

# Composição Química e Atividade Larvicida de Óleos Essenciais de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle bark Contra Larvas de *Aedes aegypti*

## Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oil from *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle bark Against *Aedes aegypti* Larvae

Dionney Andrade de Sousa,<sup>a</sup> Paulo Roberto Barros Gomes,<sup>b</sup> Rômicy Dermondes Souza,<sup>c,\*</sup> Victor Elias Mouchrek Filho,<sup>a</sup> Charbel Nagib Mouchrek,<sup>a</sup> Gustavo Oliveira Everton,<sup>a</sup> Núbia Régia de Almeida,<sup>b</sup> Jaqueline Pereira de Araújo<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão, CEP 66017-060, Paragominas-PA, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Tecnologia Química, CEP 65080-805, São Luís-MA, Brasil.

<sup>c</sup> Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, CEP 45700-000, Itapetinga-BA, Brasil.

\*E-mail: [dermondesromicy@gmail.com](mailto:dermondesromicy@gmail.com)

Recebido em: 17 de Maio de 2022

Aceito em: 20 de Dezembro de 2022

Publicado online: 8 de Fevereiro de 2023

*Aedes aegypti* is the main vector of diseases such as dengue, zika and chikungunya. The main way to combat it is the use of chemical insecticides, which in the literature have shown some disadvantages, such as: resistance of the mosquito vector and attack on non-target organisms. One of the alternatives with the idea of complementing the use of chemical insecticides or even replacing it is in the investigation of essential oils extracted from plants. In this study, we investigated the main constituent, the predominant class and the biological activity of the essential oil extracted from the bark of *Citrus aurantifolia* against third-stage larvae of *Aedes aegypti*. For this, we extracted the oil by hydrodistillation, identified its components by gas chromatography coupled with mass spectrometry and calculated the lethal concentration of larvicidal activity by the Probit method. The results showed the predominance of monoterpenes in the extracted oil, the main compounds being limonene. The oil showed larvicidal activity with a lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of 18.68 µg/mL. Thus, we conclude that the oil is active and has the potential to replace or complement chemical larvicides.

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

## 1. Introdução

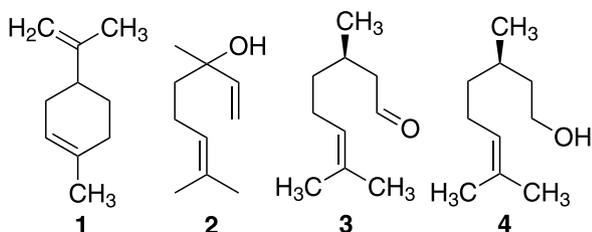
*Aedes aegypti* é o vetor responsável pela disseminação de doenças como dengue, chikungunya e zika.<sup>1</sup> No Brasil, em 2020, foram notificados 979.768 casos de dengue, 80.914 casos de chikungunya e 7.119 casos de zika.<sup>2</sup> Diante de sua ameaça à saúde pública, alguns métodos são adotados para combatê-lo, e esses métodos são categorizados como ambientais, mecânicos, biológicos, genéticos e químicos.<sup>3</sup> Dentre estes, o método químico é o mais utilizado, especificamente o uso de inseticidas.<sup>4</sup>

O uso de inseticidas químicos é importante para o controle do *A. aegypti*, entretanto, alguns problemas em seu uso são relatados, como o desenvolvimento de resistência por *A. aegypti*.<sup>5</sup> Variantes com resistência a inseticidas à base de organofosforados e piretroides, os inseticidas mais utilizadas no Brasil, já foram registradas em grande parte do território brasileiro.<sup>6,7</sup> O uso desses inseticidas também está associado a sérios problemas ambientais, como a contaminação de corpos d'água, solos e organismos com os quais entra em contato.<sup>8,9</sup> Além disso, também é relatada atividade biológica contra organismos não visados.<sup>10</sup>

