nas horas quentes ele pode atacar à sombra dentro ou fora de casa (FUNASA, 2001).

Os mosquitos se desenvolvem através de metamorfose completa, e o ciclo do *Aedes aegypti* é composto por quatro fases: ovo, larva (quatro estádios larvários), pupa e adulto. As larvas se desenvolvem em água parada, limpa ou suja, na fase de acasalamento em que as fêmeas precisam de sangue para garantir o desenvolvimento dos ovos, ocorre a transmissão da doença (BRAGA e VALLE, 2007).

O seu controle é difícil, os ovos são extremamente resistentes a longos períodos de dessecação, podendo sobreviver vários meses e prolongar-se por mais de um ano até a chegada de água propicia a incubação. A capacidade de resistência dos ovos de *Aedes aegypti* à dessecação é um sério obstáculo para sua erradicação. Esta condição permite que os ovos sejam transportados a grandes distâncias, em recipientes secos, tornando-se assim o principal meio de dispersão do inseto (dispersão passiva) (FUNASA, 2001). Uma vez imersos em água, os ovos desenvolvem-se rapidamente em larvas, que dão origem às pupas, das quais surge o adulto (Figura 1).

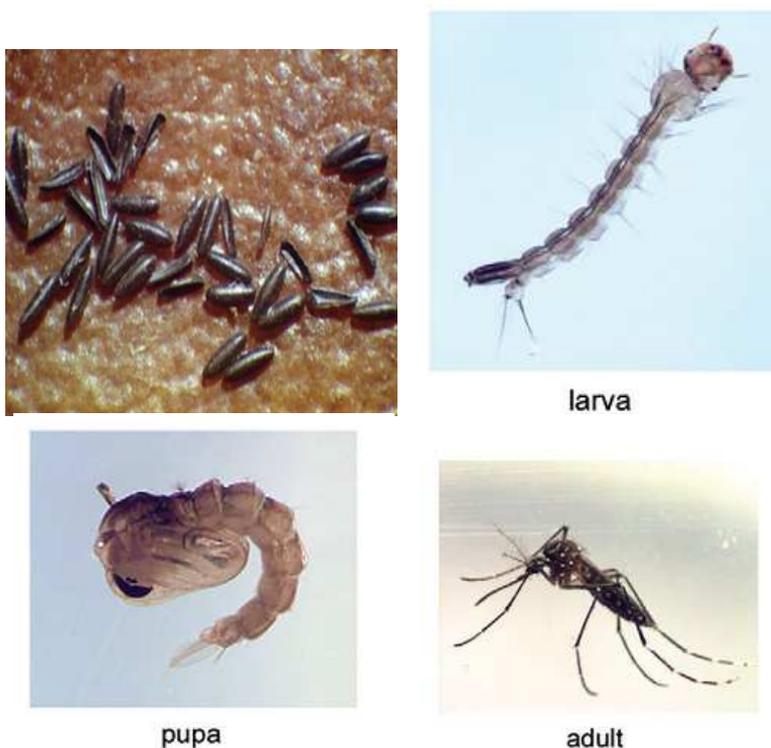


Figura 1. Ciclo de vida do *Aedes aegypti*, ovo, larva, pupa e adulto
www.fiocruz.br/rededengue

A fase larvária é o período de alimentação e crescimento. As larvas passam a maior parte do tempo alimentando-se principalmente de material orgânico acumulado nas paredes e no fundo dos depósitos. As larvas passam por quatro estádios evolutivos. A duração da fase larvária depende da temperatura, disponibilidade de alimento e densidade das larvas no criadouro (Figura 2). Em condições ótimas, o período entre a eclosão e a pupação pode não exceder a cinco dias. Contudo, em baixa temperatura e escassez de alimento, o quarto estágio larvário pode prolongar-se por várias semanas, antes de sua transformação em pupa. São sensíveis a movimentos bruscos na água e, sob feixe de luz, deslocam-se com rapidez, buscando refúgio no fundo do recipiente (fotofobia). Tendo em vista a maior vulnerabilidade nesta fase, as ações de erradicação do *Ae. aegypti* devem, preferencialmente, concentrar-se na fase larvária (FUNASA, 2001).



Figura 2. Larvas de *Aedes aegypti*
Fonte: www.dengue.org.br



Figura 3. Mosquito *Aedes aegypti*
Fonte: www.dengue.org.br

Já as pupas (Figura 1) não se alimentam. Nesta fase ocorre a metamorfose do estágio larval para o adulto. Quando inativas se mantêm na superfície da água, flutuando, o que facilita a emergência do inseto adulto. O estado pupal dura, geralmente, de dois a três dias. O adulto de *Ae. aegypti* (Figura 3), representa a fase reprodutora e a importante fase de dispersão (FUNASA, 2001).

2.1.3 – Casos de Dengue

No Brasil, a primeira epidemia confirmada clínica e laboratorialmente ocorreu em 1981 (BRASIL, 2005). A dengue apresenta um padrão sazonal, com maior

incidência de casos nos primeiros cinco meses do ano, período mais quente e úmido, típico dos climas tropicais (BRAGA e VALLE, 2007). Em 2012, o Ministério da Saúde registrou, no período de janeiro a novembro, 565.510 casos confirmados de dengue no Brasil. O número representa queda de 22% em relação ao mesmo período de 2011, quando foram registrados 727.803 casos. No entanto, sete estados brasileiros ainda registraram alta no número total de casos confirmados: Tocantins, Roraima, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Alagoas, Sergipe, Bahia e Mato Grosso. Em relação ao número de casos confirmados o Rio de Janeiro foi o estado que teve o maior número de casos, com 179.518 notificações. Em segundo lugar, ficou o Ceará, com 54.591 casos, seguido da Bahia, com 48.653. O Ministério da Saúde também afirmou que algumas cidades como: Rio de Janeiro, Fortaleza, Recife, Palmas, Cuiabá e Aparecida de Goiânia ainda se encontram em situação epidêmica (BRASIL, 2012).

Neste ano 2012 também foram registrados, 3.774 casos graves da doença. O número representa uma queda em relação a 2011, quando foram registrados 10.507 casos entre janeiro e novembro de 2011. As internações caíram 38%, com economia de R\$ 11,7 milhões ao SUS. Em relação a mortalidade, foi constatada redução de 49% em relação ao mesmo período do ano anterior. O número de óbitos em 2012, foi de 247 pessoas, enquanto que no mesmo período do ano passado o número de mortes chegaram a 481 (BRASIL, 2012).

Em 2012, a Secretaria de Estado da Saúde de Sergipe no período de janeiro a novembro, notificou 4.444 casos de dengue. Este resultado representa um aumento no número de casos em relação ao mesmo período de 2011, quando foram notificados 3.320. Em relação casos graves e óbitos foram registrados 43 casos graves e 01 óbito, ao contrário de 2011, que teve 78 casos graves e 05 mortes por dengue uma queda de 45% e 80% respectivamente (BRASIL, 2012).

2.1.4 – Controle de Vetores

O controle do vetor, definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), pode ser considerado uma operacionalização do controle integrado, de acordo com condições ambientais e a dinâmica populacional do vetor (BRAGA E VALLE, 2007).

O organofosforado temefós, registrado nos EUA em 1965, para utilização em agricultura e controle de mosquitos, é o único larvicida desse grupo com uso generalizado no controle de larvas de mosquitos, recomendado pela OMS para uso em água potável. Os piretróides sintéticos, atualmente bastante estáveis, são

produzidos em laboratório, a partir de uma substância natural, o piretro, extraído de crisântemos, onde a Cipermetrina, é a quarta e atual geração desta classe de inseticida usada no controle adulticida em nebulizações externas (BRAGA e VALLE, 2007).

O uso continuado de inseticidas tem provocado o aparecimento de populações resistentes e ocasionado problemas para o controle de vetores. Em virtude disto, MACORIS et al.,(1999) detectaram, por meio de bioensaios, alteração dos níveis de suscetibilidade do *Ae. aegypti* a organofosforados. LUNA et al., (2004) realizaram bioensaios para detectar a susceptibilidade do *Aedes aegypti* aos inseticidas químicos, Temefós e Cipermetrina. Os resultados mostraram que esta espécie é suscetível a Temefós e apresenta resistência a Cipermetrina, mesmos resultados encontrados por (CAMPOS e ANDRADE, 2001) e (CARVALHO et al., 2004).

Além dos inseticidas químicos, existem os grupos dos inseticidas biológicos, como exemplo o *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) e *Bacillus sphaericus*(Bs), no caso do Bs a resistência já se desenvolveu em algumas populações na Índia, no Brasil e na França. Assim, o potencial para o desenvolvimento de resistência com o uso mais difundido de bacillus é alto (BRAGA e VALLE, 2007).

Portanto, a utilização de bioinseticidas deve ser vista como uma ferramenta complementar à vigilância e às ações de redução de criadouros. Ademais, o monitoramento e manejo da resistência e o uso de substâncias com modos de ação distintos dos inseticidas químicos convencionais são de suma importância para qualquer programa de controle de vetores.

2.2 – Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de inúmeros compostos voláteis, responsáveis pelas propriedades odoríferas nas plantas. Provenientes do metabolismo secundário vegetal possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenóides e fenilpropanóides, predominando os terpenóides (SOUZA et al., 2011; FIQUEIREDO et al, 2008). Os terpenóides constituem uma grande variedade de substâncias vegetais e este termo é empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades de isopreno. A síntese e o acúmulo de OE estão geralmente associados às estruturas secretoras especializadas, tanto externas (tricomas), como internas (canais e bolsas) (EDRIS, 2007; SOUZA et al 2011). Sua principal característica é a

volatilidade, diferindo dos óleos fixos, misturas de substâncias lipídicas obtidas de sementes. O OE é solúvel em solventes orgânicos e pouco solúvel em água, mas suficiente para aromatizar soluções aquosas como os hidrolatos. Os OEs constituem, de forma geral, uma mistura muito complexa de hidrocarbonetos, alcoóis e compostos aromáticos, existentes em todo tecido vivo das plantas, normalmente concentrados na casca, caule, flores, folhas, frutos, rizomas e sementes (FIGUEIREDO et al., 2008).

Para a avaliação da composição química dos OEs, diversos pesquisadores destacam a cromatografia gasosa entre as melhores ferramentas analíticas e de extrema utilidade na análise de misturas complexas, visto que é uma técnica de separação eficiente para esclarecer uma determinada estrutura, tanto na indústria como nos laboratórios de pesquisa científica (OPREAN et al., 2001; FRANCISCO et al., 2008; DAWIDOWICZ, 2010).

Os OEs podem ser obtidos por diferentes processos: prensagem ou expressão; destilação por arraste a vapor; extração com solventes voláteis e fluidos supercríticos (SEMEN, HIZIROGLU, 2005).

O método de extração dos OEs pode interferir na quantidade e na sua composição química. Outros fatores que também podem interferir é o clima, a composição do solo, parte da planta, idade e fase vegetativa do ciclo, horário de coleta, armazenamento e umidade relativa (COSTA et al., 2009; CASTRO et al., 2010).

Os OEs demonstraram uma variedade de ações farmacológicas como, por exemplo: ação carminativa; antiespasmódica; estimulante; cardiovascular; ação sobre o Sistema Nervoso Central; ação anestésica tópica e anti-inflamatória (GUILHON et al., 2011; LIMA et al., 2012). Além da ação antisséptica alguns óleos voláteis inibem crescimento de vários tipos de bactérias, fungos, ácaros e insetos, devido à presença de compostos fenólicos, aldeídos e alcoóis (BITU et al., 2011; CRUZ et al., 2013).

Os OEs são recursos renováveis com várias aplicações industriais, constituindo matérias-primas de grande importância para as indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia (SILVA SANTOS et al., 2006).

O Brasil tem lugar de destaque na produção de óleo essencial, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os quatros grandes produtores mundiais. A posição do Brasil deve-se aos óleos essenciais de cítricos, que são subprodutos da indústria de sucos. No entanto, ainda sofre com alguns problemas crônicos como falta de manutenção do padrão de qualidade dos óleos e baixos

investimentos governamentais no setor, que levam ao quadro estacionário observado (CASTRO et al., 2005; BIZZO et al., 2009).

