

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, DOCKING MOLECULAR E ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CITRUS X LIMON* (L.) OSBECK

CHEMICAL COMPOSITION, MOLECULAR DOCKING AND LARVICIDAL ACTIVITY OF *CITRUS X LIMON* (L) OSBECK ESSENTIAL OIL

Paulo Roberto Barros Gomes*

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Diretoria de Educação, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4221-6577>

Dionney Andrade de Sousa

Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Tecnologia Química, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4788-036X>

Gustavo Oliveira Everton

Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Tecnologia Química, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0457-914X>

Maria Alves Fontenele

Universidade Federal do Maranhão, Coordenação do Curso de Licenciatura em Ciências Naturais, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0780-7563>

Romicy Dermondes Souza

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Tecnologia Rural e Animal, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4477-453X>

Hilton Costa Louzeiro

Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Tecnologia Química, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7479-5879>

Maria Luiza Miguez

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais, Departamento de Ensino, Pesquisa e Extensão, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-6886-1245>

Eduardo Fonseca Silva

Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Tecnologia Química, Brasil.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2999195013431824>

Victor Elias Mouchrek Filho

Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Tecnologia Química, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2855-7292>

* Autor correspondente

e-mail: prbgomes@yahoo.com

Received 22 February 2025; received in revised form 20 April 2026; accepted 10 June 2026

RESUMO

Introdução: O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor de arboviroses de grande relevância para a saúde pública, incluindo dengue, Zika, chikungunya e febre amarela. Para combater a *Aedes aegypti* é utilizado larvicidas químicos, que apesar da eficácia, trazem riscos ambientais e podem ocasionar resistência. Óleos essenciais, como o de Citrus limon, surgem como alternativas sustentáveis, devido à sua atividade larvicida, baixa toxicidade, biodegradabilidade e complexidade química, que reduz a probabilidade de resistência.

Objetivo: O presente estudo descreve a composição química do óleo essencial destilado das cascas de Citrus x limon (L) Osbeck e avalia se ele tem atividade biológica contra larvas de terceiro estágio do *Aedes aegypti*.

Métodos: O óleo essencial foi extraído pelo método de hidrodestilação e seus compostos foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). O óleo foi analisado quanto a sua atividade larvicida, onde a concentração letal foi calculada pelo método Probit. O mecanismo de ação do óleo foi avaliado por docking molecular. **Resultados e Discussão:** A análises revelaram que o óleo é predominantemente composto por monoterpenos, com limoneno como o componente majoritário (75,77%),

seguido por o-cimeno (9,24%) e β -pineno (7,48%). Ademais, o óleo demonstrou atividade larvídica, com concentração letal de 44,11 $\mu\text{g/mL}$. Estudos de docking molecular indicaram interações significativas entre os principais compostos e as proteínas-alvo, com afinidades de ligação variando de $-5,97$ a $-6,56$ kcal/mol para acetilcolinesterase e proteína transportadora de esteróis-2, sugerindo um mecanismo de ação múltiplo. **Conclusões:** Conclui-se, portanto, que o óleo é ativo e possui potencial para substituir larvicidas sintéticos.

Palavras-chave: *Compostos voláteis; monoterpenos; Aedes aegypti; limoneno*

ABSTRACT

Introduction: The mosquito *Aedes aegypti* is the primary vector of arboviruses of major public health concern, including dengue, Zika, chikungunya, and yellow fever. Chemical larvicides are commonly used to control *Aedes aegypti*; however, despite their efficacy, they pose environmental risks and may lead to resistance. Essential oils, such as that from *Citrus limon*, have emerged as sustainable alternatives due to their larvicidal activity, low toxicity, biodegradability, and chemical complexity, which reduces the likelihood of resistance development. **Objective:** This study describes the chemical composition of the essential oil distilled from the peels of *Citrus x limon* (L.) Osbeck and evaluates its biological activity against third-instar larvae of *Aedes aegypti*. **Methods:** The essential oil was extracted by hydrodistillation, and its components were identified by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). Larvicidal activity was assessed, and the lethal concentration was determined using the Probit method. The oil's mechanism of action was investigated through molecular docking studies. **Results and Discussion:** Analyses revealed that the oil is predominantly composed of monoterpenes, with limonene as the major component (75.77%), followed by o-cymene (9.24%) and β -pinene (7.48%). Furthermore, the oil exhibited larvicidal activity, with a lethal concentration of 44.11 $\mu\text{g/mL}$. Molecular docking studies showed significant interactions between the main compounds and target proteins, with binding affinities ranging from -5.97 to -6.56 kcal/mol for acetylcholinesterase and sterol carrier protein-2, suggesting a multi-target mechanism of action. **Conclusions:** The essential oil from *Citrus x limon* is therefore active and shows potential as a replacement for synthetic larvicides.

Keywords: *Volatile compounds; monoterpenes; Aedes aegypti; limonene.*

1. INTRODUÇÃO:

O *Aedes (A) aegypti* L. (Diptera: Culicidae) é um mosquito que transmite doenças virais graves, como dengue, Zika, chikungunya e febre amarela. É encontrado principalmente em regiões tropicais e subtropicais e apresenta notável adaptabilidade a ambientes urbanos, onde encontra condições favoráveis para o desenvolvimento de larvas, permitindo o ciclo de vida completo do mosquito (Zara, Santos, Fernandes-Oliveira, Carvalho, & Coelho, 2016). De acordo com os dados mais recentes do Ministério da Saúde do Brasil (Brasil, 2022), houve um aumento de 184,6% nos casos de dengue entre 2021 e 2022. Durante o mesmo período, os casos de chikungunya aumentaram 86,9% e os casos de Zika aumentaram 96,6%. A adaptabilidade reprodutiva do *Aedes aegypti* e seu potencial de transmissão de doenças virais graves ressaltam a importância das medidas de controle.

Algumas das abordagens contra a proliferação do *A. aegypti* e a consequente transmissão de doenças virais incluem o uso de vacinas, predadores biológicos e larvicidas químicos (Baldacchino *et al.*, 2015). Recentemente, uma vacina eficaz contra o vírus da dengue, a Qdenga®, foi aprovada para uso por

agências reguladoras em vários países, como a Agência Europeia de Medicamentos (Angelin *et al.*, 2023) e ANVISA (Brasil, 2023). No entanto, vacinas eficazes contra os outros vírus transmitidos pelo *A. aegypti* ainda estão sendo estudadas (Marin-Lopez, Wang, Jiang, Ledizet, & Fikrig, 2021; Wang, Marin-Lopez, Jiang, Ledizet, & Fikrig, 2020). O uso de predadores biológicos é uma estratégia ecológica para o controle do *A. aegypti*; dessa forma, existe a possibilidade de que a introdução dessas espécies cause desequilíbrio no ecossistema (Bowatte, Perera, Senevirathne, Meegaskumbura, & Meegaskumbura, 2013). Entre eles, o uso de larvicidas químicos tem sido o mais utilizado devido à sua eficiência, praticidade e controle direto das larvas e pupas do *A. aegypti*. Os principais larvicidas químicos utilizados no combate às larvas de *A. aegypti* incluem organofosforados como o temefós, fipronil e piretróides (Aldridge *et al.*, 2022; Farder-Gomes *et al.*, 2024; Kim, Khan, Estep, Cantrell, & Le, 2025). Contudo, o uso constante desses larvicidas podem causar impactos negativos. O uso frequente de pesticidas sintéticos pode causar contaminação ambiental, afetar organismos não-alvo (incluindo humanos e animais), e favorecer o surgimento de resistência nas populações de mosquitos (Farder-Gomes *et al.*, 2024; da Silva *et al.*, 2025; Sittichok *et al.*,

2024). Como exemplo de impacto negativo em humanos, o fipronil, mesmo em baixas concentrações, pode causar alterações comportamentais, danos ao intestino médio e morte celular nas larvas, além de afetar enzimas de desintoxicação (Farder-Gomes *et al.*, 2024). Como alternativa aos larvicidas químicos, o uso de óleos essenciais tem sido explorado.