Esses problemas motivaram a busca de métodos mais seguros para combater o *A. aegypti*, como o uso de óleos essenciais (OE). As vantagens do uso de OE são sua baixa toxicidade contra organismos não visados<sup>11</sup> e sua alta atividade biológica contra larvas de *A. aegypti*, como exemplo, há os OE's *Eucalyptus globulus*, *Illicium verum* e *Trachyspermum ammi*.<sup>12,13</sup> Dentre os componentes de OE com maior atividade biológica contra *A. aegypti* encontra-se o limoneno,<sup>14</sup> composto principal em espécies cítricas como *Citrus aurantifolia*.<sup>15</sup>

*C. aurantifolia* é originária de regiões tropicais e subtropicais asiáticas, sendo hoje encontrada em várias partes do mundo. Seu OE tem como principais componentes o limoneno, linalol, citronelal e citronelol<sup>15</sup> (Figura 1) e tem algumas atividades biológicas importantes, tais como: antibacteriano,<sup>16</sup> antifúngico,<sup>17</sup> inseticida<sup>18</sup> e atividade larvicida.<sup>19</sup>

A atividade larvicida do óleo essencial extraído das folhas e casca de *C. aurantifolia* contra *A. aegypti* foi explorada por Sarma *et al.*,<sup>19</sup> cujos resultados indicam alta letalidade contra *A. aegypti* na 4ª fase larval. Estes resultados, embora promissores, limitam-se apenas à quarta



**Figura 1.** Estrutura química do limoneno (1), linalol (2), citronelal (3) e citronelol (4) (adaptado da referência 20)

fase larval. Considerando que diferentes estágios larvais podem apresentar diferentes resistências aos tratamentos,<sup>21</sup> é necessário o estudo de sua atividade biológica em outros estágios.

Até onde se sabe, a atividade larvicida de *C. aurantifolia* contra *A. aegypti* na 3ª etapa ainda não foi explorada. Portanto, neste estudo é descrito a composição química e avaliação da atividade larvicida do óleo essencial extraído das cascas do limão galego (*C. aurantifolia*) na 3ª fase larval de *A. aegypti*.

## 2. Experimental

### 2.1. Material vegetal

Folhas e frutos foram coletados em janeiro de 2018 em uma área rural de São Brás dos Macacos, no município de São José de Ribamar, Maranhão, Brasil (coordenadas GPS: S 2°35'51.8", W 44°9'33.3") e certificado pelo Herbário da Universidade Federal do Maranhão, número 11.168.

### 2.2. Extração do óleo essencial

O OE foi extraído por hidrodestilação. Para a extração, pesou-se a massa de 400 g das cascas das frutas que foram maceradas em um moinho elétrico do modelo Tecnal Te-340 (Piracicaba, Brasil) e misturou-se em quatro litros de água destilada na proporção de 1:10 em um sistema Clevenger-type sob aquecimento a 100 °C por 4 horas. Após esse tempo, o OE extraído foi coletado e seco por percolação em solução de sulfato de sódio anidro (Synth, Diadema, Brasil). O volume final foi utilizado para determinar o rendimento da razão massa/volume. A densidade foi medida em picnômetro de 5 mL à temperatura de 25 °C e com balança de precisão. Os OE's foram coletados em triplicata e armazenados em ampolas de vidro âmbar sob refrigeração a 4 °C para evitar possíveis perdas de componentes voláteis.

### 2.3. Análise cromatográfica (GC/MS)

A análise cromatográfica foi baseada no trabalho de Barros e colaboradores.<sup>22</sup> Os componentes do óleo essencial foram identificados em um equipamento de cromatografia gasosa (Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas (QP 2020A),

utilizando hélio como gás transportador, com fluxo na coluna de 2,5 mL/min; temperatura do injetor: 280 °C, 1:50 split; coluna capilar Carbowax e 5% de metilfenil-silicone (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) e programação de temperatura do forno de 60 °C a 280 °C. No espectrômetro de massas, a temperatura foi de 280 °C e os espectros registraram alíquotas de 35 a 550 *m/z*, 1 µL em acetato de etila. Os componentes do óleo foram identificados comparando seus índices de retenção com dados obtidos de substâncias autênticas existentes nas bibliotecas de referência NIST14.