2.2.1 - Óleo Essencial de *Lippia gracilis* Schauer

A *Lippia gracilis* Schauer (LG) popularmente chamada de “alecrim da chapada” ou “alecrim de tabuleiro”, pertence à família Verbenaceae é um pequeno arbusto caducifólio, ramificado, com caule quebradiço de até 2 m de altura (LORRENZI E MATOS, 2000). É uma espécie endêmica da região do nordeste brasileiro e distribui-se amplamente dentro da caatinga (PINTO et al., 2011). Várias comunidades no nordeste do Brasil usam a LG para tratar tosse, bronquite, congestão nasal e dor de cabeça (ALBUQUERQUE et al., 2007). O OELG é conhecido por possuir atividade antimicrobiana, usado externamente no tratamento de doenças cutâneas, queimaduras, feridas e úlceras (ALBUQUERQUE et al., 2006). Estudos publicados com o OELG apresentaram atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (GUILHON et al., 2011; BITU et.al., 2011; LIMA et al., 2012). Recentemente CRUZ et al, (2013), avaliou a atividade do OELG contra carrapatos bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* obtendo atividade acaricida do óleo e a sua eficácia no controlo do carrapato bovino.

O destilado obtido por hidrodestilação do OELG a partir das folhas frescas ou secas constituiu basicamente uma mistura de hidrocarbonetos terpênicos, tendo como componentes majoritários: carvacrol, p-cimeno, γ -terpineno e b-cariofileno (SILVA et.al., 2008).

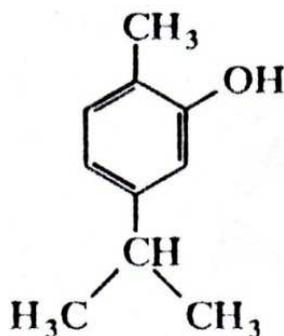


Figura 4. Estrutura química do Carvacrol

O carvacrol é o principal monoterpeneo majoritário do OELG, é um composto fenólico (Figura 4) possui em sua estrutura química um sistema deslocalizado de elétrons no anel aromático e um grupo hidroxila livre capaz de estabelecer ligações de hidrogênio (NGUEFACK et al., 2012). O mecanismo de ação do OELG sobre as larvas de *Aedes aegypti*, ainda não foi elucidado, no estudo de Silva et al., (2008), foi avaliado o efeito do OELG contra larvas de *Aedes aegypti* obtendo resultados satisfatórios com concentração letal (CL) de CL₅₀ de 98 ppm para o OELG e CL₅₀ de 70 ppm para o componente majoritário carvacrol, seu estudo atribuiu ao carvacrol como sendo o responsável pela ação larvicida e a existência de sinergismo entre os constituintes do OELG.

Devido às características de oxidação e volatilidade dos OEs, a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas é sugerido como um mecanismo de proteção, estabilidade e solubilidade para o OELG, viabilizando assim, o seu uso.

2.3 – Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, compostos por unidades de D-glicose, unidas através de ligações glicosídicas α - (1,4), e obtidas a partir da degradação enzimática do amido pela ação da enzima Ciclodextrina glicosiltransferase (CGtase). A CGtase, é obtida a partir do microrganismo *Bacillus macerans*, que catalisa a formação de ligações α -1,4, promovendo a ciclização do amido, produzindo dessa forma uma mistura de CDs (STEJTLI, 1998 ; SINGH et.al., 2002).

As CDs mais importantes são as de ocorrência natural, conhecidas como α , β e γ -CDs (Figura 5) que possuem respectivamente 6, 7 e 8 monômeros de glicose. (SINGH et al., 2002).

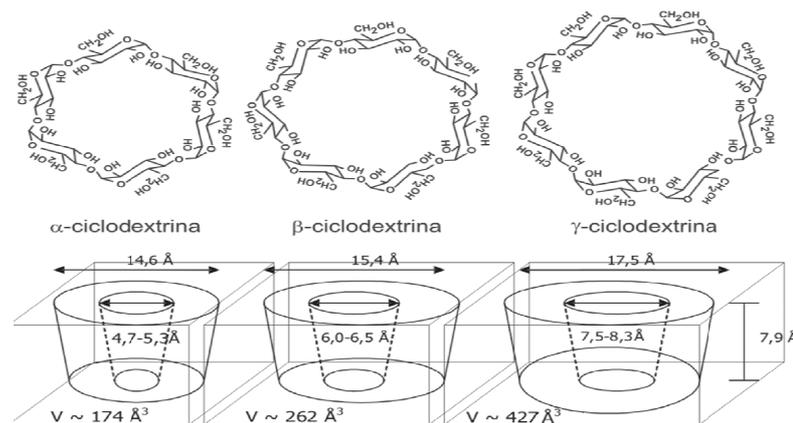


Figura 5. Estrutura e propriedades de α -, β - e γ -CD (VENTURINI et al., 2008)

As CDs foram descobertas por Villiers em 1891 (STEJTLI, 1998). Já por volta de 1904, Schardinger descreveu detalhes da sua preparação, caracterização, isolamento e a determinação das suas estruturas. Nos anos posteriores, Freudenberg e French ampliaram os conhecimentos das CDs quanto à sua produção enzimática, fracionamento e a caracterização de suas propriedades (FERNANDES e VEIGA, 1999).

Por volta de 1953 Freudenberg, French e Plieninger obtiveram uma patente, a qual tratava de uma das principais propriedades das ciclodextrinas: a formação de complexos de inclusão. Ela trazia aspectos como o aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, proteção de substâncias que poderiam ser facilmente oxidadas e a redução da volatilidade de algumas substâncias (SALTÃO e VEIGA, 2001; DEL VALLE, 2004). Por volta da metade da década de 70, as CDs naturais já haviam sido caracterizadas estrutural e quimicamente e muitos complexos tinham sido estudados. Desta forma, por apresentarem a capacidade de complexação, o baixo custo e outras vantagens, houve um grande progresso no desenvolvimento de novas tecnologias para sua produção e aplicação (CUNHA FILHO e SÁ BARRETO, 2007).

2.3.1- Estrutura e propriedades das ciclodextrinas

As CDs são moléculas cristalinas, homogêneas, não higroscópicas e apresentam estrutura relativamente rígida devido a ausência de livre rotação das ligações glicosídicas, e um formato “tronco cônico” com cavidade no centro (Figura 6) (SALTÃO e VEIGA, 2001).

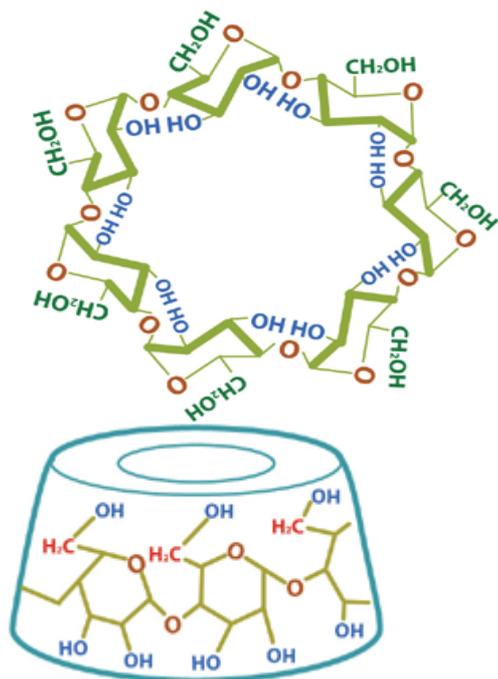


Figura 6. Estrutura da ciclodextrina , característica estrutural tronco-cônica e disposição das hidroxilas da ciclodextrina (Saltão e Veiga, 2001).

Em virtude da conformação das unidades de D- glicopiranosose nas CDs, os grupos hidroxilas secundários ficam na extremidade mais larga dos macrociclos ligados aos átomos de carbonos C₂ e C₃ e os grupos hidroxilas primários, na extremidade mais estreita ligada ao átomo de C₆. A cavidade apresenta ligações CH, (prótons H₃ e H₅), intercaladas por ligações glicosídicas de oxigênio. Os pares de elétrons não emparelhados dos átomos de oxigênio das ligações glicosídicas estão dirigidos para o interior da cavidade, produzindo elevada densidade eletrônica e proporcionando um caráter de base de Lewis (Figura 6). Por estas razões, as cavidades das CDs apresentam um caráter hidrofóbico ou semi-polar. Os prótons das ligações CH dos átomos C₁, C₂ e C₄ (prótons H₁, H₂ e H₄) estão dirigidos para o exterior da CD, tornando a superfície externa hidrofílica. Devido à liberdade conformacional dos fragmentos CH₂OH, os prótons das ligações do C₆ (prótons H₆) podem ficar dirigidos para o interior ou para o exterior do macrociclo (VENTURINI et al., 2008).

As ligações de hidrogênio intramoleculares estabelecidas entre o grupo OH ligados aos carbonos C₂ e C₃ proporcionam estabilidade ao anel macrocíclico. Na β-CD, as ligações de hidrogênio se encontram no mesmo sentido contribuindo para uma rigidez conformacional adicional do anel à essas moléculas, reduzindo sua

solubilidade em meio aquoso. Na α -CD, quatro das seis possíveis ligações de hidrogênio podem ocorrer devido a uma unidade de glicose estar em posição distorcida. A γ -CD possui uma estrutura não-coplanar, o que a torna a mais flexível e mais solúvel entre as três ciclodextrinas (SZEJTLI, 1998; LOFTSSON, DUCHENE, 2007).

As CDs naturais diferem também entre si na quantidade de números de unidade de glicose e em outras propriedades físico-químicas, as quais se encontram listadas na Tabela 1 e Figura 5.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da α , β e γ - ciclodextrina

	α -CD	β -CD	γ -CD
Unidade de glicose	6	7	8
Massa molar (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade aquosa (g/100 mL a 25°C)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro interno (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Altura da estrutura (Å)	7,9±0,1	7,9±0,1	7,9±0,1
Volume da estrutura (Å) ³	174	262	427
pKa (25°C)	12,333	12,202	12,081

Fonte: Adaptado de Szejtli, 1994.

2.3.2 - Complexos de inclusão

Devido à sua estrutura, as CDs apresentam a habilidade de formar complexos de inclusão com uma variedade de substratos, tanto em solução como em estado sólido (DEL VALLE, 2004). Esta característica tem levado a aplicação das CDs nas mais variadas áreas da indústria como: alimentos, farmacêutica, cosmética, biotecnologia, química analítica, agricultura e tecnologia ambiental (VENTURINI et al., 2008).

A formação do complexo de inclusão é determinada pelas características da molécula hóspede, como polaridade, tamanho e geometria. Esses requisitos devem ser adequados para o tamanho da cavidade apolar das CDs (MARQUES, 2010). Em solução aquosa, a cavidade hidrofóbica da ciclodextrina é preenchida por moléculas de água. A adição de moléculas hidrofóbicas, como fármacos e OE, promove o

deslocamento das moléculas de água, que se encontram originalmente no interior da cavidade da CD. Isto se dá, pois, devido ao microambiente termodinamicamente desfavorável (interação polar-apolar) da cavidade, as moléculas de água tendem a sair da cavidade da CD (SZEJTLI, 1998; MARQUES, 2010), contribuindo também para um aumento da entropia. Esse processo leva a encapsulação total ou parcial da molécula hóspede na cavidade da CD, tornando-a solúvel em água.

A complexação em meio aquoso é caracterizada pela constante de estabilidade (K_s) do complexo. Essa constante é diretamente proporcional ao grau de associação da molécula hóspede na cavidade da CD, complexos formados pouco estáveis liberam rapidamente a substância hóspede e os muito estáveis o liberam com dificuldade (BREWSTER e LOFTSSON, 2007; MARQUES, 2010). Os valores de K_s indicam como a ciclodextrina influenciou a mudança em alguma propriedade da molécula hóspede, entre elas, a solubilidade. Mas além desse valor mensurável se faz necessário também a compreensão das interações envolvidas, pois são estas que proporcionam a estabilidade ao complexo formado (LOFTSSON et al., 2004). As interações frequentemente envolvidas não são covalentes, e sim interações do tipo:

- i. Ligação de hidrogênio, a qual envolve um átomo de hidrogênio ligado a um elemento eletronegativo. Geralmente, as ligações de hidrogênio entre o hóspede e a CD são provenientes dos grupos hidroxilas primários ($C_6 - OH$) das CD's, que podem girar na ligação C_5-C_6 . Em contraste, as hidroxilas secundárias, ligadas aos carbonos C_2 e C_3 , estão rigidamente ligadas.
- ii. Interações eletrostáticas, que ocorrem quando duas moléculas de cargas opostas interagem. No caso das CDs, a interação envolvida durante a complexação é do tipo dipolo-dipolo.
- iii. As interações de van der Waals e hidrofóbicas, são consideradas as principais forças que levam a complexação, responsáveis pela estabilização do complexo de inclusão, bem como pela remoção da água na cavidade da CD (VENTURINI et al., 2008). A interação hidrofóbica é favorecida após a remoção da água presente na cavidade da CD, o que promove a agregação de moléculas hóspedes não polares em soluções aquosas (DEL VALLE, 2004).