Os óleos essenciais são substâncias naturais voláteis compostas por uma variedade de componentes, como terpenos, monoterpenos, compostos fenólicos e outros, cuja composição depende da planta de extração (Dhifi, Bellili, Jazi, Bahloul, & Mnif, 2016) e foi comprovado que alguns têm atividade larvicida (Gomes *et al.*, 2018, 2019, 2020, 2022). Os óleos essenciais oferecem uma abordagem não tóxica para o controle de larvas e biodegradabilidade, minimizando os impactos ambientais adversos, e têm uma baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência de larvas devido à sua composição complexa (Nerio, Olivero-Verbel, & Stashenko, 2010). Essas propriedades os tornam mais vantajosos em comparação com os larvicidas sintéticos.

Embora os óleos essenciais apresentem vantagens promissoras em relação aos larvicidas sintéticos, seu uso como substituto parcial ou total requer mais informações sobre seus mecanismos de ação larvicida. A diversidade na composição dos óleos essenciais indica possíveis mecanismos múltiplos de ação, reduzindo a possibilidade de resistência das larvas (Dris, Tine-Djebbar, Bouabida, & Soltani, 2017). Para investigar esses mecanismos, a pesquisa de acoplamento molecular está surgindo como uma ferramenta eficaz para examinar as interações entre compostos de óleos essenciais e alvos de proteínas e proteínas relevantes para o crescimento larval.

O acoplamento molecular é uma técnica usada para prever a interação entre duas moléculas, como uma proteína e um ligante (Pagadala, Syed, & Tuszynski, 2017) envolvendo a simulação de como o ligante se encaixa no local ativo da proteína, formando um complexo estável. O processo usa algoritmos de computador para explorar todas as orientações e conformações possíveis do ligante, identificando a melhor combinação que maximiza a afinidade e a estabilidade do complexo (Guedes, de Magalhães, & Dardenne, 2014). Ao analisar os componentes do óleo por meio de acoplamento molecular, é possível analisar como eles agem nas proteínas que são cruciais para a sobrevivência das larvas. Esse entendimento é particularmente relevante para plantas com

potencial larvicida conhecido, como as plantas do gênero *Citrus*.

Entre as plantas com composições de maior interesse para o controle de larvas de *A. aegypti* está a *Citrus limon* L., também conhecida como limão. É uma planta da família *Rutaceae* e cultivada em várias partes do mundo, especialmente em países subtropicais (González-Molina, Domínguez-Perles, Moreno, & García-Viguera, 2010). O óleo essencial extraído dessa planta tem propriedades medicinais, dada a sua complexa composição de sesquiterpenos, terpenos, hidrocarbonetos aromáticos e derivados oxigenados. Entre suas aplicações estão ações antimicrobianas, antioxidantes, antidiabéticas, antivirais e larvicidas (Dosoky & Setzer, 2018).

Apesar da ação larvicida do óleo essencial de *Citrus limon* L., sua eficácia na eliminação das larvas de *Aedes aegypti* tem sido pouco explorada. Portanto, o presente estudo descreve a composição química do óleo essencial destilado das cascas de *Citrus x limon* (L) Osbeck e avalia se ele tem atividade biológica contra larvas de terceiro estágio do *Aedes aegypti*.

2. MATERIAL E MÉTODOS:

2.1. Obtenção e extração de óleo essencial

Partes estruturais e representativas (flores e frutos) da planta, medindo de 30 a 40 cm de tamanho, foram coletadas em uma área rural de São José de Ribamar-MA, Brasil, em janeiro de 2018, no período da manhã, nas coordenadas geográficas latitude 02°35'51,8"S e longitude 44°09'33,3"W para identificação botânica e extração do óleo essencial. Após essa coleta, o material foi certificado pelo Laboratório de Estudos Botânicos da Universidade Federal do Maranhão com o número 11169. Uma vez identificados, os frutos foram separados das demais partes, descascados com bisturi e armazenados em uma bandeja para a extração do óleo essencial.

A destilação do óleo foi realizada por hidrodestilação, e o rendimento médio foi calculado com base nas medições de densidade e no peso do material (Gomes *et al.*, 2020). Para a extração, as amostras foram pesadas (400 g), misturadas (4000 mL) com água destilada na proporção de 1:10, colocadas em um balão de fundo redondo acoplado a um extrator do tipo Clevenger e aquecidas a 100°C em uma manta de

aquecimento elétrico por 4 horas. Após esse tempo, o óleo destilado foi coletado e seco por percolação em solução de sulfato de sódio anidro (Synth, Diadema, Brasil) e armazenado em frascos de vidro âmbar a 4°C para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis. A densidade foi medida em um picnômetro de 5 mL a uma temperatura de 25°C, e o material foi pesado em uma balança analítica (Gomes *et al.*, 2019, 2020).

2.2. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

A identificação dos componentes do óleo destilado foi realizada por meio de um cromatógrafo a gás acoplado à espectrometria de massa, de acordo com o estudo realizado por Sousa e colegas (Sousa *et al.*, 2023). Para esse fim, as amostras foram analisadas em um cromatógrafo a gás (Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado a um espectrômetro de massa (QP2020AS), usando hélio como gás de arraste com uma taxa de fluxo na coluna de 2,5 mL/min; temperatura do injetor: 280°C, divisão 1:50; coluna capilar de silicone CarbolWax e metilfenil 5% (30m x 0,25mm x 0,25mm) e programa de temperatura do forno de 60°C a 280°C. No espectrômetro de massa, a temperatura foi ajustada para 280°C e os espectros foram registrados de 35 a 550 m/z. Foram injetadas alíquotas de 1 µL (injetor automático CP - 8410) das amostras diluídas em uma proporção de 20 µL em 1,5 mL de hexano. Os componentes foram identificados pela comparação de seus índices de retenção com dados obtidos de substâncias autênticas em bibliotecas de referência NIST14 e área de normalização.

2.3. Captura e reprodução de larvas de *Aedes aegypti*

A deposição dos ovos ocorreu em baldes de polietileno de 500 mL, onde foram adicionados água e dois pedaços de palitos de eucalipto durante os meses de janeiro e fevereiro de 2019. Após a deposição, os ovos foram colocados em um recipiente de 200mL com água mineral a uma temperatura de 31°C para a eclosão. Após a eclosão, as larvas foram mantidas em temperatura ambiente de 25 ± 2°C, umidade relativa de 70 a 80% e alimentadas com ração para cães até atingirem o terceiro estágio (Gomes *et al.*, 2019).

2.4. Ensaio larvicida

A realização desse ensaio seguiu a metodologia descrita pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (World Health Organization, 2005). Inicialmente, dez larvas de terceiro estágio foram transferidas para copos descartáveis e expostas a três concentrações de óleo destilado (10, 50 e 100 µg/mL) por um período de 24 horas para verificar a presença ou ausência de atividade. Uma vez confirmada a atividade, os testes foram realizados em quintuplicata a partir do mesmo lote de larvas, onde dez larvas foram submetidas a dois tratamentos: um com cinco soluções de óleo destilado (50 a 90 µg/mL) preparadas a partir de sua dissolução em dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,1% e o outro, um controle negativo apenas com solução de DMSO a 0,1%. Portanto, para verificar a atividade larvicida, o resultado da concentração letal (CL₅₀) foi calculado e comparado com os critérios estabelecidos por Cheng *et al.* (2003) que consideram o óleo altamente ativo quando apresenta CL₅₀ < 50 µg/mL; ativo quando é < 100 µg/mL e inativo quando é > 100 µg/mL.

2.5. Avaliação *in silico*

2.5.1. Docking cego exploratório de proteína-ligante

O acoplamento cego foi utilizado para explorar minuciosamente as superfícies das proteínas acetilcolinesterase (ACE) e Sterol Carrier Protein-2 (SCP2) para identificar e prever bolsões. Essa abordagem foi escolhida porque a maioria dessas proteínas não foi estudada experimentalmente. A estrutura tridimensional da SCP2 foi baixada do banco de dados do Protein Data Bank (PDB ID: 1PZ4) e limpa usando o PyMOL Molecular Graphics System, versão 3.1.1 (Schrödinger, LLC.). A sequência de codificação (CDS) da acetilcolinesterase foi recuperada do banco de dados de nucleotídeos do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (GenBank: ABN09910.1) e a estrutura da proteína foi prevista com o Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.2 (Phyre2.2) usando o modo de modelagem intensiva (Kelley, Mezulis, Yates, Wass, & Sternberg, 2015). O modelo foi considerado uma boa previsão quando apresentado com 75% ou mais dos resíduos modelados com mais de 90% de confiança e com pelo menos 30% de identidade do primeiro modelo classificado.