### 2.4. Captura e criação do *Aedes aegypti*

A captura de larvas ocorreu por meio de ovitrampa entre janeiro e fevereiro de 2019, segundo a metodologia proposta por Braga e colaboradores.<sup>23</sup> Os ovitrapas são preparados adicionando água e dois canudos de eucatex a baldes de polietileno com uma capacidade de 500 mL, onde as fêmeas do mosquito depositam os ovos nas bordas do recipiente. Após a eclosão, as larvas do 3º estágio foram mantidas em temperatura ambiente de 25 ± 2 °C e umidade relativa de 70 a 80% e alimentadas com ração canina.

### 2.5. Bioensaio larvicida

Os testes foram realizados de acordo com o procedimento padrão da Organização Mundial da Saúde.<sup>24</sup> Inicialmente, foram utilizadas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL do OE extraído contra 10 larvas de 3º estágio em um período de exposição de 24 horas para verificar a existência ou não de atividade. Após essa etapa, cinco concentrações variando de 5 a 65 µg/mL foram preparadas usando uma quantidade igual de DMSO a 2% (Dimetilsulfóxido, Dinâmica, Diadema, Brasil) como agente emulsificante de acordo com os resultados do teste inicial. Todos os testes foram realizados em cinco replicatas, e para cada réplica, 10 larvas foram colocadas em 30 mL de solução e observadas por um período de 24 horas. Após esse tempo, foram consideradas mortas as larvas que não apresentavam movimento ou não respondiam a estímulos quando tocadas pela pipeta Pasteur. Como controle negativo, foi utilizado DMSO a 2%.<sup>19</sup>

Para avaliar a atividade do OE foram utilizados dois critérios: um de atividade e outro atividade e força. O primeiro é estabelecido por Cheng *et al.*,<sup>25</sup> em que classificam a atividade do OE como: altamente ativo ( $CL_{50} < 50$  µg/mL), ativo ( $CL_{50} < 100$  µg/mL) e inativo ( $CL_{50} > 100$  µg/mL). O segundo é estabelecido por Dias e Moraes,<sup>26</sup> que classifica o OE como ativo e forte quando tem uma  $CL_{50} < 50$  µg/mL.

### 2.6. Análise estatística

Os dados de mortalidade foram representados por média ± desvio padrão. O teste estatístico utilizado foi a análise de

variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste post hoc de Duncan para identificar diferenças significativas e o teste t pareado. A concentração letal 50% (CL<sub>50</sub>) foi calculada pelo método Probit. Em todos os casos foi utilizado um nível de significância de  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1. Composição química do óleo essencial

O rendimento e a densidade do óleo essencial obtido da casca de *C. aurantifolia* foram, respectivamente, 2,29% (1,8 mL de óleo extraído) e 0,846 g/mL. Para a determinação da composição química do OE extraído da casca de *C. aurantifolia*, foi realizada a análise cromatográfica em fase gasosa acoplada a um espectrômetro de massas e identificados os compostos com base em índices de retenção e porcentagem de área normalizada. A partir desta análise, identificou-se a presença de 13 compostos (Tabela 1) em que predominaram o limoneno (81,69%), linalol (6,31%), *p*-cimeno (4,66%),  $\gamma$ -terpineno (3,33%) e a classe de hidrocarbonetos monoterpênicos (92,47%).