Todas estas interações podem ser consideradas relativamente "fracas", mas proporcionam efeitos sinérgicos quando em conjunto. Desta forma, as moléculas interagem umas com as outras, resultando na formação de complexos com estabilidade suficiente para garantir seu isolamento.

III- Capítulo I

COMPLEXO DE INCLUSÃO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia gracilis* E β -CICLODEXTRINA: UMA ALTERNATIVA NO CONTROLE DAS LARVAS DE *Aedes aegypti*

Resumo

O óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer (OELG) possui ação larvicida contra larvas de *Aedes aegypti*, vetor da dengue, infecção viral responsável por grande morbidade e mortalidade no mundo. Este estudo avaliou a influência do etanol como co-solvente nos complexos de inclusão formados pelo (OELG) e β -ciclodextrina (β -CD) usando os métodos malaxagem (MA) e co-evaporação (CO), sendo uma forma de aumentar a estabilidade e solubilidade do óleo essencial em meio aquoso e avaliar a atividade larvicida contra larvas de *Aedes aegypti*. Os complexos obtidos foram avaliados por diferentes técnicas analíticas. O componente majoritário do OELG identificado na análise de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM) foi o carvacrol (46,76%). Nas curvas TG/DTG dos complexos, apresentou deslocamento do intervalo de degradação térmica para faixas de temperaturas mais elevadas, indicando um ganho de estabilidade térmica para o óleo, provavelmente resultado da interação com a β -CD. O estudo de solubilidade de fases demonstrou que o complexo é solúvel em água e a atividade larvicida do complexo por malaxagem obteve atividade larvicida (CL_{50} de 33 ppm) próxima ao do óleo puro (CL_{50} de 39 ppm) o que comprova a sua viabilidade.

Palavras-chave: Complexos de inclusão, β -ciclodextrina, Óleo Essencial de *Lippia gracilis*, larvicida.

INCLUSION COMPLEXATION OF *Lippia Gracilis* ESSENTIAL OIL IN B-CYCLODEXTRIN: AN ECOLOGICALLY SAFE ALTERNATIVE TO *Aedes Aegypti* LARVAE CONTROL.

Abstract –

The essential oil of *Lippia gracilis* (LGEO) has larvicidal potential against larvae of *Aedes aegypti*, the vector dengue fever, diseases responsible for a number of morbidity and mortality around the world. The aim of this study the influence of ethanol as co-solvent in the inclusion complexes formed between (LGEO) and β -cyclodextrin (β -CD) using the methods paste (PM) and co-evaporation (CO), is an interesting way to increase the aqueous solubility and stability of the essential oil and evaluate the larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. The complexes were evaluated by different analytical techniques. The major component of LGEO identified in the analysis of gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) was carvacrol (46.76%). In TG/DTG curves of the complexes showed displacement interval ranges to thermal degradation at higher temperatures, indicating temperature stability for the oil, probably a result of interaction with the β -CD. The phase solubility study showed that the complex is soluble in water and larvicidal activity of the complex obtained by paste larvicidal activity (LC50 of 33 ppm) next to the pure oil (LC50 of 39 ppm) which proves the feasibility.

Keywords: *Lippia gracilis* essential oil, β -cyclodextrin, inclusion complexes and larvicidal.

1-Introdução

O *Aedes aegypti* é conhecido por transmitir a febre amarela e a dengue (Gubler, 1989). A dengue é uma infecção viral causada por vírus da família Flaviridae sendo um dos principais problemas de saúde pública no mundo, devido ao grande potencial para o desenvolvimento de formas graves e letais da doença (Braga e Valle, 2007). O inseto apresenta grande dispersão em áreas urbanas (Porto et al., 2008). O controle vetorial é muito importante, consistindo na eliminação dos criadouros, além do uso de inseticidas (Lingon, 2005). Os inseticidas organofosforados como, o temefós, têm sido usados como larvicidas em vários países desde 1960 (Gubler, 1989, Braga e Valle, 2007). Entretanto, a existência de populações de *Aedes aegypti* resistentes a toxicidade destes produtos e os efeitos prejudiciais ao meio ambiente, mostram-se como um dos principais problemas de sua utilização (Macoris et al., 1999, Barreto, 2005, Braga e Valle, 2007). Nos últimos anos, têm-se intensificado pesquisas para encontrar novas substâncias que sejam efetivas no controle químico do vetor e que apresentem baixo impacto para a população não-alvo e meio ambiente. Recentes pesquisas tem focado o uso de óleos essenciais (OEs) como alternativa no controle das larvas de *Aedes aegypti* (Silva et al., 2008). A demanda por inseticidas a base de produtos naturais é crescente. Os piretróides sintéticos, atualmente bastante estáveis, são produzidos em laboratório, a partir de uma substância natural, o piretro, monoterpeno extraído de crisântemos *Chrysanthemum sp*, sendo este o primeiro produto natural usado contra mosquitos adultos (Braga e Valle, 2007).

No Brasil, dentre as plantas do semi-árido nordestino, estão várias espécies do gênero *Lippia* (Verbenaceae). *Lippia gracilis* Schauer (OELG), popularmente conhecida como alecrim-de-tabuleiro ou alecrim-da-chapada, é um arbusto caducifólio, ramificado, de até 2 m de altura (Pinto et al., 2011). O OE produzido nas folhas apresenta atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antinociceptiva, (Albuquerque et al., 2006, Guilhon et al., 2011; Lima et al., 2012). Além da ação antisséptica o OELG inibe o crescimento de vários tipos de bactérias, fungos, ácaros e insetos, devido à presença de compostos fenólicos, aldeídos e alcoóis (Silva et al., 2008, Cavalcanti et al., 2010, Bitu et al., 2011; Cruz et al., 2013). Dentro deste contexto a utilização do OELG contra larvas de *Aedes aegypti*, atribuída ao monoterpeno carvacrol, principal constituinte químico deste óleo (Silva et al., 2008), pode ser uma ferramenta alternativa no controle químico vetorial. No entanto, algumas limitações são observadas na utilização direta do OE, tais como: baixa solubilidade em meio

aquoso e volatilidade podendo ser rapidamente degradados no meio ambiente (Moretti et al., 2002; Marreto et al., 2008).

Para minimizar essas limitações do OE, a utilização de ciclodextrinas (CDs) tem sido sugerida na formação de complexos de inclusão, por possuírem propriedades físico-químicas capazes de melhorar a estabilidade dos OEs da oxidação, degradação, volatilização e solubilidade em meio aquoso (Marques, 2010). As CDs são oligossacarídeos cíclicos contendo seis, sete ou oito unidades de α -D-glicopirranose, formando um anel cuja superfície externa é hidrofílica e o interior constitui uma cavidade central hidrofóbica, na qual pode acomodar uma variedade de fármacos e outras substâncias de natureza lipofílicas (Saltão e Veiga, 2001; Venturini et al., 2008).

O objetivo deste estudo foi investigar a contribuição na utilização de etanol como co-solvente de mistura na complexação do OELG em β -CD, usando diferentes métodos de preparação e avaliação da atividade larvicida contra larvas de *Aedes aegypti*. Os complexos obtidos por malaxagem com água (MAH), malaxagem com etanol/água (MAE), co-evaporação com água (COH) e co-evaporação etanol/água (COE), foram avaliados a influência do uso de co-solvente no teor de complexação do OELG e a comparação dos métodos utilizados foram determinadas através da extração do óleo total e superficial dos complexos de inclusão. Os complexos foram caracterizados por calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria/derivada termogravimétrica (TG/DTG), determinação da umidade por Karl Fischer (KF), espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e na região do ultravioleta (UV-vis), cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (CG/EM), difratometria de Raios-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV). A solubilidade do óleo em meio aquoso foi avaliada através do diagrama de solubilidade de fases e a avaliação da atividade larvicida através da concentração letal de 50% (CL₅₀) calculada pela porcentagem de mortalidade das larvas expostas a diferentes concentrações.

2 – Material e Métodos

2.1 – Material vegetal e extração do óleo essencial

As coletas de folhas foram realizadas em seis genótipos de *Lippia gracilis* (Tabela 2), do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Plantas Medicinais da

Universidade Federal de Sergipe (UFS), localizado na Fazenda Experimental “Campus Rural da UFS”. A desfolha foi feita manualmente e secagem em estufa de secagem com circulação forçada a 40°C, por cinco dias. A extração do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Fitotecnia da UFS, através de hidrodestilação com aparelho Clevenger. Cada amostra foi composta por 75g de folhas secas, que foram destiladas por 140 min. Todas as amostras dos OEs foram juntadas para realização do presente trabalho.

Tabela 2. Acessos de *Lippia gracilis* presentes no BAG de plantas medicinais da UFS

Código	Local de origem	Dados geográficos	Nº Voucher no Herbário UFS
LGRA-107	Tomar do Geru – SE	11 19' 20,1" S; 37 55' 13,5" W	14737
LGRA-108	Tomar do Geru – SE	11 19' 22,4" S; 37 55' 12,6" W	14734
LGRA-109	Tomar do Geru – SE	11 19' 20,7" S; 37 55' 16,9" W	14735
LGRA-110	Tomar do Geru – SE	11 19' 21,1" S; 37 55' 14,9" W	14732
LGRA-201	Rio Real – BA	11 23' 38,7" S; 38 00' 54,1" W	14736
LGRA-202	Rio Real – BA	11 23' 45,3" S; 38 00' 51,3" W	14731

2.2 – Materiais e Preparação do complexo de inclusão

A β -CD foi adquirida da Sigma-Aldrich, o carvacrol 98% utilizado da marca Synthsis, e os solventes hexano, álcool absoluto e o tween-80 da marca Synthsis.

Os Complexos de inclusão foram preparados por quatro procedimentos diferentes.

Malaxagem: complexos preparados com água (MAH) ou etanol/água (MAE) pela homogeneização manual em um gral contendo β -CD (4g) em 4 mL de água (100%) e etanol/água (25/75%, v/v), respectivamente. Após, a mistura foi adicionado (0,50 g) de OELG, razão molar 1:1 (baseado no peso molecular do carvacrol), as amostras foram submetidas à secagem em dessecador, até a formação de um filme seco. Em seguida, as mesmas foram trituradas e acondicionadas em frascos plásticos (Serafini et al., 2012).

Co-evaporação: complexos preparados com água (COH) ou etanol/água (COE) adicionando β -CD (4g), OELG (0,50 g) razão molar 1:1 (baseado no peso molecular do carvacrol), em 20 mL de água (100%) ou etanol/água (25/75%, v/v), respectivamente. Homogeneização magnética foi realizada por 36 h a 400 rpm (Quimis Q 261A21), as amostras foram submetidas à secagem em dessecador, até a formação de um filme seco. Em seguida, as mesmas foram trituradas e acondicionadas em frascos plásticos (Wang et al.,2011, Serafini et al.,2012).

A mistura física (MF) foi homogeneizada manualmente em um gral contendo β -CD (4 g) e (0,50 g) de OELG, razão molar 1:1 e mantida em dessecador.

2.3 – Determinações dos terpenos no complexo de inclusão por análise de CG/EM

2.3.1 – Extração do óleo total do complexo

Água destilada (8 mL), hexano (4 mL) e (0,2 g) do complexo de inclusão, foram colocados em um becker sob agitação e aquecimento constante, a 85 °C por 20 min. A suspensão foi filtrada e o resíduo lavado com hexano (10 mL), três vezes. Depois a amostra foi concentrada em rota evaporador. Adicionou-se, hexano (1 mL) e o padrão interno mentol (2 mg) à amostra concentrada, que foi analisada por CG/EM. O total de óleo corresponderá à quantidade de óleo essencial complexado na cavidade da β -ciclodextrina mais o óleo adsorvido na superfície da mesma (Marreto et al., 2008).