Posteriormente, as estruturas das proteínas foram preparadas com o

AutoDockTools (ADT) versão 1.5.7 (Morris *et al.*, 2009), com a adição de hidrogênios polares e cargas de Kollman. A grade de receptores foi determinada para cada proteína para compreender toda a estrutura da proteína. Os principais constituintes do óleo essencial de *Citrus limon* foram usados como ligantes, a saber, limoneno ($C_{10}H_{16}$), β -pineno ($C_{10}H_{16}$) e o-cimeno ($C_{10}H_{14}$). Neste estudo, o temefós ($C_{16}H_{20}O_6P_2S_3$) também foi usado como ligante devido à sua atividade larvícida. A adição de hidrogênios e a otimização da geometria usando o Universal Force Field (UFF) foram realizadas no software Avogadro (Hanwell *et al.*, 2012) e as cargas de Gasteiger foram adicionadas com ADT. As simulações de acoplamento cego proteína-ligante foram realizadas em triplicata com o AutoDock Vina 1.2.0 (Eberhardt, Santos-Martins, Tillack, & Forli, 2021).

2.5.2. Acoplamento específico de proteína-ligante

Os receptores e os ligantes foram preparados conforme descrito acima. O acoplamento molecular do local ativo foi realizado em triplicata usando o AutoDock Vina 1.2.0 (Eberhardt *et al.*, 2021). Os locais específicos previstos foram determinados com base nos resultados de acoplamento cego. Foram selecionados os locais com maior afinidade de ligação para cada ligante. Cada proteína tinha um ou dois locais diferentes para cada um dos compostos testados. Foram definidas grades para todos os locais com um tamanho de $30 \times 30 \times 30$ Å e espaçamento de 0,375 Å, e a exaustão foi definida como 16. A eficiência do ligante (LE) representa os resultados de Vina da afinidade de ligação (Kcal/mol) normalizada pelo tamanho do composto (Hopkins, Groom, & Alex, 2004) e foi calculado com o RDKit, versão 2023.09.5. Todas as imagens foram geradas usando o BIOVIA Discovery Studio Visualizer, versão 24.1.0.23298 (Dassault Systèmes Corp).

2.5.3 Redocking molecular

O redocking foi feito apenas na proteína SCP-2 de *Aedes aegypti*, visto que para a acetilcolinesterase de *A. aegypti* não há estruturas cristalizadas disponíveis no PDB de organismos que sejam próximos. A estrutura cristalizada SCP-2 de *Aedes aegypti* está disponível no Protein Data Bank (PDB ID: 1PZ4) em complexo com ácido palmítico. O ligante co-cristalizado foi removido da estrutura proteica e convertido para

o formato .pdbqt usando o AutoDock Tools (versão 1.5.7) e em seguida o ligante passou por redocking na mesma posição. O grid box foi definido com base nas coordenadas do ligante na estrutura cristalizada. As simulações foram feitas com AutoDock Vina (versão 1.2.3). Os parâmetros usados foram dimensões da grid box ajustadas ao sítio de ligação (não padronizadas como $40 \times 40 \times 40$ Å), espaçamento de 0,375 Å e exaustividade definida como 16. O procedimento foi repetido três vezes para verificar se os resultados eram consistentes. A pose com maior afinidade de ligação foi selecionada para cálculo do RMSD (Root Mean Square Deviation) entre essa pose e a posição do ligante na estrutura cristalizada utilizando o PyMOL Molecular Graphics System (versão 3.1.1, Schrödinger, LLC).

2.6. Tratamento estatístico

A análise Probit foi usada para calcular a CL_{50} , e os resultados foram apresentados como média, desvio padrão, limite de confiança superior e limite de confiança inferior, calculados usando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) com um nível de significância definido como $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1. Extração do óleo e análise de composição

Para verificar o rendimento e identificar os componentes presentes no óleo destilado, realizamos a medição da densidade e a análise cromatográfica acoplada à espectrometria de massa (GC/MS). Por meio da extração, o óleo apresentou um rendimento e uma densidade de 2,45% (p/v) e 0,850 g/mL, respectivamente. A análise cromatográfica revelou a presença de 16 compostos (Tabela 1) com predominância de monoterpenos, entre os quais se destacaram o limoneno (75,77%), o-cimeno (9,24%) e o β -pineno (7,48%), cuja a estrutura apresentada na Figura 1. O limoneno possui uma ligação dupla e duas ramificações metila/isopropenil. O o-cimeno apresenta um anel benzênico ligado a um grupo metila e um grupo isopropila. Já o β -pineno, possui dois anéis fundidos, com um grupo metileno exocíclico e dois grupos metila.

Em nosso estudo atual, só foi possível identificar o limoneno, o composto predominante, conforme determinado pelos resultados da análise de GC/MS dos tempos de retenção, área

normalizada e comparação dos dados do cromatograma com os dados da biblioteca existente. Esse resultado é consistente com o estudo realizado por Gomes e colegas (2019) quando avaliaram a composição química do óleo essencial das cascas de *C. limon* obtidas em um bairro periférico do município de São Luís. Nesse estudo, os autores utilizaram os métodos de destilação e a identificação de compostos semelhantes ao que realizamos revelou a predominância do limoneno em frações superiores a 50%. Um estudo similar foi realizado por Paw *et al.* (2020) ao também estudar a composição de óleo essencial das cascas de *Citrus limon*. Todavia, diferente do nosso estudo, os autores identificaram que o componente majoritário, o limoneno, representava apenas 55,40 % da composição do óleo, enquanto em nosso estudo, foi encontrada concentrações mais elevadas de limoneno (75,77%). Outras diferenças em nossos estudos estão nos demais compostos majoritários. Enquanto em nosso estudo foi encontrado o-cimeno (9,24%) e o β -pineno (7,48%), o estudo de Paw *et al.* (2020) encontrou neral (10,39%), trans-verbenol (6,43%) e decanal (3,25%). Esse contraste pode ser explicado por fatores associados ao clima, solo, altitude ou variedade da planta (Luro *et al.*, 2020). Apesar disso, em ambos os estudos, o composto majoritário foi o limoneno, característico de espécies do gênero *Citrus*. Outros estudos realizados com métodos semelhantes também confirmaram a predominância do limoneno para outras espécies de *Citrus*. As espécies conhecidas são *C. limonia* (Gomes *et al.*, 2020), *C. aurantifolia* (Sousa *et al.*, 2023) e *C. sinensis* (Gomes *et al.*, 2021), que foram coletados de diferentes partes e obtiveram frações de 44,75%, 81,69% e 89,55%, respectivamente. Embora sejam de espécies diferentes, os resultados obtidos ainda são consistentes com as frações predominantes de limoneno em *Citrus* em geral, que variam de 30 a 97% (Mehl *et al.*, 2014; Simas, Amorim, Oliveira, Alviano, & Silva, 2015). Como observado, os resultados concordam com relação à predominância, mas diferem com relação às frações desse constituinte. Assim, inferimos que as diferenças observadas resultam de vários fatores, desde sazonalidade, tempo de extração, fatores abióticos até o simples redirecionamento das vias metabólicas da planta (Blank *et al.*, 2007; Cerqueira *et al.*, 2009; Figueiredo, Barroso, Pedro, & Scheffer, 2008; Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

[Tabela 1]

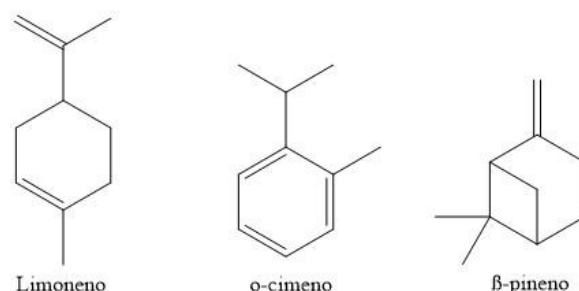


Figura 1. Estruturas químicas dos principais componentes do óleo essencial de *Citrus x limon* (L.) Osbeck

3.2. Atividade larvicida

Para avaliar a atividade larvicida, dez larvas foram submetidas a dois tipos de tratamento: um experimental (concentrações de óleo variando de 50 a 90 $\mu\text{g/mL}$) e um controle negativo com DMSO 0,1%. Posteriormente, a CL_{50} foi calculada usando o método Probit e comparada com os parâmetros estabelecidos por Cheng *et al.* (2003). À medida que aumentamos a concentração de óleo, foi observado um aumento na mortalidade, levando a uma CL_{50} de 44,11 (Tabela 2). Comparando o resultado da CL_{50} com os critérios descritos por Cheng *et al.* (2003) para atividade, o óleo foi considerado ativo, pois apresentou uma CL_{50} inferior a 100 $\mu\text{g/mL}$. Confirmamos a atividade larvicida do óleo essencial de *C. limon* (L.) Osbeck comparando a CL_{50} calculada com os critérios estabelecidos por Cheng *et al.* (2003). De acordo com esses autores, um óleo essencial é ativo contra larvas quando a CL_{50} é menor que 100 $\mu\text{g/mL}$.