#### 3.2. Atividade larvicida

Para avaliar se o OE extraído tem atividade larvicida, submeteu-se 10 larvas a concentrações de 5 a 65  $\mu\text{g/mL}$ , calculou-se a concentração letal (CL<sub>50</sub>) pelo método de Probit e os dados de mortalidade foram representados pelo desvio-padrão médio, seguido do teste estatístico ANOVA one-way e teste posterior para as diferenças entre as médias. A partir desta análise, verificou-se que o óleo era extremamente ativo e forte, com uma concentração letal (CL<sub>50</sub>) de 18,68  $\mu\text{g/mL}$  em um período de exposição de 24 h, conforme classificado por Cheng e colaboradores<sup>25</sup> e Dias e Moraes.<sup>26</sup> Observou-se aumento da mortalidade com aumento da concentração ( $p < 0,001$ ), além da ausência de diferenças entre as médias das concentrações de 35 e 50  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 2).

### 4. Discussão

O uso de larvicidas sintéticos é uma das formas mais utilizadas para combater doenças transmitidas pelo mosquito *A. aegypti*. No entanto, estudos têm mostrado

**Tabela 1.** Composição do óleo essencial de *C. aurantifolia*

Compostos	Tempo de retenção (min)	Índice de retenção <sup>a</sup>	Índice de retenção <sup>b</sup>	Área normalizada (%)	Classe
$\alpha$ -Tujeno	3,421	902	924	0,13	HM <sup>c</sup>
$\alpha$ -Pinoeno	3,510	948	932	0,54	HM
$\beta$ -Tujeno	4,033	873	953	0,07	HM
$\beta$ -Pinoeno	4,084	943	974	0,45	HM
Mirceno	4,248	958	988	1,38	HM
<i>p</i> -Cimeno	4,728	1042	1020	4,66	HM
Limoneno	4,793	1018	1024	81,69	HM
$\gamma$ -Terpineno	5,227	998	1054	3,33	HM
(+)-4-Careno	5,677	919	—	0,22	HM
Linalol	5,822	1082	1095	6,31	MO <sup>d</sup>
Terpinen-4-ol	7,018	1137	1174	0,39	MO
$\alpha$ -Terpineol	7,224	1143	1186	0,77	MO
$\alpha$ -Farneseno	10,345	1458	1505	0,07	HS <sup>e</sup>

<sup>a</sup>Índice de retenção da biblioteca NIST14, <sup>b</sup>Índice de retenção de acordo com Adams<sup>27</sup>; <sup>c</sup>HM: Hidrocarboneto monoterpêneo; <sup>d</sup>MO: Monoterpeno oxigenado; <sup>e</sup>HS: Hidrocarboneto sesquiterpeno

**Tabela 2.** Concentração letal 50% (CL<sub>50</sub>) para *A. aegypti* contra a ação do óleo essencial de *C. aurantifolia*

Concentração de óleo essencial ( $\mu\text{g/mL}$ )	Mortalidade (%) <sup>*</sup>	ANOVA	CL <sub>50</sub> $\pm$ CL <sup>**</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	Teste t
5	24 $\pm$ 5,55 <sup>a</sup>			
20	40 $\pm$ 10,00 <sup>b</sup>			
35	66 $\pm$ 5,47 <sup>c</sup>	$p < 0,001$	18,68 (10,30 – 33,87)	$p < 0,001$
50	78 $\pm$ 16,43 <sup>c</sup>			
65	100 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>			

<sup>\*</sup>O teste de comparação média foi ANOVA com Duncan como *post hoc*. <sup>\*\*</sup>CL: Limite de confiança a 95% de probabilidade

a resistência dos mosquitos e ataques a organismos não visados ao usar este tipo de larvicida.<sup>28</sup> Uma alternativa amplamente utilizada para contornar esse problema é o estudo de extratos e OE's extraídos de plantas, devido à sua baixa toxicidade. Assim, neste estudo foi investigada a composição química e a atividade larvicida do OE extraído da casca de *C. aurantifolia*. Os resultados mostram que o OE é majoritariamente rico em monoterpenos, predominantemente limoneno, e tem forte atividade biológica contra larvas do terceiro estágio de *A. aegypti*.