2.3.2 - Extração do óleo adsorvido à superfície

Hexano (20 mL) e (3 g) do complexo de inclusão, foram colocados em um becker sob agitação por 20 min. A suspensão foi filtrada e o resíduo lavado com hexano (10 mL) três vezes, a amostra foi concentrada em rota evaporador. Em seguida, adicionou-se hexano (1 mL) e o padrão interno mentol (2 mg) à amostra concentrada, que foi analisada por CG/EM. A diferença entre o óleo total e o óleo adsorvido na superfície foi utilizada para determinar o teor de complexação do óleo (Marreto et al., 2008).

2.4 – Cromatografia gasosa – Espectro de massa (CG/EM)

As análises foram obtidas através do equipamento Shimadzu QP 5050A, sistema CG/EM de AOC-201 auto injetor Shimadzu, foram empregadas as seguintes condições: Coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária DB-5MS (30 m, 0,25 mm d.i.). O Hélio (99,999%) foi usado como gás de transporte em um fluxo constante de 1.2 mLmin⁻¹, e um volume de injeção de 0,5 μ L foi utilizado (taxa de divisão de 1:83) sendo a temperatura do injetor de 250 °C. A temperatura do forno foi programada de 50 °C (isoterma para 1,5 min), com um aumento de 4 °C min⁻¹, até 200

°C, então 10 °C min⁻¹ até 250 °C (isoterma para 5 min) . Espectro de massa foi obtido a 70 eV, com intervalo de 0,5 seg, e fragmentos de 40 a 450 Da.

A solução foi preparada dissolvendo (0,02 g) de OELG em (1 mL) de hexano.

2.4.1 – Identificação dos constituintes do óleo essencial

A identificação dos componentes do OE foi realizada com base na comparação dos índices de retenção da literatura (Adams, 2007). Para o cálculo do índice de retenção (IR) foi utilizado a equação de Van den Dool e Kratz (1963) em relação a uma serie homóloga de n-alcenos (nC_9 - nC_{18}). Também foram utilizadas três bibliotecas do equipamento WILEY8, NIST107, NIST21 que permite a comparação utilizando um índice de similaridade de 80%.

2.5 – Determinação da Umidade

O teor de umidade da β -CD, OELG e dos complexos formados foi determinado pelo método de Karl Fisher usando um KF Metrohm ® Titrande 836. As análises foram realizadas em triplicata a 25 °C (Hadaruga et al., 2012).

2.6 – Análise Térmica

As curvas DSC foram obtidas em célula DSC-50 (Shimadzu), usando porta amostra de alumínio com aproximadamente (2 mg) de amostra, sob atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL/min⁻¹), utilizando razão de aquecimento de 10°C/ min, na faixa de temperatura de 30-600°C. As curvas TG/DTG foram obtidas por meio de termobalança TGA-60 (Shimadzu), na faixa de temperatura de 30-600°C, usando porta amostra de alumínio com (3 mg) de amostra, sob atmosfera dinâmica de N₂ (100 mL/min⁻¹) e razão de aquecimento de 10°C/min (Marreto et al., 2008, Serafini et al., 2012).

2.7 - Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos em pastilhas de KBr, utilizando o equipamento da Perkin

Elmer com resolução de 4 cm^{-1} , comprimento de onda de $4000\text{ a }400\text{cm}^{-1}$ (Wang et al., 2011, Lyra et al., 2010).

2.8 – Espectroscopia na região do ultravioleta (UV-vis)

As análises foram obtidas, utilizando massa de (5 mcg) do OELG ou do terpeno carvacrol em (1 ml) de água, sendo após diluído em (10 ml) de água. Os espectros de varredura de absorção foram obtidos na faixa de 200 a 600 nm, através do espectrofotômetro UV/visível FEMTO 800XI.

Para a determinação da absorvidade molar (ϵ), no comprimento de onda de máxima absorção (λ_{Max}), foram preparadas soluções distintas na concentração de OELG (0,1 ml) em água (10 ml). A partir desta solução, diluições variando de 1×10^{-4} ; 2×10^{-4} ; 3×10^{-4} ; 5×10^{-4} ; $7,5 \times 10^{-4}$; $1,0 \times 10^{-3}$ mg/mL foram analisadas na faixa de 266 nm. A concentração (X) e a absorbância (Y) do óleo são demonstradas pela equação de regressão linear, (Macedo et al., 2012):

$$Y = 5,189x + 0,2284, R^2 = 0,9998 \quad (1)$$

2.9 – Estudo de solubilidade de fases

Os diagramas de solubilidade de fases foram obtidos de acordo com o método de Higuchi e Connors. Um excesso de OELG ($5,6 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$), foi adicionado em 10 ml de solução aquosa de β -CD com concentrações crescentes (0 ; $2,0 \times 10^{-3}$; $4,0 \times 10^{-3}$; $6,0 \times 10^{-3}$; $8,0 \times 10^{-3}$; $10,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$), sob agitação e temperaturas de $25\text{ }^\circ\text{C}$, $35\text{ }^\circ\text{C}$ e $45\text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h, sendo em seguida as amostras centrifugadas usando Centribio a 3000 rpm por 10 min e filtradas em membrana de celulose $0,45\text{ }\mu\text{m}$. As concentrações de OELG foram determinadas por espectroscopia UV-vis, no comprimento de onda (λ_{Max}) do óleo de 266 nm, usando espectrofotômetro UV/vis FEMTO 800XI, utilizando as absorvidades molares (ϵ) e as solubilidades intrínsecas (S_0) das moléculas estudadas no meio estabelecido. As análises foram realizadas em triplicata e o perfil gráfico foi obtido plotando a concentração do OELG vs. a concentração de β -CD. A constante de estabilidade ($K_{1:1}$) do complexo pode ser deduzida a partir da inclinação e da ordenada na origem do segmento linear, conforme equação, proposta por Higuchi & Connors (1965), (Macedo et al., 2012):

$$K_{1:1} = \frac{\text{inclinação}}{S_0 (1 - \text{inclinação})} \quad (2)$$

Onde, S_0 é o intercepto da linha com a ordenada do OELG em água ausente de β -CD.

Parâmetros termodinâmicos podem ser obtidos em função da temperatura e da constante de estabilidade do complexo de inclusão. A variação de entalpia (ΔH) pode ser determinada utilizando-se a equação Van't Hoff (3).

$$\frac{d \ln}{dT} = \frac{\Delta H}{R} \times \frac{1}{T^2} \quad (3)$$

Para as mudanças de energia livre de Gibbs (ΔG) e da entropia (ΔS) sobre a complexação foi determinado usando as equações, Eq. (4) e Eq.(5), respectivamente (Jun et al., 2007):

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (4)$$

$$\Delta S = \frac{(\Delta H - \Delta G)}{T} \quad (5)$$

2.10- Difratomia de Raios-X (DR-X)

A cristalinidade da β -CD, da MF e dos complexos formados foi avaliada em um difratômetro Rigaku DMAX 2000, com radiação CuK_α a 40 kV e 40 mA, velocidade de varredura de $2^\circ/\text{min}$, intervalo de $10-60^\circ$ (2θ), utilizando o método do pó (Wang et al., 2011).

2.11 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da β -CD e do complexo de inclusão (MAH), foi analisada em microscópio JEOL Model JSM-6510-LV. As amostras foram depositadas em fita de cobre e anexadas a uma lâmina, a qual foi recoberta com uma película de ouro. Posteriormente, o material foi submetido à análise de imagem em MEV, com voltagem de aceleração de 5 kV e magnitude de 5000x e 10.000x (Serafini et al., 2012).

2.12 – Atividade larvicida

Uma solução padrão de OELG (20.000 ppm) foi preparada com 100 mg de OELG ou do terpeno Carvacrol dispersos em tween-80 (0,25 mL) e água mineral (4,75 mL) em um béquer de 10 mL. A partir desta solução, diluições na faixa de 5 a 120 ppm foram preparadas em 100 mL de água, onde foram adicionadas 20 larvas de *Aedes aegypti* para cada tratamento, linhagem Rockefeller no terceiro estágio, provenientes do insetário do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe. A contagem da mortalidade se deu 24 h depois de realizados os tratamentos em triplicata. Para solução controle usou-se tween-80 (0,1 ml) e água (19.9 ml) (Silva et al., 2008)

A atividade larvicida dos complexos foi realizada apenas com método da MAH, em virtude do mesmo ter apresentado no CG-EM um teor de complexação maior em relação aos outros métodos. As concentrações do complexo utilizadas no ensaio larvicida foram determinadas através do teor de complexação. O ensaio foi realizado em triplicata, as concentrações do complexo variaram na faixa de 5 a 120 ppm e as condições utilizadas foram as mesmas pré-estabelecidas anteriormente.

2.13 - Análise estatística

Os valores foram expressos em partes por milhão (p.p.m). Utilizando método probits para concentração letal 50 % (CL₅₀) calculada pela porcentagem de mortalidade das larvas expostas a diferentes concentrações com IC - Intervalo de confiança de 95 % de probabilidade. Em todos estes procedimentos foi utilizado o programa estatístico Minitab versão 16.

3 – Resultados e Discussões

A identificação dos componentes do óleo foi similar ao observado na literatura (Cruz et al., 2013). Os componentes majoritários do OELG foram o carvacrol (46,76%), p-cimeno (10,7%), γ -terpineno (13,85%) e timol (4,99%). Os cromatogramas obtidos de cada amostra no presente estudo estão demonstrados na Tabela 3 e 4. O uso do etanol como co-solvente nos complexos de inclusão MAH e MAE não resultou em um melhor percentual de inclusão do componente majoritário (carvacrol) do OELG, listado na Tabela 3. A MAH mostrou-se superior na inclusão do carvacrol, com teor de 15,25 %, comparado com a amostra MAE de 4,53% de carvacrol.

Tabela 3. Composição química do óleo essencial de *Lippia gracilis* e dos complexos de inclusão malaxagem com água (MAH) e malaxagem etanol/água (MAE).

<i>Lippia gracilis</i>			MAH			MAE		
Óleo			Óleo	Óleo total	Óleo (%)	Óleo	Óleo Total	Óleo (%)
T _R	Componentes	%	superf.		complexado	superf.		complexado
(min)								
7.267	α – tujeno	0,83	0,24	0,54	0,30	0,29	0,41	0,12
7.483	α – pineno	0,16	0,09	0,23	0,14	0,11	0,36	0,25
9.375	Miceno	2,39	0,74	1,63	0,89	1,04	1,75	0,71
10.367	α – terpineno	2,27	0,64	1,55	0,91	1,11	1,26	0,15
10.642	p-cimeno	10,70	4,33	10,16	5,83	7,96	0,09	1,13
10.783	Limoneno	0,19	0,49	0,40	-0,09	2,76	0,75	-2,01
10.933	1,8 cineol	0,22	0,73	1,44	0,71	1,37	2,63	1,26
11.883	γ – terpineno	13,85	3,80	8,08	4,28	7,86	11,52	3,66
13.442	Linalol	0,60	0,08	0,30	0,22	0,24	0,34	0,1
16.392	Mentol (P.I)	-	64,34	37,43	-	35,30	20,17	-
16.500	Terpineno-4-ol	0,56	0,33	0,62	0,29	0,46	0,69	0,23
20.492	Tiimol	4,99	1,08	2,58	1,50	2,64	3,02	0,38
20.808	Carvacrol	46,76	14,15	29,40	15,25	35,83	40,36	4,53
25.058	E-cariofileno	5,78	2,78	1,12	-1,66	1,23	2,83	1,6
25.683	Aromadendren	0,48	0	0,09	0,09	0	0,19	0,19
26.258	α- humuleno	0,75	0,29	0,08	-0,21	0,08	0,21	0,13
27.417	Viridifloreno	0,84	0,12	0,16	0,04	0	0,38	0,38
30.142	Spatulenol	0,67	1,60	0,20	-1,4	0,10	0,28	0,18
30.325	Oxido	0,51	0,98	0,15	-0,83	0,07	0,36	0,29
	Cariofileno							

P.I = Padrão interno

As condições usadas no processo de co-evaporação usando uma maior quantidade de solvente e agitação magnética durante um tempo mais prolongado e o uso de co-solvente no complexo COE aumentou a eficiência de inclusão com um teor de 13,07 % de carvacrol, quando comparado a COH de 5,39% de carvacrol, (Tabela 4).

Tabela 4. Composição química do óleo essencial de *Lippia gracilis* e dos complexos de inclusão co-evaporação com água (COH) e co-evaporação com etanol/água (COE).