Apesar de não haver um critério padronizado estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para qualificar a atividade larvicida dos óleos essenciais, o resultado de nosso estudo está alinhado com estudos anteriores (Gomes *et al.*, 2019, 2020, 2022; Sousa *et al.*, 2023) que identificou o limoneno como o principal componente e o associou à atividade contra larvas de *Ae. aegypti* para *C. limon* e outras espécies de *Citrus*. Apesar das semelhanças nesses estudos em relação ao método de extração do óleo, ao estágio larval e à análise durante o verão, observamos uma variação significativa nos valores de CL_{50} para *C. limon* (CL_{50} = 15,48 $\mu\text{g/mL}$), *C. aurantifolia* (CL_{50} =

18,68 µg/mL) e *C. limonia* (CL₅₀ = 67,18 µg/mL) (Gomes *et al.*, 2019, 2020, 2022; Sousa *et al.*, 2023). Isso nos leva a inferir que a baixa letalidade observada em nosso estudo não está relacionada ao estágio larval ou ao momento da análise durante a estação (Cetin, Erler, & Yanikoglu, 2004; Fernandez *et al.*, 2014, 2018), mas sim a variações no período de desenvolvimento da planta e no ciclo circadiano (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). Além disso, outro ponto a ser observado é o horário das coletas, pois elas ocorreram em horários diferentes, sendo que apenas a nossa foi coletada pela manhã.

[Tabela 2]

A atividade larvicida do limoneno observada neste estudo pode estar relacionada à sua estrutura, fragrância e alterações histofisiológicas. Em um estudo conduzido por Santos *et al.* (2011) para avaliar a relação estrutura-atividade dos monoterpenos, os autores afirmaram que a potência larvicida é afetada pela estrutura do limoneno e que as ligações duplas endo e exo foram mais ativas do que as alterações estruturais decorrentes da adição de heteroátomos. O estudo conduzido por Rod (1997) atribui a atividade à forte fragrância do limoneno, que não apenas repele, mas também mata insetos que atacam as árvores. Enquanto isso, o estudo de Oliveira *et al.* (2021) que avaliaram os distúrbios histológicos, histoquímicos e energéticos causados pelo limoneno em larvas de *Ae. aegypti*, concluíram que esse composto afeta a capacidade de absorção de nutrientes, alterando a membrana peritrófica do intestino médio, inibindo assim a retenção de compostos vegetais isolados e causando a morte das larvas.

Assim, a presença do limoneno como composto predominante no óleo essencial das cascas de *C. limon* apenas indica que o óleo é um agente larvicida em potencial, mas não garante a eficácia na letalidade, pois há vários fatores que influenciam isso. Um estudo realizado por Lima *et al.* (2021) reforça essa hipótese ao demonstrar que o limoneno isoladamente apresenta maior atividade biológica que o óleo essencial de *Hedychium coronarium*, que contém limoneno (5,2%), β-pineno (17,0%) e p-cimeno (4,9%). Todavia, os autores reforçam a ideia de que a combinação dos constituintes do óleo pode potencializar o efeito biológico devido à sinergia. Esse sinergismo pode ocorrer devido à atuação dos componentes em múltiplos alvos celulares, à

facilitação da penetração de compostos mais ativos por moléculas menos ativas ou à modulação de mecanismos de resistência microbiana (Langeveld, Veldhuizen, & Burt, 2014). Por outro lado, nem todas as combinações são sinérgicas. Algumas podem ser aditivas ou até antagonista, dependendo das proporções e dos alvos biológicos (Bassolé & Juliani, 2012). Portanto, a identificação e otimização dessas interações são fundamentais para potencializar o uso de óleos essenciais.

3.3. Docking molecular

O acoplamento molecular concentrou-se apenas nos compostos predominantes do óleo, limoneno, β-pineno e o-cimeno, que foram selecionados por apresentarem uma maior concentração. Foi usado como controle positivo o temefós, cuja estrutura química é mostrado na Figura 2. As proteínas-alvo usadas foram a acetilcolinesterase (AChE) e a proteína transportadora de esterol-2 (SCP2). No acoplamento cego (Tabela 3), a AChE mostrou o temefós como o ligante com a maior afinidade (-7,02 kcal/mol), seguido pelo limoneno (-5,92 kcal/mol) e para a SCP-2 o β-pineno mostrou a maior afinidade (-6,48 kcal/mol), seguido pelo limoneno (-6,47 kcal/mol).

[Tabela 3]

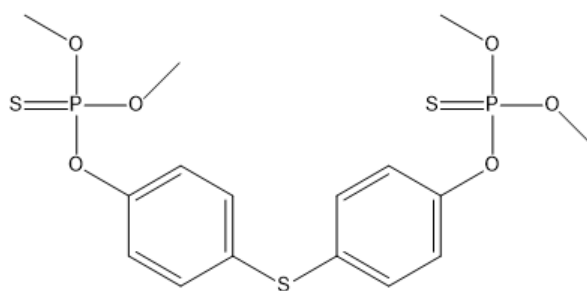


Figura 2. Estrutura química do temefós

No acoplamento específico no local ativo (Tabela 3), o temefós apresentou a maior afinidade de ligação (-7,78 kcal/mol) com a AChE, apesar de sua menor eficiência de ligação (-0,29). Entre os compostos do óleo, o o-cimeno apresentou a maior afinidade com a AChE (-6,14 kcal/mol). Para a SCP-2, o temefós apresentou a maior afinidade (-7,45 kcal/mol), enquanto os

compostos no óleo apresentaram valores semelhantes, variando de 6,56 a -6,39 kcal/mol. Em termos de eficiência de ligação, os compostos do óleo variaram de -0,64 a -0,66, mais altos do que o controle positivo temefós, que apresentou uma eficiência de ligação de -0,28.

Para validar o protocolo de docking molecular usado presente no estudo, foi feito um teste de redocking aplicado à proteína SCP-2 de *A. aegypti*, utilizando o ácido palmítico como ligante. O procedimento foi repetido três vezes para garantir convergência dos resultados. A pose com maior afinidade de ligação foi selecionada para cálculo do desvio quadrático médio (RMSD) em relação à posição original do ligante na estrutura cristalográfica, utilizando o software PyMOL. O valor de RMSD obtido foi de 2,179 Å. Esse valor, embora acima do limiar ideal de 2,0 Å (Wei *et al.*, 2022; Yang & Chen, 2004), encontra-se dentro da faixa aceitável para validação de protocolos de docking.

[Tabela 3]

Os diagramas de interação 2D (Figura 3) mostram como os ligantes Temefós e o-cimeno se ligam às proteínas SCP2 e ACHE. Ambos os ligantes, Temefós e o-cimeno, foram selecionados para visualização dos tipos de ligação por terem as maiores afinidades de ligação com as enzimas. Na enzima ACHE, Temefós faz ligações de hidrogênio com TRP A:212 e GLY A:246, além de também ter interações polares com GLU A:215 e SER A:250. Já no SCP2, o Temefós possui ligações de hidrogênio com GLN A:25, interações π -cátion com ARG A:24, e interações hidrofóbicas com VAL A:26 e ILE A:19. O o-cimeno se liga com a enzima ACHE por meio de ligações hidrofóbicas com TYR A:456 e TRP A:212 e interações de Van der Waals com GLY A:246. Na SCP2, o-cimeno faz ligações hidrofóbicas LEU A:16, interações π - π com PHE A:105, e interações de Van der Waals com ILE A:19. Essas ligações são principalmente hidrofóbicas e aromáticas, o que explica sua maior eficiência de ligação, superior ao Temefós. O o-cimeno é um monoterpene aromático, composto por um anel benzênico e cadeias laterais hidrocarbonadas (Balahbib *et al.*, 2021) que podem se ligar aos resíduos hidrofóbicos das proteínas por interações de Van der Waals e interações π - π através do anel benzênico presente no o-cimeno e nas proteínas (Balahbib *et al.*, 2021; Tapala, Ndlangamandla, Ngoepe, & Clayton, 2024).