O primeiro achado deste trabalho sobre a composição química do óleo é confirmado através dos índices de retenção e área normalizada dos compostos identificados na análise por GC/MS. A presença de monoterpenos, em sua maioria representados pelo limoneno, está de acordo com estudos anteriores<sup>29,30</sup> em que declaram sua presença em frações voláteis de óleo cítrico em torno de 30 a 97%. As quantidades de limoneno em alguns cítricos nem sempre estão nessas porcentagens como o composto principal, como às vezes não é mesmo o composto principal. Estudos anteriores mostraram quantidades de limoneno na casca de *C. aurantifolia* abaixo de 30% e, às vezes, o composto predominante foi o Palatinol-1C<sup>19</sup> e isômeros de germacreno.<sup>31</sup> Novamente, as diferenças na composição química desses OE extraído, tanto no presente estudo como de outros, foram influenciadas pelo tempo de extração, temperatura, intensidade da radiação solar, idade e desenvolvimento de plantas,<sup>32</sup> sazonalidade<sup>33</sup> entre outros.

No segundo achado, confirma-se a forte atividade larvicida do OE extraído a partir do valor de CL<sub>50</sub>, seguindo os critérios estabelecidos por Cheng *et al.*<sup>25</sup> e Dias e Moraes.<sup>26</sup> O resultado do presente estudo está de acordo com estudos anteriores em que eles relataram a atividade larvicida de outras espécies de cítricos com valores de CL<sub>50</sub> variando de 15,48 µg/mL a 67,18 µg/mL,<sup>22,34,35</sup> mas contradiz o estudo anterior<sup>19</sup> que relatou a atividade larvicida do OE extraído de casca de *C. aurantifolia* com CL<sub>50</sub> de 128,82 µg/mL para um tempo de exposição de 24 h. A diferença encontrada nos valores de CL<sub>50</sub> e conseqüentemente nas bioatividades está no relato de estudos anteriores<sup>36,37</sup> que afirmam a forte atividade na temporada de verão. O resultado obtido neste estudo aconteceu na estação verão no hemisfério sul, concordando assim com estudos anteriores.<sup>36,37</sup>

Outra diferença apontada está relacionada com o estágio larval. O estudo realizado por Sarma e colaboradores<sup>19</sup> usou larvas no 4º estágio, enquanto que no presente estudo foi utilizado larvas no 3º estágio. Um estudo anterior<sup>21</sup> relatou que larvas em estágio mais jovem eram mais suscetíveis aos produtos do que larvas de estágio mais velho e a diferença entre os achados do presente estudo e a literatura reforça esta hipótese.

Outro ponto relevante é a relação do composto principal com a atividade larvicida. A identificação do limoneno no presente estudo está de acordo com a literatura disponível,<sup>38-41</sup> que atribui a atividade biológica ao composto principal. A forte atividade larvicida do limoneno está relacionada às

ligações endo e exo do ciclo, e uma reorganização em uma dessas ligações resulta no composto  $\gamma$ -terpineno, cuja atividade larvicida já foi comprovada.<sup>42</sup> Ressalta-se que  $\gamma$ -terpineno também foi identificado neste estudo e como o mesmo possui atividade larvicida, acredita-se que a sua ação em conjunto com o limoneno possa ter potencializado a atividade larvicida do óleo essencial.

## 5. Conclusão

A análise do óleo essencial das cascas de *C. aurantifolia* permitiu identificar os compostos presentes e avaliar a atividade larvicida do OE contra larvas no 3º estágio de desenvolvimento. A concentração letal mínima de 50% foi de 18,68 µg/mL. Os principais constituintes identificados pertencem à classe dos monoterpenos, com predominância do limoneno, linalol, *p*-cimeno e  $\gamma$ -terpineno. A atividade larvicida nos mostrou como este óleo é extremamente ativo e forte contra larvas no 3º estágio de *A. aegypti*.