Óleo	<i>Lippia gracilis</i>		COH			COE		
			Óleo superf.	Óleo total	Óleo complex%	Óleo superf.	Óleo total	Óleo complex.%
T _R	Componentes	%						
(mim)								
7.267	α – tujeno	0,83	0,45	0,66	0,21	0,36	0,38	0,02
7.483	α – pineno	0,16	0,18	0,29	0,11	0,10	0,29	0,19
9.375	Miceno	2,39	1,62	2,43	0,81	1,02	1,13	0,11
10.367	α – terpineno	2,27	1,23	1,93	0,70	0,67	0,82	0,15
10.642	p-cimeno	10,70	7,98	11,97	3,99	5,44	6,37	0,93
10.783	Limoneno	0,19	4,59	2,05	-2,54	2,78	1,22	-1,56
10.933	1,8 cineol	0,22	1,94	2,56	0,62	0,74	0,26	-0,48
11.883	γ – terpineno	13,85	7,00	10,61	3,61	4,08	4,75	0,67
13.442	Linalol	0,60	0,27	0,33	0,06	0,19	0,76	0,57
16.392	Mentol (P.I)	-	37,30	17,91	-	57,92	37,97	-
16.500	Terpineno-4-ol	0,56	0,69	0,76	0,07	0,32	0,58	0,26
20.492	Timol	4,99	2,05	3,21	1,16	1,53	2,60	1,07
20.808	Carvacrol	46,76	30,29	35,68	5,39	20,58	33,65	13,07
25.058	E-cariofileno	5,78	1,31	2,74	1,43	1,15	1,83	0,68
25.683	Aromadendren	0,48	0,04	0,23	0,19	0	0,37	0,37
26.258	α- humuleno	0,75	0,08	0,20	0,12	0,08	0,17	0,09
27.417	Viridifloreno	0,84	0	0,41	0,41	0	0,38	0,38
30.142	Spatulenol	0,67	0,11	0,29	0,18	0,32	0,93	0,61
30.325	Oxido	0,51	0,11	0,35	0,24	0,40	0,40	0,40
	Cariofileno							

P.I = Padrão interno

A influência do etanol como co-solvente ($\epsilon=30$) modificou o valor da constante dielétrica do meio $\epsilon_{\text{meioCOH}}=70$ para uma $\epsilon_{\text{meioCOE}}=50$, o que permitiu uma melhor dispersão das moléculas de óleo no sistema. Óleos em meio aquoso tem a tendência a associarem-se a si mesmos, ao invés de interagirem com a ciclodextrina, (Marreto et al., 2008). Neste caso, uma boa mistura permitiu uma melhor dispersão e uma taxa mais rápida de complexação. Segundo Del Valle et al.,(2004), o etanol como co-solvente favorece a obtenção de um meio mais hidrofóbico, possibilitando uma maior estabilidade das interações de Van der Waals entre o hóspede e o hospedeiro. No entanto, isso depende de alguns fatores, como: concentração de etanol utilizada na mistura do solvente e variações operacionais, temperatura e tempo de agitação, nos processos de obtenção de complexos de inclusão.

Além disso, é importante notar que outros constituintes químicos como o timol, γ – terpineno, 1,8 cineol, limoneno e oxido de cariofileno, que possuem atividade biológica no OELG, descritos no trabalho de Silva et al., (2008), foram complexados

em ambos os métodos de preparo (Tabela 3 e 4), indicando a capacidade da β -CD de complexar do ponto de vista qualitativo os componentes do OELG.

Na curva DSC do OELG, apresenta três picos endotérmicos em ($T_{\text{pico}} = 107^{\circ}\text{C}$, 170°C e 230°C), correspondendo à liberação de água e sua volatilização respectivamente. Como pode ser visto na Figura. 7, nas curvas correspondentes aos complexos OELG e B-CD não apresentou pico endotérmico na faixa de volatilização do óleo puro ($T_{\text{pico}} = 170$ ou 230°C). O desaparecimento deste evento é devido à sua complexação na B-CD. Assim, nas curvas DSC dos complexos formados indicam dois picos endotérmicos: o primeiro na faixa de $80 - 120^{\circ}\text{C}$ que corresponde à liberação de moléculas de água e provavelmente a liberação do óleo adsorvido na superfície do complexo, e o segundo pico na faixa de 300°C , onde podemos atribuir que o óleo encapsulado é liberado, seguido da decomposição das moléculas de β -CD (Hadaruga et al., 2012).

Na curva DSC da β -CD os picos correspondem à liberação de água ($T_{\text{pico}} = 99^{\circ}\text{C}$) em uma temperatura maior que nas curvas DSC dos complexos e decomposição térmica a ($T_{\text{pico}} = 319^{\circ}\text{C}$), (Figura 7). A diferença na curva DSC da MF e dos complexos formados é que na MF a curva apresentou um pico largo em ($T_{\text{pico}} = 89^{\circ}\text{C}$), correspondendo à liberação de moléculas de água da β -CD e uma perda de óleo adsorvido na superfície sugerindo uma baixa complexação. Resultados semelhantes foram observados por Menezes et al.,(2012) em seu estudo de complexos de inclusão, geraniol e β -CD.

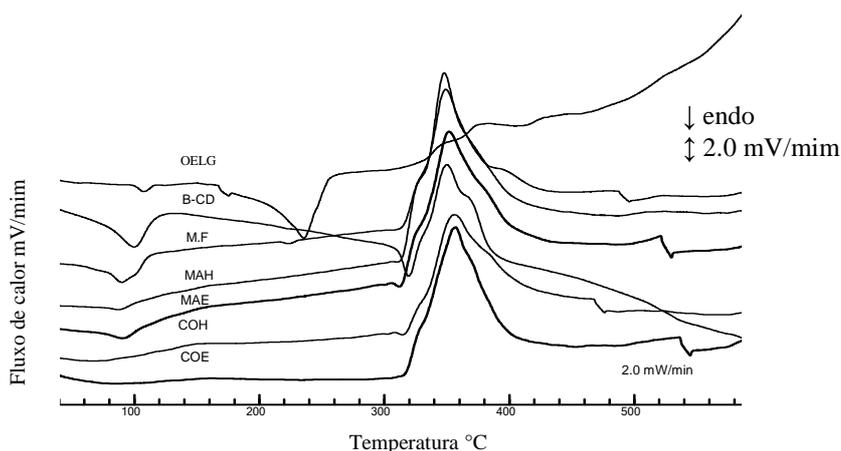


Figura 7. Curvas de DSC do óleo de *Lippia gracilis* (OELG), β -CD, mistura física (MF), malaxagem (MAH e MAE), Co-evaporação (COH e COE) em atmosfera de N_2 (100 ml/mim^{-1}) e aquecimento 10°C/mim .

No gráfico da Figura.8, as curvas TG/DTG do OELG, β -CD e dos complexos de inclusão formados e na Tabela 5 o percentual das perdas de massa calculadas a partir de intervalos específicos para cada material estudado pode-se observar que a curva do OELG ($\Delta m= 99\%$) volatilizou até 200°C. Na curva β -CD apresentou três eventos térmicos: o primeiro evento na faixa de temperatura de 30-120°C, uma perda de massa de 13,4% que corresponde à liberação de moléculas de água da cavidade da β -CD. Na segunda etapa a β -CD é termicamente estável na faixa de temperatura de 120-280°C, em seguida, a amostra sofre fusão e decomposição ($\Delta m=74\%$), entre 280-600°C.

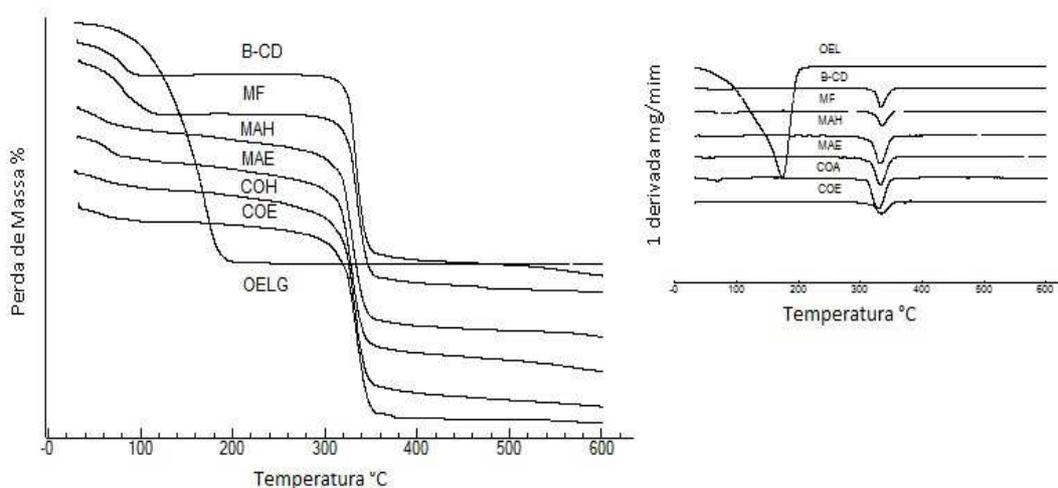


Figura 8. Curvas de TG/DTG do óleo de *Lippia gracilis* (OELG), β -CD, mistura física (MF), malaxagem (MAH e MAE), Co-evaporação (COH e COE) em atmosfera de N_2 (100 ml/min^{-1}) e aquecimento $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$.

Na curva da MF pode-se observar uma sobreposição com curva da β -CD, porem, exibiu uma perda de massa de 21,7%, na faixa de 30-120°C, que está relacionada à liberação de moléculas de água da β -CD e a volatilização do OELG (Tabela 5).

Tabela 5. Perda de massa do OELG, β -CD, Mistura Física e dos complexos formados e determinação volumétrica da água obtida pelo método de Karl Fischer.

Amostras	Perda de Massa %			% água Karl Fischer n=3
	30 – 120 °C	120 – 280 °C	280 – 400 °C	
β-CD	13,4	-	74	12,12
MF	21,7	0,3	72,2	9,45
MAH	10	7,6	76	9,84
MAE	10,2	7,8	77,6	10,43
COH	7,2	6,4	81,9	7,89
COE	7,5	7,7	77,6	9,46
		120 – 200 °C	200 – 280 °C	
OELG	20	78,2	-	1,77

Nas curvas dos complexos preparados por malaxagem com água (MAH) ou etanol/água (MAE) e co-evaporação com água (COH) ou etanol/água (COE), não apresentaram diferenças significativas de perda de massa no primeiro evento térmico entre 30-120°C, que corresponde à liberação de moléculas de água, (Tabela 5). Já na curva MAE usando co-solvente a diferença de perda de massa de 7,8% foi um pouco maior em relação a curva MAH ($\Delta m = 7,6\%$) na faixa de temperatura de 120-280°C, que pode ser atribuído a liberação do óleo de dentro da cavidade da β -CD. Por outro lado, nas curvas dos complexos preparados por (COH) e (COE), apresentaram diferenças no intervalo de 120-280°C com perda de massa de 6,4% e 7,7%, respectivamente, indicando que a COE usando co-solvente teve um percentual maior em relação à liberação do óleo a partir do seu complexo de inclusão, (Tabela 5). Esta diferença pode ser atribuída ao modo de preparação (i.e., o co-solvente permitiu uma melhor dispersão das moléculas de óleo na solução durante o processo de complexação (Martins et al., 2007).

Neste intervalo de 120-280°C as curvas MAH/MAE apresentaram uma perda de massa acentuada sugerindo uma melhor complexação do OELG em relação à COH/COE. Estes dados corroboram com as análises de DSC.

Na Tabela 5 apresenta a porcentagem de água calculada pelo método Karl Fischer (KF) e o percentual de perda de massa das curvas TG. A partir da

porcentagem de água determinado por KF, pode-se distinguir a perda de massa no TG entre óleo e água, e expressar uma quantidade teórica de óleo adicionado à complexação, substituindo as moléculas de água originais da cavidade da β -CD pelo OELG. Resultados semelhantes foram observados por Hadaruga et al.,(2012), que estudou a influência da hidrofobicidade na mistura de solventes e pré-aquecimento da água na preparação de complexos de inclusão e o uso da titulação de KF para análise de TG.