Alguns outros mecanismos larvicidas relatados para o o-cimeno são a ruptura da parede celular (Santos *et al.*, 2010), estresse oxidativo (Costa *et al.*, 2022), danos ao sistema digestivo (Yu, Wong, Ahmad, & Jantan, 2015) e ação sobre enzimas essenciais para a função larval, como a AChE (Waliwitiya, Kennedy, & Lowenberger, 2009), resultados que estão de acordo com os apresentados neste estudo. No entanto, além da interação com a AChE, observamos por meio de acoplamento molecular que o o-cimeno também tem uma forte afinidade de ligação com a SCP-2. Isso se deve à alta lipolicidade do o-cimeno, que se liga ao sítio ativo apolar da SCP-2, que é especializado no transporte de moléculas de lipídios, como o colesterol, um nutriente essencial para o crescimento e o desenvolvimento dos mosquitos (Larson, Wessely, Jiang, & Lan, 2014). Essa combinação de mecanismos larvicidas destaca o uso do o-cimeno como um larvicida natural e eficiente. Os mecanismos do limoneno, o principal composto do óleo essencial do *C. limon*, são semelhantes aos do o-cimeno, pois, além de causar danos ao sistema digestivo (Oliveira *et al.*, 2021), causam ruptura da parede celular devido à lipofilicidade (Santos *et al.*, 2011) e inibição da atividade da AChE (Botas *et al.*, 2017).

Além dos mecanismos já relatados, observamos, a partir do acoplamento molecular, que o limoneno também atua ligando a SCP-2, competindo pelos locais ativos com o colesterol. Embora tanto o o-cimeno quanto o limoneno tenham uma energia de ligação menor do que o temefós (controle positivo), esses compostos apresentaram melhor afinidade de ligação tanto para a AChE quanto para a SCP-2, sugerindo ligações mais estáveis e específicas. O SCP-2 é conhecido por ter locais de ligação hidrofóbica para interagir com lipídios (Larson *et al.*, 2014). O limoneno e o o-cimeno, por serem lipofílicos, formam interações hidrofóbicas com os locais ativos do SCP-2, possivelmente bloqueando o transporte de lipídios essenciais para o desenvolvimento das larvas (Du *et al.*, 2012). O mecanismo de inibição da enzima AChE se deve à presença de regiões apolares que interagem com os componentes do óleo (Steinberg, Mednick, Maddox, Rice, & Cramer, 1975) e também devido à presença de resíduos aromáticos (Krishna, Chavali, & Uberbacher, 2013). Embora o temefós seja amplamente usado como larvicida, sua menor afinidade de ligação indica que compostos como o limoneno e o o-cimeno são alternativas mais eficazes e possivelmente mais seguras para o meio ambiente. Os resultados indicam vários

mecanismos de reação tanto para o limoneno quanto para o o-cimeno, o que dificulta o desenvolvimento de resistência pelas larvas.

[Figura 3]

4. CONCLUSÃO:

A destilação das cascas de *Citrus x limon* (L) Osbeck por hidrodestilação possibilitou a identificação da composição química do óleo e a avaliação de sua atividade larvicida contra o *Aedes aegypti*. A partir dessas análises, descobrimos que o óleo é predominantemente composto de limoneno e apresentou atividade larvicida contra o organismo testado. O mecanismo de ação dos componentes principais é semelhante ao dos larvicidas comerciais, com interação com a acetilcolinesterase e a proteína transportadora de esterol-2, inibindo tanto as funções neotransmissoras quanto o transporte de colesterol. Portanto, esse óleo tem o potencial de atividade biológica para ser usado como substituto de larvicidas químicos ou como complemento a eles. Para validar sua aplicação em condições reais, recomenda-se a realização de testes de campo em diferentes ambientes, bem como estudos de toxicidade ambiental para avaliar possíveis impactos sobre organismos não-alvo e a persistência do produto no meio ambiente.

5. DECLARAÇÕES

5.1. Limitações do Estudo

Os resultados deste estudo são limitados em relação ao rendimento do óleo, ao período de desenvolvimento da planta e à sua aplicação apenas em um estudo in vitro; se aplicado a um sistema real, pode não produzir os mesmos resultados. Apesar de essas características afetarem a letalidade, elas não excluem seu potencial larvicida. Além disso, de acordo com a literatura, os componentes estudados apresentam menor citotoxicidade do que os componentes sintéticos. Estudos comparativos mostram que o limoneno e outros terpenos possuem uma atividade citotóxica moderada, enquanto os temefós, um composto químico altamente utilizando como larvicida, exibe maior toxicidade em concentrações muito menores (Sarma, Adhikari, Mahanta, & Khanikar, 2019). Além disso, os óleos essenciais são biodegradáveis, menos persistentes no ambiente e geralmente considerados seguros para organismos não-alvo, incluindo humanos e

animais, reduzindo assim o risco de poluição ambiental e bioacumulação (Senthil-Nathan, 2020). Portanto, o óleo essencial destilado das cascas de *Citrus x limon* (L) Osbeck é um possível candidato, atuando como substituto de larvicidas sintéticos ou complementando-os

5.2. Agradecimentos

Os autores expressam seus agradecimentos à Universidade Federal do Maranhão (UFMA) pelo suporte institucional proporcionado ao longo deste trabalho.

5.3. Fontes de Financiamento

Os autores declaram que não receberam suporte financeiro de agências de fomento públicas, comerciais ou sem fins lucrativos para a realização desta pesquisa.

5.4. Conflitos de Interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse nem interesses concorrentes

5.5. Disponibilidade de Dados

Todos os dados apresentados neste estudo estão disponíveis nas tabelas e figuras do manuscrito. Os dados brutos estão disponíveis mediante solicitação ao autor correspondente

5.6. Contribuições dos Autores

Paulo Roberto Barros Gomes: Concepção e design (CD), coleta de dados (DC), análise e interpretação de dados (DAI), escrita do manuscrito (MW), aprovação final (FA).

Dionney Andrade de Sousa: Coleta de dados (DC), análise e interpretação de dados (DAI), revisão crítica (CR), aprovação final (FA).

Gustavo Oliveira Everton: Coleta de dados (DC), análise e interpretação de dados (DAI), revisão crítica (CR), aprovação final (FA).

Maria Alves Fontenele: Análise e interpretação de dados (DAI), revisão crítica (CR), aprovação final (FA).

Romicy Dermondes Souza: Análise e interpretação de dados (DAI), revisão crítica (CR), aprovação final (FA).

Hilton Costa Louzeiro: Análise e interpretação de dados (DAI), revisão crítica (CR),

aprovação final (FA).

Maria Luiza Miguez: Análise e interpretação de dados (DAI), revisão crítica (CR), aprovação final (FA).

Eduardo Fonseca Silva: Revisão crítica (CR), aprovação final (FA).

Victor Elias Mouchrek Filho: Concepção e design (CD), análise e interpretação de dados (DAI), revisão crítica (CR), aprovação final (FA).

Code	English	Português
CD	Conception and Design	Concepção e Design
DC	Data Collection	Coleta de Dados
DAI	Data Analysis and Interpretation	Análise e Interpretação de Dados
MW	Manuscript Writing	Escrita do Manuscrito
CR	Critical Review	Revisão Crítica
FA	Final Approval	Aprovação Final

5.7. Declaração de Ferramentas de IA e Computacionais

Ferramenta: ChatGPT (OpenAI). Propósito: Apoio à redação científica, revisão gramatical e estilística, reformulação de trechos textuais. Extensão: Utilizado exclusivamente como ferramenta de assistência à escrita durante a preparação do manuscrito. Todas as alterações foram revisadas e aprovadas pelo autor correspondente. Nenhuma IA foi utilizada para análise de dados, testes estatísticos ou interpretação

5.8. Declaração de Integridade da Pesquisa

Os autores declaram que a pesquisa atende aos padrões de integridade de pesquisa. Marque tudo que se aplica.