A partir da análise dos espectros de FTIR, (Figura. 9), pode-se observar que as bandas resultantes dos complexos de inclusão com a molécula hóspede apresentam deslocamento e diminuição da intensidade das bandas do OELG. É possível observar no espectro do OELG bandas em comprimento de ondas 3431, 2966, 2865, 1600, 1460, 1416, 1254, 1119, 990 e 812 cm^{-1} correspondendo aos terpenos presentes no OELG, o pico de 3431 cm^{-1} corresponde a vibrações (ν) de estiramento O-H, 2966 e 2865 cm^{-1} ν de estiramento C-H, 1600 e 1460 cm^{-1} ν estiramento C-C característico de anel aromático, ν C-H fora do plano, na região 1119, 990 cm^{-1} . O espectro de FTIR da β -CD apresentou ν das bandas 3383, 2921, 1643, 1156, 1024 e 763 cm^{-1} , sendo semelhantes comparados com a literatura (Songkro et al., 2012).

Os espectros dos complexos de inclusão e MF foram praticamente sobrepostos pelas bandas da β -CD, o espectro revelou apenas uma pequena distinção entre as bandas 3373, 2941, 1154 cm^{-1} , as quais foram deslocadas para uma frequência de menor energia quando comparado ao OELG puro (3431, 2966, 1254 cm^{-1}) respectivamente. Esta troca pode ser explicada pela formação de ligações de hidrogênio intramolecular entre OELG e β -CD deslocando a banda para uma frequência mais baixa. Resultados similares foram obtidos por Wang et al., 2011.

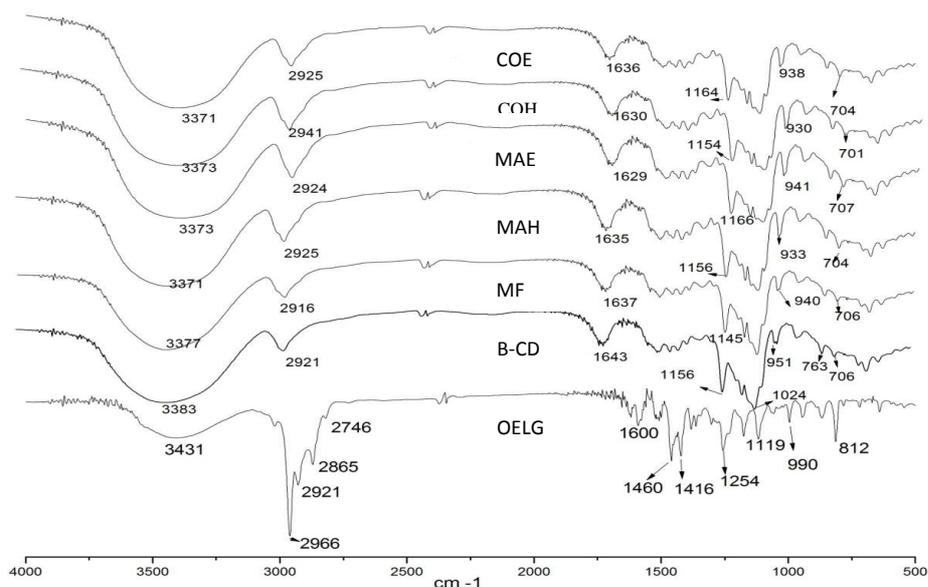


Figura 9. Espectros de FTIR do óleo essencial de *Lippia gracilis* (OELG), β -CD, mistura física (MF), dos complexos malaxagem com água (MAH), malaxagem etanol/água (MAE), coevaporação com água (COH) e coevaporação etanol/água (COE).

O diagrama de solubilidade foi determinado em água em três diferentes temperaturas, (Figura 10). As curvas do diagrama obtido podem ser classificadas como do tipo A_L , que se refere a um complexo solúvel, onde a solubilidade do OELG aumenta linearmente com aumento da concentração de β -CD, atribuindo a formação estequiométrica 1:1 entre OELG e β -CD, resultados semelhantes foram encontrados no estudo de complexo inclusão do óleo de alho com β -CD por Wang et al., (2011). A constante de estabilidade ($K_{1:1}$) e parâmetros termodinâmicos como variação de ΔH , ΔG e ΔS de complexação estão listados na Tabela 6.

Os valores termodinâmicos obtidos demonstraram que o processo de inclusão é exotérmico $\Delta G < 0$, na qual contribuiu significativamente na espontaneidade da reação. O ΔH negativo favoreceu um ΔG negativo na formação do complexo no equilíbrio e na solubilização aquosa do óleo. A correlação com ΔH e ΔS durante a complexação resulta em mudanças nas forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e na ordem relativa do sistema na associação entre o óleo e a β -CD (Jun et al., 2007).

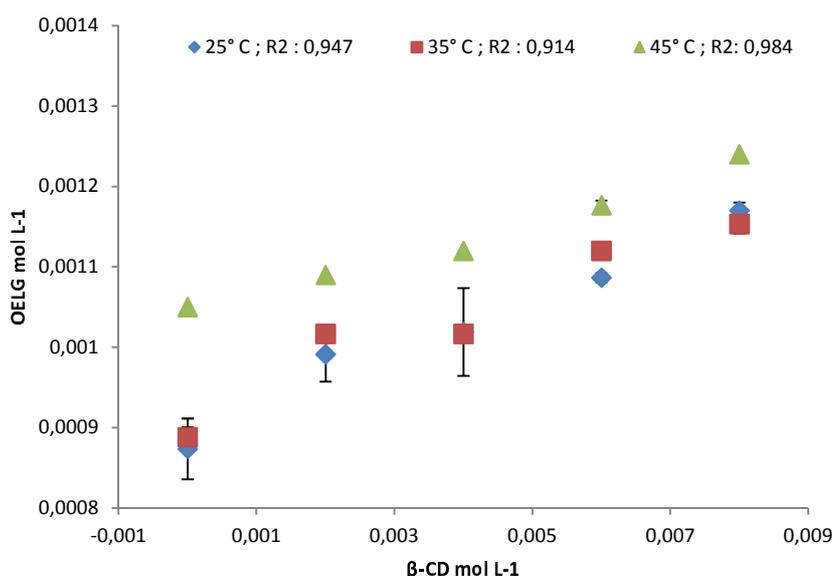


Figura 10. Diagrama de solubilidade de fase obtido em 25°, 35° e 45° C

Com o aumento da temperatura houve uma diminuição dos valores de $K_{1:1}$, 40, 33 e 22 M^{-1} a 25, 35 e 45 °C, respectivamente na formação do complexo no estado de equilíbrio. Esses valores correspondem que o óleo pode ser liberado com facilidade da cavidade da β -CD, o que é justificado pela provável redução das interações de Van der Waals e das forças hidrofóbicas. Macedo et al., (2012), em complexo de inclusão de trimetropina com 2-hidroxipropil- γ -ciclodextrina reportou valores de $K_{1:1}$ próximos aos deste estudo.

Tabela 6. Valores da constante de estabilidade e dos parâmetros termodinâmicos do complexo de inclusão MAH em diferentes temperaturas.

T °C	$K_{1:1}$ (M^{-1})	ΔH (KJ/mol)	ΔG (KJ/mol)	ΔS (J/mol.K)
25	40	-23,45	-9,14	-48,02
35	33	-23,45	-8,93	-47,14
45	22	-23,45	-8,17	-48,05

A técnica de difração de raios-X é empregada para investigar o estado cristalino das substâncias. No difratograma apresentado na Figura.11, a β -CD apresenta picos de difração com um ordenamento estrutural típico de um sólido cristalino a um ângulo de 2Θ em 10,75°, 12,6°, 14,77°, 19,63° e 22,78°. No difratograma da MF, pode-se observar que houve uma sobreposição dos padrões da

molécula da β -CD com picos de menor intensidade e, quando comparado aos difratogramas dos complexos, observa-se uma maior cristalinidade, sugerindo, assim, que há óleo livre no meio, sem interação com a β -CD.

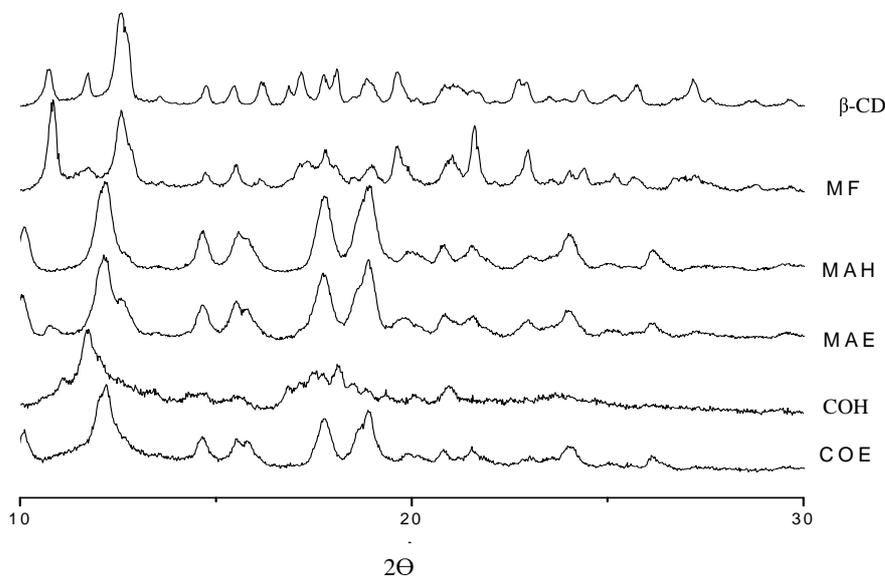


Figura 11. Difratograma de Raios-X da Beta-ciclodextrina (β -CD), Mistura-física (MF), dos complexos malaxagem com água (MAH), malaxagem água/etanol (MAE), coevaporação com água (COA) e coevaporação água/etanol (COE).

Em relação aos complexos (Figura 11), podemos observar que alguns picos originalmente encontrados na amostra pura de β -CD desapareceram em ambos os complexos, dando lugar a um novo perfil de difração, o que sugere um indicativo de formação de complexo, possivelmente através das interações de ligações de hidrogênio entre OELG e a β -CD. Analisando os quatro complexos (MAH, MAE, COH e COE), pode-se observar redução do grau de cristalinidade da COH. Resultados similares reportado por Wang et al., (2011), obteve em seu estudo um novo perfil de difração para os complexos de inclusão com óleo de alho e β -CD comparado com a β -CD pura.

As fotomicrografias eletrônicas das amostras representadas na Figura 12. A β -CD apresentou uma morfologia superficial de cristais largos de tamanho irregular e forma não definida. Por sua vez, o complexo de inclusão MAH apresentou mudanças na forma e no tamanho das partículas cristalinas, resultando em aglomerados que

sugerem uma modificação do perfil cristalino da β -CD, sugerindo assim a formação do complexo, corroborando com os resultados de DR-X.

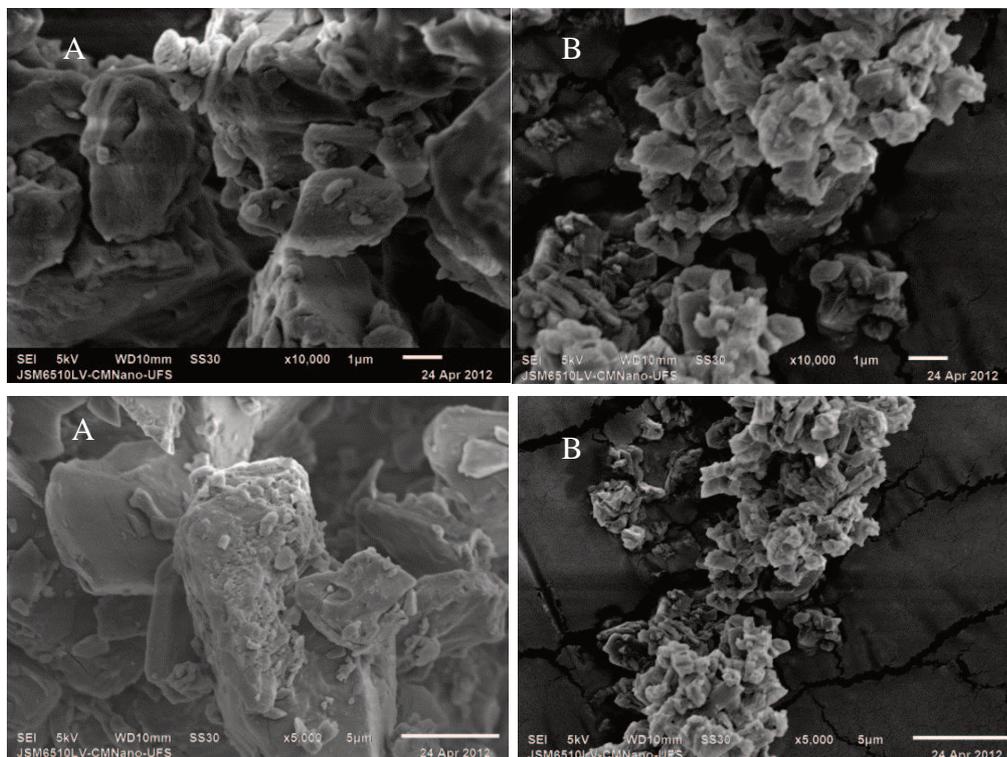


Figura 12. Imagens da MEV em 10.000 x e 5000 x de β -CD (a) e malaxagem MAH (b)

De acordo com o resultado da avaliação da atividade larvicida do OELG, (Tabela 7), pode-se observar que o óleo apresentou maior atividade larvicida contra às larvas de *Aedes aegypti*, com uma CL_{50} de 39 ppm, quando comparado ao carvacrol (componente majoritário) que apresentou uma CL_{50} de 70 ppm. Isto pode ser explicado pelo efeito sinérgico dos outros componentes minoritários (p-cineno, timol, mirceno, 1,8 cineol, limoneno e humuleno) do óleo com o carvacrol no desempenho da atividade larvicida do OELG.

Silva et al., (2008) estudaram a atividade larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* de óleos essenciais que apresentaram em sua composição em torno de 80% de monoterpenos e encontraram, dentre os monoterpenos CL_{50} de 70 ppm para o carvacrol.

Tabela 7. Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial de *Lippia gracilis* (OELG), carvacrol e do complexo de inclusão MAH, frente as larvas de *Aedes aegypti*, após 24h de exposição.

Amostra	CL50 ppm	IC PPM
OELG	39	38-42
Carvacrol	70	67-73
MAH	33	31-35

IC - intervalo de confiança 95% probabilidade

CL₅₀ - concentração letal necessária para matar 50% das larvas expostas

ppm - partes por milhão

Com relação ao complexo de inclusão MAH obteve atividade larvicida CL₅₀ de 33 ppm próxima ao do óleo puro o que comprova a viabilidade do método para complexo de inclusão com óleo essencial.

4 – Conclusões

A partir das análises feitas, é possível inferir que ocorre a complexação entre o OELG e a β -CD em ambos os métodos de preparação, por malaxagem e co-evaporação e a influência do etanol como co-solvente permitiu uma melhor dispersão das moléculas de óleo do sistema, quando utilizado um volume maior de solvente na preparação. O complexo malaxagem com água (MAH) foi o que demonstrou um maior teor de complexação do constituinte majoritário do OELG. Verificou-se ainda que o aumento da solubilidade do OELG foi crescente em função da concentração de β -CD em meio aquoso, atribuindo à formação estequiométrica 1:1 entre OELG e β -CD. Valores termodinâmicos indicam que o processo de inclusão é exotérmico e a reação é espontânea. As larvas de *Aedes Aegypti* foram suscetíveis à composição do OELG, carvacrol e do complexo MAH, tornando-se uma alternativa biolarvicida adequada aos programas de controle da dengue.

Agradecimentos

A Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior CAPES, CNPQ e a Fundação de Amparo à Pesquisa de Sergipe/ FAPITEC/SE pelo apoio financeiro.

Referências

Albuquerque, C.C.; Camara, T.R.; Mariano, R.L.R.; Willadino, L.; Marcelino, C.; Ulisses, C., 2006. Antimicrobial Action of the Essential Oil of *Lippia gracilis* Schauer. Brazilian Archives Of Biology And Technology Journal, 49 (4), 4527-535.

Barreto, C. F., 2005. *Aedes aegypti* – Resistência aos Inseticidas Químicos e as Novas Alternativas de Controle. Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos, 1, 62-73.

Braga, I.A.; Valle, D., 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiologia Serviço de Saúde. Brasília, 16(4); 279-293.

Braga, I.A.; Valle, D., 2007. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. Epidemiologia e Serviços de Saúde. Brasília, 16 (2): 113-118.

Cavalcanti, S.C.H.; Niculau, E.S.; Blank, A.F.; Câmara, C.A.G.; Araújo, I.N.; Alves, P.B., 2010. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). Bioresource Technology, v. 101, p. 829–832.

Cruz, E.M.O; Costa-junior, L.M; Pinto, J.A.O; Santos, D.A; Araujo, S.A; Arrigoni-Blank, M.F; Bacci, L; Alves, P.B; Cavalcanti, S.C.H; Blank, A.F., 2013. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Veterinary Parasitology.

Gubler, D.J., 1989. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease-control in the 1990- top down or bottom up. Am.J.Trop. Med. Hyg.40, 571-578.

Hadaruga, N.G.; Daniel I. Hadaruga, D.I.; Isengard, H.D., 2012. Water content of natural cyclodextrins and their essential oil complexes: A comparative study between Karl Fischer titration and thermal methods. Food Chemistry, 132, 1741-1748.

Jun, S.W.; Kim, M.S.; Kim, J.S.; Park, H.J.; Lee, S.; Woo, J.S.; Hwang S.J., 2007. Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process. European Journal Pharmaceutical and Biopharmaceutics, 66, 413-421.

Lingon, B. L., 2005. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: a review of the history, transmission, treatment and prevention. Seminar Pediatric Infection, 16, 60-65.

Macedo, O.F.L.; B, Andrade, G.R.S.; Conegero, L.S.; Barreto, L.S.; Costa, N.B.; Gimenez, I.F.; Almeida, L.E.; Kubota, D., 2012. Physicochemical study and characterization of the trimethoprim/2-hydroxypropyl- γ -cyclodextrin inclusion complex. Spectrochimica Acta part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 86, 101-106.

Macoris, M.D.L.G.; Andrighetti, M.T.M.; Takaku, L.; Glasser, C.M.; Garbeloto, V.C.; Cirino, V.C.B., 1999. Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. Revista de Saúde Pública, 33(5): 521-522.

Marreto, R.N.; Almeida, E.E.C.V, Alves, P.B., Niculau, E.S, Nunes, R.S, Matos, C.R.S, Araujo A.A.S., 2008. Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. Thermochemica Acta, 475, 53-58.

Marques, H.M.C., 2010. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oil and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*, 25, 313-326.

Menezes, P.P.; Serafini, M.R.; Santana, B.V.; Nunes, R.S.; Quintans Jr, L. J.; Silva, G.F.; Medeiros, I.A.; Marchioro, M.; Fraga, B.P.; Santos, M.R.V.; Araujo, A.A.S., 2012. Solid-state β -cyclodextrin complexes containing geraniol. *Thermochimica Acta*, 548, 45-50.

Moretti, M.D.L.; Sanna-Passino, G.; Demontis, S.; Bazzoni, E., 2002. Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. *AAPS PharmSciTech*. 32,1-11.

Pinto, J.A.O.; Blank, A.F.; Cruz, E.M.O.; Goes, I.B.; Fontes, S.S.; Silva, S.A.; Mann, R.S.; Blank, M.F.A., 2011. Caracterização molecular (RAPD) de acessos de alecrim-de-tabuleiro (*Lippia gracilis* Schauer). *Scientia Plena*, 7, n.9.

Porto, K. R. A.; Roel, A. R.; Silva, M. M.; Coelho, R. M.; Schelede R, E. J. D.; Jeller, A. H., 2008. Atividade larvicida do óleo de *Anacardium humile* Saint Hill sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Clididae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41, 586-589.

Saltão, R.; Veiga, F., 2001. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 3, p. 1-17.

Silva, W.J.; Dória, G.A.A.; Maia, R.T.; Nunes, R.S.; Carvalho, G.A.; Blank, A.F.; Alves, P.B.; Marçal, R.M.; Cavalcanti, S.C.H. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, 99, p. 3251-3255, 2008.

Songkro, S., Hayook, N., Jaisawang, J., Maneenuan, D., Chuchoe, T., Kaewnopparat, N., 2012. Investigation of inclusion complexes of citronella oil, citronellal and citronellol with β -cyclodextrin for mosquito repellent. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 72, 339-355.

Veiga Júnior, C., 2003. Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quím. Nova*, 16, 390-400.

Venturini, C.G., Nicolini, J., Machado, C., Machado, V.G., 2008. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Quím. Nova*, 31, 360-368.

Wang, J., Cao Y., Sun B., Wang C., 2011. Physicochemical and release characterization of garlic oil and β -cyclodextrin inclusion complexes. *Food chemistry*, 127, 1680-1685.

IV- CONCLUSÃO

A partir das análises feitas, é possível inferir que ocorre a complexação entre o OELG e a β -CD em ambos os métodos de preparação, por malaxagem e co-evaporação e a influência do etanol como co-solvente permitiu uma melhor dispersão das moléculas de óleo do sistema, quando utilizado um volume maior de solvente na preparação.

Os resultados apresentados nas análises de: TG/DTG, Karl-fischer, DSC, DRX, MEV, FT-IR e CG/EM, sugerem a formação dos complexos. O complexo obtido por malaxagem com água (MAH) foi o que demonstrou um maior teor de complexação do constituinte majoritário do OELG.

Verificou-se ainda que o aumento da solubilidade do OELG foi crescente em função da concentração de β -CD em meio aquoso, atribuindo à formação estequiométrica 1:1 entre OELG e β -CD.

Valores termodinâmicos indicam que o processo de inclusão é exotérmico e a reação é espontânea.

As larvas de *Aedes Aegypti* foram suscetíveis à composição do OELG, carvacrol e do complexo MAH.

Devido à simplicidade de preparação e à facilidade de transposição em escala industrial pelo método malaxagem, o complexo de inclusão com OELG e β -CD pode ser uma alternativa biolarvicida adequada aos programas de controle da dengue.

V- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured publishing Corporation. Carol Stream, IL, USA, 804 p., 2007.

ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; ERNANE-NETO, M.F.L.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325–354, 2007.

ALBUQUERQUE, C.C.; CAMARA, T.R.; MARIANO, R.L.R.; WILLADINO, L.; MARCELINO, C.; ULISSES, C. Antimicrobial Action of the Essential Oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Brazilian Archives Of Biology And Technology Journal**, v. 49, n. 4, p. 527-535, 2006.

AYALA-ZAVALA, J.F.; SOTO-VALDEZ, H.; GONZÁLEZ-LEÓN, A.; ÁLVAREZ-PARRILLA, E.; MARTIN-BELLOSO, O.; GONZÁLEZ-AGUIAR, G. Microencapsulation of cinnamon leaf (*Cinnamomum zeylanicum*) and garlic (*Allium sativum*) oils in β -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena Macrocyclic Chemistry**, v. 60, p. 359-368, 2008.

BARRETO, C. F. *Aedes aegypti* – Resistência aos Inseticidas Químicos e as Novas Alternativas de Controle. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v. 1, p. 62-73, 2005.

BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. Brasília, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007.

BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiologia Serviços de Saúde**. Brasília, v.16, n. 4, p. 295-302, 2007.

BRAGA, I.A.; VALLE, D.; *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e

resistência. **Epidemiologia Serviço de Saúde**. Brasília, v. 16, n. 4 p. 279-293, 2007.

BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advance Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 645-66, 2007.

BITU, V.; BOTELHO, M.A.; COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G.; VERAS, H.N.H.; MARTINS, K.T.; LYRA, A.; COLUCHI, G.G.; RUELA, R.S.; QUEIROZ, D.B.; SIQUEIRA, J. S.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Phytochemical screening and antimicrobial activity phytochemical of essential oil from *Lippia gracillis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 69-75, 2012.

BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 588-594, 2009.

BRASIL, Secretaria De Vigilância Em Saúde. **Controle da dengue no Brasil**. Estado de Sergipe; 2012. Disponível em: WWW.saude.se.gov.br/sala_de_situacao_da_dengue/ atualizado em 26/12/2012. Acesso em 28/12/2012.

_____. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6. ed. Brasília; 2005. capítulo 6, p. 231-253.

_____. Ministério Da Saúde. **Casos de dengue no país**. Brasília; 2012. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/8309/785/melhoria-na-assistencia-reduz-casos-graves-e-mortes-por-dengue.html>. Boletim 28/11/2012. Acesso em 27 de dezembro de 2012.

CAMPOS, J.; ANDRADE, C.F.S. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. **Revista Saúde Pública**, v. 35, n. 3, p. 232-236, 2001.