5.9. Declaração de Originalidade e Plágio

Os autores declaram que este manuscrito é original e não contém plágio. Inclua: Análise realizada por duas ferramentas revelaram índice de similaridade em até 20%. Ferramenta de Verificação de Plágio: CopySpider versão 3.5.3 e Paperpal Plagiarism Check. Índice de Similaridade/Percentagem: >10%.

Declarações de Originalidade:

- Este manuscrito é um trabalho original não publicado anteriormente nem em revisão em outro local.
- Nenhum texto foi copiado de outras fontes

sem a devida citação e aspas.

- Todas as fontes estão devidamente citadas no formato APA.
- Este manuscrito não está sendo considerado para publicação em outro local no momento.

5.10. Licença de Acesso Aberto

Este artigo está licenciado sob uma Licença Internacional Creative Commons Atribuição 4.0 (CC BY 4.0), que permite o uso, compartilhamento, adaptação, distribuição e reprodução em qualquer meio ou formato, desde que você dê o devido crédito ao(s) autor(es) original(is) e à fonte, forneça um link para a licença Creative Commons e indique se foram feitas alterações. As imagens ou outro material de terceiros neste artigo estão incluídos na licença Creative Commons do artigo, a menos que indicado de outra forma em uma linha de crédito para o material. Se o material não estiver incluído na licença Creative Commons do artigo e seu uso pretendido não for permitido por regulamentação legal ou exceder o uso permitido, você precisará obter permissão diretamente do detentor dos direitos autorais. Para ver uma cópia desta licença, visite <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

6. ESTUDOS RELACIONADOS COM HUMANOS E ANIMAIS

6.1. Aprovação do Comitê de Ética

Não aplicável.

6.2. Consentimento Informado

Não aplicável.

7. REFERÊNCIAS:

1. Aldridge, R. L., Alto, B. W., Connelly, C. R., Okech, B., Siegfried, B., & Linthicum, K. J. (2022). Lethal and Sublethal Concentrations of Formulated Larvicides Against Susceptible *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 38(4), 250–260. Retrieved from <https://jamca.kglmeridian.com/view/journals/moco/38/4/article-p250.xml>
2. Angelin, M., Sjölin, J., Kahn, F., Ljunghill Hedberg, A., Rosdahl, A., Skorup, P., Werner, S., *et al.* (2023). Qdenga® - A promising dengue fever vaccine; can it

- be recommended to non-immune travelers? *Travel Medicine and Infectious Disease*, 54, 102598. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1477893923000583>
3. Balahbib, A., El Omari, N., Hachlafi, N. E., Lakhdar, F., El Menyiy, N., Salhi, N., Mrabti, H. N., *et al.* (2021). Health beneficial and pharmacological properties of p-cymene. *Food and Chemical Toxicology*, 153, 112259. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691521002921>
 4. Baldacchino, F., Caputo, B., Chandre, F., Drago, A., della Torre, A., Montarsi, F., & Rizzoli, A. (2015). Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. *Pest Management Science*, 71(11), 1471–1485. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.4044>
 5. Barros Gomes, P. R., De Assunção, G. V., Oliveira Everton, G., Souza de Lima, H., Fernandes de Araújo, J. R., Fonseca Silva, E., Vasconcelos Melo, A., *et al.* (2021). Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of the bark of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 50(1). Retrieved from <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/95448>
 6. Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989–4006. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1420-3049/17/4/3989>
 7. Blank, A. F., Costa, A. G., Arrigoni-Blank, M. de F., Cavalcanti, S. C. H., Alves, P. B., Innecco, R., Ehlert, P. A. D., *et al.* (2007). Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(4), 557–564. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2007000400014&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 8. Botas, G., Cruz, R., De Almeida, F., Duarte, J., Araújo, R., Souto, R., Ferreira, R., *et al.* (2017). Baccharis reticularia DC. and Limonene Nanoemulsions: Promising Larvicidal Agents for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Control. *Molecules*, 22(11), 1990. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/11/1990>
 9. Bowatte, G., Perera, P., Senevirathne, G., Meegaskumbura, S., & Meegaskumbura, M. (2013). Tadpoles as dengue mosquito (*Aedes aegypti*) egg predators. *Biological Control*, 67(3), 469–474. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1049964413002351>
 10. Brasil. Ministério da Saúde. (2022). *Ministério da Saúde lança campanha de combate ao mosquito Aedes aegypti de 2022*. Retrieved from <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/outubro/ministerio-da-saude-lanca-campanha-de-combate-ao-mosquito-aedes-aegypti-de-2022>
 11. Brasil. Ministério da Saúde. (2023). *Anvisa aprova nova vacina contra a dengue*. Retrieved from <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2023/anvisa-aprova-nova-vacina-para-a-dengue>
 12. Cerqueira, M. D. de, Marques, E. de J., Martins, D., Roque, N. F., Cruz, F. G., & Guedes, M. L. da S. (2009). Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). *Química Nova*, 32(6), 1544–1548. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000600035&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 13. Cetin, H., Erler, F., & Yanikoglu, A. (2004). Larvicidal activity of a botanical natural product, AkseBio2, against *Culex pipiens*. *Fitoterapia*, 75(7–8), 724–728. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X04001844>
 14. Cheng, S.-S., Chang, H.-T., Chang, S.-T., Tsai, K.-H., & Chen, W.-J. (2003). Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technology*, 89(1), 99–102. Retrieved from

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852403000087>
15. Costa, M. B. S., Simões, R. de C., Silva, M. de J. A. da, Oliveira, A. C. de, Acho, L. D. R., Lima, E. S., Tadei, W. P., *et al.* (2022). Oxidative stress induction by crude extract of *Xylaria* sp. triggers lethality in the larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 55. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822022000100312&tlng=en
 16. Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities. *Medicines*, 3(4), 25. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2305-6320/3/4/25>
 17. Dosoky, N. S., & Setzer, W. N. (2018). Biological activities and safety of Citrus spp. essential oils. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1966. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/7/1966>
 18. Dris, D., Tine-Djebbar, F., Bouabida, H., & Soltani, N. (2017). Chemical composition and activity of an *Ocimum basilicum* essential oil on *Culex pipiens* larvae: Toxicological, biometrical and biochemical aspects. *South African Journal of Botany*, 113, 362–369. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S025462991731075X>
 19. Du, X., Ma, H., Zhang, X., Liu, K., Peng, J., Lan, Q., & Hong, H. (2012). Characterization of the sterol carrier protein-x/sterol carrier protein-2 gene in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Physiology*, 58(11), 1413–1423. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022191012002065>
 20. Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., & Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New docking methods, expanded force field, and python bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(8), 3891–3898. Retrieved from <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jcim.1c00203>
 21. Farder-Gomes, C. F., Miranda, F. R., Fernandes, K. M., Bernardes, R. C., Sena Bastos, D. S., Licursi de Oliveira, L., Martins, G. F., *et al.* (2024). Exposure to low-concentration fipronil impairs survival, behavior, midgut morphology and physiology of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere*, 358, 142240. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653524011330>
 22. Fernandez, C. M. M., Barba, E. L., Fernandez, A. C. M., Cardoso, B. K., Borges, I. B., Takemura, O. S., Martins, L. de A., *et al.* (2014). Larvicidal activity of essential oil from *Tetradenia riparia* to control of *Aedes aegypti* larvae in function of season variation. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(5), 813–823. Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2014.892841>
 23. Fernandez, C. M. M., da Rosa, M. F., Fernandez, A. C. A. M., Lorenzetti, F. B., Raimundo, K. F., Cortez, D. A. G., Gonçalves, J. E., *et al.* (2018). Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Laurus nobilis* leaves obtained at different seasons. *Journal of Essential Oil Research*, 30(5), 379–387. Retrieved from <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10412905.2018.1473294>
 24. Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., & Scheffer, J. J. C. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(4), 213–226. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ffj.1875>
 25. Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30(2), 374–381. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000200026&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 26. Gomes, P. R. B., Oliveira, M. B., Sousa, D. A. De, Silva, J. C. Da, Fernandes, R. P., Louzeiro, H. C., & Oliveira, R. W. S. De. (2019). Larvicidal activity, molluscicide and toxicity of the essential oil of Citrus limon peels against, respectively, *Aedes aegypti*,