CARVALHO, M.D.S.L.; CALDAS, E.D.; DEGALLIER, N.; VILARINHOSA, P.T.R.; SOUZA, L.C.K.R.; YOSHIZAWA, M.A.C. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 5, p. 623-629, 2004.

CASTRO, H. G.; PERINI, V. B.M.; SANTOS, G.R.; LEAL, T. C.A.B. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciências Agrônômicas**, v. 41, n. 2, p. 308-314, 2010.

CASTRO, C.; SILVA, M.L.; PINHEIRO, A.L.; JACOVINE, L.A. G. Análise econômica do cultivo e extração do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Revista. Árvore**, v. 29, n. 2, p. 241-249, 2005.

CAVALCANTI, E.S.B.; DE MORAIS, S.M.; LIMA, M.A.A.; SANTANA, E.W.P. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 541-544, 2004.

CAVALCANTI, S.C.H.; NICULAU, E.S.; BLANK, A.F.; CÂMARA, C.A.G.; ARAÚJO, I.N.; ALVES, P.B. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*Koch). *Bioresource Technology*, v. 101, p. 829–832, 2010.

COSTA, L.C.B.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; ALVES, P.B.; EVANGELINO, T.S. Variação no rendimento e composição química do óleo essencial de folhas de atoveran (*Ocimum selloi* Benth.) inteiras e moídas sob condições de armazenamento. *Revista brasileira plantas medicinais*, v. 11, n. 1, p. 43-48, 2009.

CUNHA FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 1, p. 1-9, 2007.

CRUZ, E.M.O; COSTA-JUNIOR, L.M; PINTO, J.A.O; SANTOS, D.A; ARAUJO, S.A; ARRIGONI-BLANK, M.F; BACCI, L; ALVES, P.B; CAVALCANTI, S.C.H; BLANK, A.F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, 2013.

DAWIDOWICZ, A.L.; RADO, E. Matrix solid-phase dispersion (MSPD) in chromatographic analysis of essential oils in herbs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 79–85, 2010.

DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1033-1046, 2004.

EDRIS, E.A.M.R. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A Review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 308-323, 2007.

FERNANDES, C.M.; VEIGA, F.J.B. As ciclodextrinas na tecnologia farmacêutica produção, estrutura e propriedades. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 20, p. 335-351, 1999.

FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDROAND, L.G.; SCHEFFER, J.J.C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 213-226, 2008.

FRANCISCO, C.S.; MESSIANO, G.B.; LOPES, M.X.; TININIS, A.G.; OLIVEIRA, J.E.; CAPELLARI, L. Classification of Aristolochia species based on GC-MS and chemometric analyses of essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, p. 168-175, 2008.

FUNASA (Fundação Nacional de Saúde). Dengue: instruções para pessoal de combate ao vetor. **Manual de normas técnicas**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

GONCALVES, K.S.; MESSIAS, M.C. Ocorrência de Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) (Insecta, Diptera, Culicidae) em bromélias, no município do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil). **Biota Neotropica**, v. 8, n. 1, p. 235-237, 2008.

GUILHON, C.C.; RAYMUNDO, L.J.R.P.; ALVIANO, D.S.; BLANK, A.F.; BLANK, M.F.A.; MATHEUS, M.E.; CAVALCANTI, S.C.H.; ALVIANO, C.S.; FERNANDES, P.D. Characterization of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *lippia gracilis* essential oil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 135, p. 406-413, 2011.

HADARUGA, N.G.; DANIEL I. HADARUGA, D.I.; ISENGARD, H.D. Water content of natural cyclodextrins and their essential oil complexes: A comparative study between Karl Fischer titration and thermal methods. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1741-1748, 2012.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. *Advances Analysis Chemistry Instruments*. V. 4, p. 117-212, 1965.

JUN, S.W.; KIM, M.S.; KIM, J.S.; PARK, H.J.; LEE, S.; WOO, J.S.; HWANG S.J. Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process. **European journal pharmaceutical and biopharmaceutics**, v. 66, p. 413-421, 2007.

LIMA, G.M., QUINTANS-JUNIOR, L.J.; THOMAZZI, S.M.; ALMEIDA, E.M.S.A.; MELO, M.S.; SERAFINI, M.R.; CAVALCANTI, S.C.H.; GELAIN, D.P.; SANTOS, J.P.A.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; OLIVEIRA, P.M.; LIMA, J.T.; ROCHA, R.F.; MOREIRA, J.C.F.; ARAUJO, A.A.S. Phytochemical screening, antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Chrysopogon zizanioides* essential oil. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 22, n. 2, p. 443-450, 2012.

LOFTSSON, T.; MASSON, M.; BREWSTER, M.E. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, p. 1091-1099, 2004.

LOFTSSON, T.; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 1-11, 2007.

LINGON, B. L. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: a review of the history, transmission, treatment and prevention. **Seminar Pediatric Infection**, v. 16, p. 60-65, 2005.

LUNA, J.E.D.; MARTINS, M.F.; ANJOS, A.F.; KUWABARA, E.F.; NAVARRO-SILVA, M.A. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 6, p. 842-843, 2004.

MACEDO, O.F.L.; B, ANDRADE, G.R.S.; CONEGERO, L.S.; BARRETO, L.S.; COSTA, N.B.; GIMENEZ, I.F.; ALMEIDA, L.E.; KUBOTA, D. Physicochemical study and characterization of the trimethoprim/2-hydroxypropyl- γ -cyclodextrin inclusion complex. *Spectrochimica Acta part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. V. 86, p. 101-106, 2012.

MACORIS, M.D.L.G.; ANDRIGHETTI, M.T.M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C.M.; GARBELOTO, V.C.; CIRINO, V.C.B. Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n. 5, p. 521-522, 1999.

MARRETO, R.N.; ALMEIDA, E.E.C.V, ALVES, P.B., NICULAU, E.S, NUNES, R.S, MATOS, C.R.S, ARAUJO A.A.S. Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropil-b-cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. **Thermochimica Acta**, v. 475, p. 53-58, 2008.

MARQUES, H.M.C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oil and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 313-326, 2010.

MENEZES, P.P.; SERAFINI, M.R.; SANTANA, B.V.; NUNES, R.S.; QUINTANS JR, L. J.; SILVA, G.F.; MEDEIROS, I.A.; MARCHIORO, M.; FRAGA, B.P.; SANTOS, M.R.V.; ARAUJO, A.A.S. Solid-state β -cyclodextrin complexes containing geraniol. **Thermochimica Acta**, v. 548, p. 45-50, 2012.

MORAES, C, M.; ABRAMI, P.; GONÇALVES, M, M.; FILHO, N, A. Preparação e Caracterização físico-química de complexos de inclusão entre anestésicos locais e hidroxipropil- β -ciclodextrina. *Quimica Nova*, v. 30, p. 777-784, 2007.

MORETTI, M.D.L.; SANNA-PASSINO, G.; DEMONTIS, S.; BAZZONI, E. Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. **AAPS PharmSciTech**, v. 32, p. 1-11, 2002.

NGUEFACK, J.; TAMGUE, O.; LEKAGNE DONGMO, J.B.; DAKOLE, C.D.; LETH, V.; VISMER, H.F.; AMVAM ZOLLO, P.H.; NKENGFACK, A.E. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **Food Control**, v. 23, p. 377-383, 2012.

OPREAN, R.; TAMAS, M.; SANDULESCU, R.; ROMAN, L. Essential oils analysis. Mass spectra identification of terpene and phenylpropane derivatives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 1163 – 1168, 2001.

PINTO, J.A.O.; BLANK, A.F.; CRUZ, E.M.O.; GOES, I.B.; FONTES, S.S.; SILVA, S.A.; MANN, R.S.; BLANK, M.F.A. Caracterização molecular (RAPD) de acessos de alecrim-de-tabuleiro (*Lippia gracilis* Schauer). **Scientia Plena**, v. 7, n. 9, 2011.

PORTO, K. R. A.; ROEL, A. R.; SILVA, M. M.; COELHO, R. M.; SCHELEDE R, E. J. D.; JELLER, A. H. Atividade larvicida do óleo de *Anacardium humile* Saint Hill sobre

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera, Clicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 586-589, 2008.

POUPARDIN, R.; REYNOUD, S.; STRODE, C.; RANSON, H.; VONTAS, J.; DAVID, J.F. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 540-551, 2008.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 3, p. 1-17, 2001.

SEMEN, E.; HIZIROGLU, S. Production, Yield and Derivatives of Volatile Oils from Eastern Redcedar (*Jeniperus virginiana* L). **American Journal Environmental Sciences**, v. 1, p. 133 -138, 2005.

SILVA, A.F.; BARBOSA, L.C.A. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L) POIT. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 6, p. 1-7, 2003.

SILVA-SANTOS, A.; BIZZO, H.R.; ANTUNES, A.M.S.; D'AVILA, I.A. A proteção patentária na utilização de óleos essenciais e compostos terpenicos para o desenvolvimento tecnológico e industrial. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 14, p. 14-22, 2006.

SILVA, W.J.; DÓRIA, G.A.A.; MAIA, R.T.; NUNES, R.S.; CARVALHO, G.A.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; MARÇAL, R.M.; CAVALCANTI, S.C.H. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3251-3255, 2008.

SOUZA, S.P.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; GUIMARAES, L.G.L.; ANDRADE, J.; MALLETT, A.C.T.; NELSON, D.L. Óleo essencial de *Baccharis tridentata* Vahl: composição química, atividade antioxidante e fungitóxica, e caracterização morfológica das estruturas secretoras por microscopia eletrônica de varredura. **Revista brasileira de plantas mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 456-466, 2011.

SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U.C. Biotechnological applications of cyclodextrins. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 341–359, 2002.

SZEJTLI, J. Cyclodextrin complexed generic drugs are generally not bio-equivalent with the reference products: therefore the increase in number of marketed drug/cyclodextrin formulations is so slow. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 52, p. 1-11, 2005.

_____. Cyclodextrins in drug formulations: part II. **Pharmaceutical Technology International**, v. 3, p. 16-24, 1991.

_____. Cyclodextrins. In: FRÖMMING, K.; SZEJTLI, J. **Cyclodextrins in Pharmacy**. London: Kluwer Academic Publishers, v. 5, p. 1-18, 1994.

_____. **Inclusion Compounds**. London: Academic Press, 1984.

_____. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Review**, v. 98, p. 1743-1753, 1998.

ULTEE, A.; SMID, E.J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 373–378, 2001.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D. A generalization of retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **J. Chromatography**, v. 11, p. 463–471, 1963.

VEIGA JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 16, p. 390-400, 2003.

VEIGA, F.J.B.; PECORELLI, C.C.M.F.; RIBEIRO, S.S.L. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. Coimbra: Minerva Coimbra, 2006.

VENTURINI, C.G; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V.G. Propriedades e Aplicações recentes das ciclodextrinas. **Revista Química Nova**, v. 31, p. 360-368, 2008.

WANG, J., CAO Y., SUN B., WANG C. Physicochemical and release characterization of garlic oil and β -cyclodextrin inclusion complexes. **Food chemistry**, v. 127, p. 1680-1685, 2011.

ANEXO I

RESUMO ACEITO NO 7º ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO - UFS

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia gracilis* SCHAUER E AVALIAÇÃO DE SEU EFEITO CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*

ANEXO II

VIII CBRATEC



III PAN-AMERICANO

**VIII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria
III Congresso Pan-Americano de Análise Térmica e Calorimetria
01 a 04 de abril de 2012 – Campos do Jordão – SP - Brasil**

Certificamos que o trabalho intitulado "**COMPLEXAÇÃO DO OLEO ESSENCIAL DE LIPPIA GRACILIS COM B-CICLODEXTRINA USANDO CO-SOLVENTE NOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO**" de autoria de "**PATRICIA CERPE, VIVIANE F.SILVA, ADÉLIA SANTOS, ADRIANA J.SANTOS, FERNANDA MORAES, ANA AMÉLIA LIRA, GABRIEL F.SILVA, ADRIANO A.S.ARAUJO, ROGÉRIA S.NUNES**" foi apresentado na modalidade PÔSTER, durante o VIII Congresso Brasileiro e III Congresso Pan-Americano de Análise Térmica e Calorimetria, realizado de 01 a 04 de abril de 2012 em Campos do Jordão - São Paulo - Brasil.

ANEXO III

Deposito de Pedido de patente sob nº BR 10 2012030899