- Biomphalaria glabrata and Artemia salina. *Ecletica Quimica*, 44(4), 85–95.
27. Gomes, P. R. B., de Oliveira, R. W. S., Mouchrek Filho, V. E., do Nascimento, A. A., Everton, A. P., Louzeiro, H. C., Reis, J. B., *et al.* (2018). Activity larvicide of the essential oil Syzygium aromaticum (carnival-of-india) in front of the mosquito Aedes aegypti (LINNAEUS, 1762). *Periódico Tchê Química*, 15(29), 184–195. Retrieved from http://www.deboni.he.com.br/arquivos_jornal/2018/29/184_Periodico29.pdf
 28. Gomes, P. R. B., Sousa, D. A. de, Everton, G. O., Fontenele, M. A., Marques, J. N. L. e F., Freitas, A. C. de, Hualdo, V. K. L., *et al.* (2020). Chemical composition and larvicidal activity of Citrus limonia Osbeck bark essential oil. *Journal of Medicinal Plants Research*, 14(7), 354–358.
 29. Gomes, Paulo Roberto Barros, Marinho, S. C., Everton, G. O., Silva, E. F., Fontenele, M. A., Lyra, W. da S., de Freitas, A. C., *et al.* (2022). Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of Pimenta dioica leaves. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 21(2), 207–214. Retrieved from <https://www.blacpma.ms-editions.cl/index.php/blacpma/article/view/230/238>
 30. González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2010). Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 327–345. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708509004816>
 31. Guedes, I. A., de Magalhães, C. S., & Dardenne, L. E. (2014). Receptor–ligand molecular docking. *Biophysical Reviews*, 6(1), 75–87. Retrieved from <http://link.springer.com/10.1007/s12551-013-0130-2>
 32. Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(1), 17. Retrieved from <https://jcheminf.biomedcentral.com/articles/10.1186/1758-2946-4-17>
 33. Hopkins, A. L., Groom, C. R., & Alex, A. (2004). Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. *Drug Discovery Today*, 9(10), 430–431. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644604030697>
 34. Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845–858. Retrieved from <https://www.nature.com/articles/nprot.2015.053>
 35. Kim, S. J., Khan, M. I. H., Estep, A. S., Cantrell, C. L., & Le, H. V. (2025). Chemical structure-biological activity of 1,4-naphthoquinone analogs as potential Aedes aegypti larvicides. *Pest Management Science*, 81(6), 2881–2890. Retrieved from <https://scijournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.8656>
 36. Krishna, P. G. V., Chavali, N., & Uberbacher, E. (2013). Flexibility of active-site gorge aromatic residues and non-gorge aromatic residues in acetylcholinesterase. *Chemical Papers*, 67(7). Retrieved from <https://www.degruyter.com/document/doi/10.2478/s11696-013-0354-4/html>
 37. Langeveld, W. T., Veldhuizen, E. J. A., & Burt, S. A. (2014). Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 40(1), 76–94. Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1040841X.2013.763219>
 38. Larson, R. T., Wessely, V., Jiang, Z., & Lan, Q. (2014). Larvicidal activity of sterol carrier protein-2 inhibitor in four species of mosquitoes. *Journal of medical entomology*, 43(5), 439–444.
 39. Lima, A. S., Costa Junior, H. N. P., Costa-Junior, L. M., Monteiro, O. S., Maia, J. G. S., & da Rocha, C. Q. (2021). Anthelmintic effect of essential rhizome oil from Hedychium coronarium Koenig (Zingiberaceae) introduced in Northeastern Brazil. *Acta Tropica*, 218, 105912. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X21000917>
 40. Luro, F., Garcia Neves, C., Costantino,

- G., da Silva Gesteira, A., Paoli, M., Ollitrault, P., Tomi, F., *et al.* (2020). Effect of Environmental Conditions on the Yield of Peel and Composition of Essential Oils from Citrus Cultivated in Bahia (Brazil) and Corsica (France). *Agronomy*, 10(9), 1256. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2073-4395/10/9/1256>
41. Marin-Lopez, A., Wang, Y., Jiang, J., Ledizet, M., & Fikrig, E. (2021). AgBR1 and NeSt1 antisera protect mice from *Aedes aegypti*-borne Zika infection. *Vaccine*, 39(12), 1675–1679. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X21001262>
 42. Mehl, F., Marti, G., Boccard, J., Debrus, B., Merle, P., Delort, E., Baroux, L., *et al.* (2014). Differentiation of lemon essential oil based on volatile and non-volatile fractions with various analytical techniques: a metabolomic approach. *Food Chemistry*, 143, 325–335. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613010546>
 43. Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.21256>
 44. Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J., & Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, 101(1), 372–378. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852409009468>
 45. Oliveira, F. M., Wanderley-Teixeira, V., Cruz, G. S., Silva, C. T. S., Dutra, K. A., Costa, H. N., Braga, V. A. A., *et al.* (2021). Histological, histochemical and energy disorders caused by R-limonene on *Aedes aegypti* L. larvae (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica*, 221, 105987. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X21001662>
 46. Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: a review. *Biophysical Reviews*, 9(2), 91–102. Retrieved from <http://link.springer.com/10.1007/s12551-016-0247-1>
 47. Paw, M., Begum, T., Gogoi, R., Pandey, S. K., & Lal, M. (2020). Chemical Composition of Citrus limon L. Burmf Peel Essential Oil from North East India. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(2), 337–344. Retrieved from <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/0972060X.2020.1757514>
 48. Rod, R. L. (1997). Process for repelling and killing insects and compositions to effect the same comprising a monoterpene. United States. Retrieved from <https://patentimages.storage.googleapis.com/84/e6/5f/65765dbc491a4f/US5347263.pdf>
 49. Santos, S. R. L., Melo, M. A., Cardoso, A. V., Santos, R. L. C., de Sousa, D. P., & Cavalcanti, S. C. H. (2011). Structure–activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. *Chemosphere*, 84(1), 150–153. Retrieved from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653511001366>
 50. Santos, S. R. L., Silva, V. B., Melo, M. A., Barbosa, J. D. F., Santos, R. L. C., de Sousa, D. P., & Cavalcanti, S. C. H. (2010). Toxic effects on and structure-toxicity relationships of phenylpropanoids, terpenes, and related compounds in *Aedes aegypti* larvae. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(10), 1049–1054. Retrieved from <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2009.0158>
 51. Sarma, R., Adhikari, K., Mahanta, S., & Khanikor, B. (2019). Combinations of Plant Essential Oil Based Terpene Compounds as Larvicidal and Adulticidal Agent against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Scientific Reports*, 9(1), 9471. Retrieved from <https://www.nature.com/articles/s41598-019-45908-3>
 52. Senthil-Nathan, S. (2020). A review of resistance mechanisms of synthetic insecticides and botanicals, phytochemicals, and essential oils as alternative larvicidal agents against mosquitoes. *Frontiers in Physiology*, 10. Retrieved from

- <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2019.01591/full>
53. da Silva, J., da Silva Pinto, A., de Souza, S., Chaves, F., da Fonseca Meireles, S., Pereira, R., Roque, R., *et al.* (2025). Oviposition Deterrence and Larvicidal Activity of Propyl Ether Dillapiole and Piperidyl Dillapiole Against *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae). *Toxics*, 13(4), 283. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2305-6304/13/4/283>
 54. Simas, D. L. R., Amorim, S. H. B. M. de, Oliveira, J. M. de, Alviano, D. S., & Silva, A. J. R. da. (2015). Characterization of essential oils of citrus fruits. *Citrus Research Technology*, 36(1). Retrieved from <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/2236-3122.20150003>
 55. Sittichok, S., Passara, H., Sinthusiri, J., Mounghthipmalai, T., Puwanard, C., Murata, K., & Soonwera, M. (2024). Synergistic Larvicidal and Pupicidal Toxicity and the Morphological Impact of the Dengue Vector (*Aedes aegypti*) Induced by Geranial and trans-Cinnamaldehyde. *Insects*, 15(9), 714. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2075-4450/15/9/714>
 56. Sousa, D. A. de, Gomes, P. R. B., Souza, R. D., Filho, V. E. M., Mouchrek, C. N., Everton, G. O., Almeida, N. R. de, *et al.* (2023). Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle bark against *Aedes aegypti* larvae. *Revista Virtual de Química*, 15(4), 722–727. Retrieved from https://rvq.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=1587&nomeArquivo=v15n4a10.pdf
 57. Steinberg, G. M., Mednick, M. L., Maddox, J., Rice, R., & Cramer, J. (1975). Hydrophobic binding site in acetylcholinesterase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 18(11), 1056–1061. Retrieved from <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm00245a002>
 58. Tapala, K. C., Ndlangamandla, N. G., Ngoepe, M. P., & Clayton, H. S. (2024). Molecular Structure, Spectroscopic, Frontier Molecular Orbital Analysis, Molecular Docking Studies, and In Vitro DNA-Binding Studies of Osmium(II)-Cymene Complexes with Aryl Phosphine and Aryl Phosphonium Assemblies. (J. Rafique, Ed.) *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2024, 1–15. Retrieved from <https://www.hindawi.com/journals/bca/2024/6697523/>
 59. Waliwitiya, R., Kennedy, C. J., & Lowenberger, C. A. (2009). Larvicidal and oviposition-altering activity of monoterpenoids, trans -anethole and rosemary oil to the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Pest Management Science*, 65(3), 241–248. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.1675>
 60. Wang, Y., Marin-Lopez, A., Jiang, J., Ledizet, M., & Fikrig, E. (2020). Vaccination with *Aedes aegypti* AgBR1 delays lethal mosquito-borne Zika Virus infection in Mice. *Vaccines*, 8(2), 145. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2076-393X/8/2/145>
 61. Wei, L., Chen, Y., Liu, J., Rao, L., Ren, Y., Xu, X., & Wan, J. (2022). Cov_DOX: A method for structure prediction of covalent protein–ligand bindings. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(7), 5528–5538. Retrieved from <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.1c02007>
 62. World Health Organization [WHO]. (2005). *Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides*. Retrieved from http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf?ua=1
 63. Yang, J., & Chen, C. (2004). GEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55(2), 288–304. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.20035>
 64. Yu, K.-X., Wong, C.-L., Ahmad, R., & Jantan, I. (2015). Larvicidal activity, inhibition effect on development, histopathological alteration and morphological aberration induced by seaweed extracts in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(12),

- 1006–1012. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1995764515001960>
65. Zara, A. L. de S. A., Santos, S. M. dos, Fernandes-Oliveira, E. S., Carvalho, R. G., & Coelho, G. E. (2016). Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma

revisão. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 25(2), 1–2. Retrieved from http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000200391&scielo=S2237-96222016000200391

Tabela 1. Identificação dos componentes presentes no óleo essencial de *Citrus limon*

Componentes	Tempo de retenção (min)	Retenção	Área normalizada (%)
Cis-acetato-3-hexenila	3233	992	0,07
α-Tujeno	3416	902	0,23
α-Pineno	3508	948	1,24
Tujene	4027	897	1,11
β - Pineno	4080	943	7,48
β - Mirceno	4247	958	1,26
Octanal	4418	1005	0,21
Butirato de 2-metil mirtenila	4458	-	0,06
o-Cimeno	4726	1042	9,24
Limoneno	4791	1018	75,77
3-Careno	5232	948	0,17
Limoneno 1,2 - Epóxido	6350	1031	0,53
Terpineno-4-ol	7010	1137	0,39
α - Terpineol	7218	1143	1,11
(E)-β-farneseno	10343	1440	0,04
α-Bergamoteno	10512	1430	0,49

Tabela 2. Atividade larvicida do óleo essencial em um período de 24 horas. Os dados de mortalidade foram expressos como média ± desvio padrão.

Concentração (µg/mL)	Mortalidade (%)	CL ₅₀ (µg/mL) (IC 95%)	χ ²
50	72 ± 0,83	44,11 (3,438 - 50,217)	6,209
60	82 ± 0,83		
70	88 ± 1,09		
80	98 ± 0,44		
90	100 ± 0,00		
Controle	0,0 ± 0,00		

Tabela 3. Pontuações do Autodock Vina para o docking molecular de local específico

Composto	Afinidade de ligação / Eficiência de ligação (kcal/mol)	
	Acetilcolinesterase	Proteína transportadora de colesterol-2
Limoneno	-5,97 / -0,60	-6,53 / -0,65
β -pineno	-6,09 / -0,62	-6,39 / -0,64
o-cimeno	-6,14 / -0,61	-6,56 / -0,66
Temefós	-7,78 / -0,29	-7,45 / -0,28

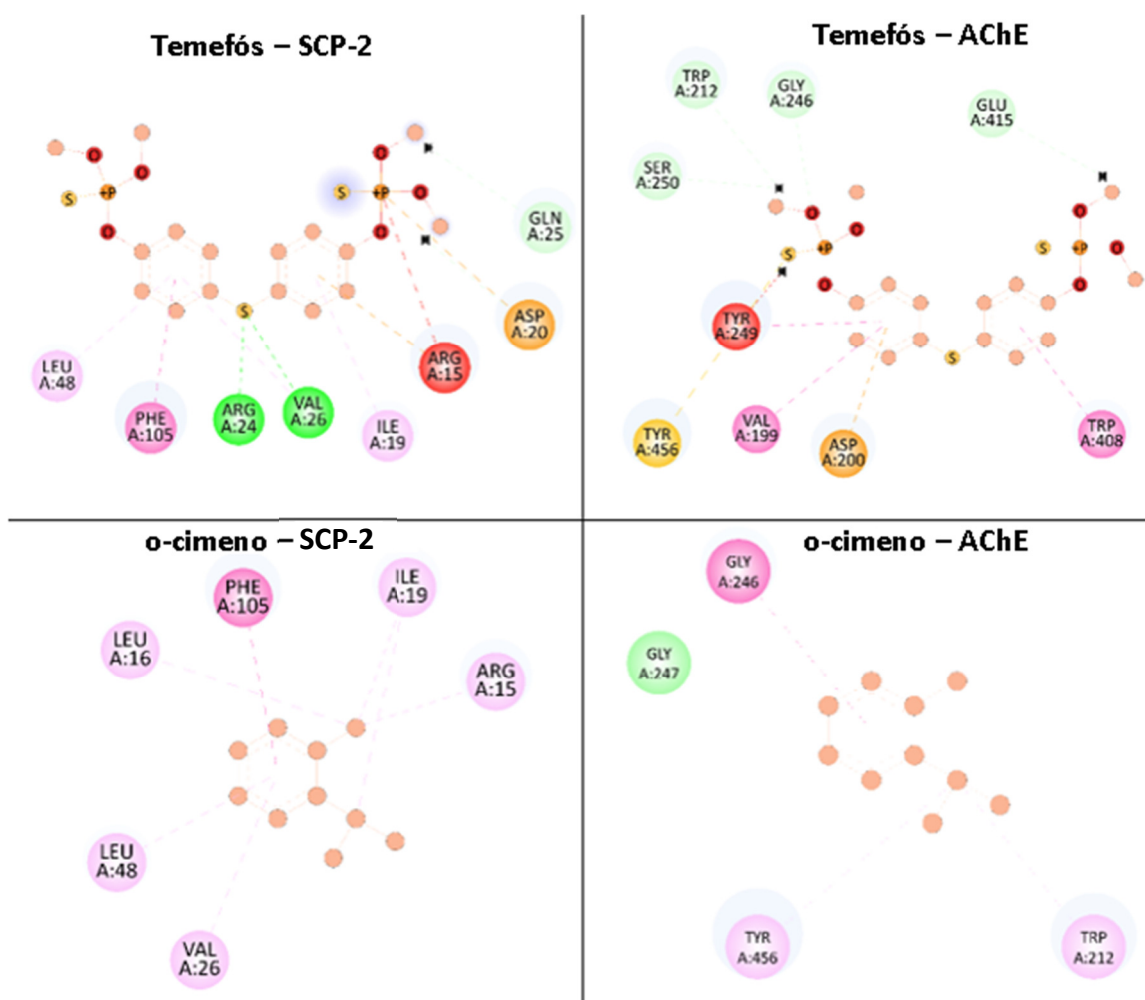


Figura 3. Diagrama de interação 2D ilustrando a orientação dos ligantes Temefós e o-cimeno dentro da estrutura do SCP2 e AChE.