## Agradecimentos

Os autores agradecem o financiamento fornecido pelo Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## Referências Bibliográficas

1. Yakob, L.; Funk, S.; Camacho, A.; Brady, O.; Edmunds, W. J.; *Aedes aegypti* Control Through Modernized, Integrated Vector Management. *PLoS Currents* **2017**, *9*. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
2. Brasil, S. de V. em S. – M. da S. do B.; Boletim epidemiológico. Monitoramento dos casos de Arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), semanas epidemiológicas 1 a 50, 2020. *Boletim Epidemiológico Arboviroses* **2020**, *51*, 1. [[Link](#)]
3. Baldacchino, F.; Caputo, B.; Chandre, F.; Drago, A.; della Torre, A.; Montarsi, F.; Rizzoli, A.; Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: A review. *Pest Management Science* **2015**, *71*, 1471. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
4. Florentino, H. O.; Cantane, D. R.; Santos, F. L. P.; Reis, C. A.; Pato, M. V.; Jones, D.; Cerasuolo, M.; Oliveira, R. A.; Lyra, L. G.; Genetic algorithm for optimization of the *Aedes aegypti* control strategies. *Pesquisa Operacional* **2018**, *38*, 389. [[Crossref](#)]
5. Vontas, J.; Kioulos, E.; Pavlidi, N.; Morou, E.; della Torre, A.; Ranson, H.; Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **2012**, *104*, 126. [[Crossref](#)]
6. Lima, E. P.; Paiva, M. H. S.; De Araújo, A. P.; Da Silva, É. V. G.; Da Silva, U. M.; De Oliveira, L. N.; Santana, A. E. G.; Barbosa, C. N.; De Paiva Neto, C. C.; Goulart, M. O.; Wilding, C. S.; Ayres, C. F. J.; De Melo Santos, M. A. V.; Insecticide resistance

- in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites and Vectors* **2011**, *4*, 1. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
7. Campos, J.; Andrade, C. F.; Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Revista de Saúde Pública* **2001**, *35*, 232. [[Crossref](#)]
  8. Feo, M. L.; Eljarrat, E.; Barceló, D.; Determination of pyrethroid insecticides in environmental samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2010**, *29*, 692. [[Crossref](#)]
  9. Mulla, S. I.; Ameen, F.; Talwar, M. P.; Eqani, S. A. M. A. S.; Bharagava, R. N.; Saxena, G.; Tallur, P. N.; Ninnekar, H. Z.; *Em Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety*, 1a. ed., Springer: Singapore, 2020.
  10. Santos, V. S. V.; Caixeta, E. S.; Campos Júnior, E. O. de; Pereira, B. B.; Ecotoxicological effects of larvicide used in the control of *Aedes aegypti* on nontarget organisms: Redefining the use of pyriproxyfen. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* **2017**, *80*, 155. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
  11. Pavela, R.; Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products* **2015**, *76*, 174. [[Crossref](#)]
  12. Pandiyan, G. N.; Mathew, N.; Munusamy, S.; Larvicidal activity of selected essential oil in synergized combinations against *Aedes aegypti*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2019**, *174*, 549. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
  13. Vivekanandhan, P.; Usha-Raja-Nanthini, A.; Valli, G.; Subramanian Shivakumar, M.; Comparative efficacy of *Eucalyptus globulus* (Labill) hydrodistilled essential oil and temephos as mosquito larvicide. *Natural Product Research* **2020**, *34*, 2626. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
  14. Oliveira, F. M.; Wanderley-Teixeira, V.; Cruz, G. S.; Silva, C. T. S.; Dutra, K. A.; Costa, H. N.; Braga, V. A. A.; Silva, E. J.; Guedes, C. A.; Alves, T. J. S.; Teixeira, Á. A. C.; Histological, histochemical and energy disorders caused by R-limonene on *Aedes aegypti* L. larvae (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica* **2021**, *221*. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
  15. Lemes, R. S.; Alves, C. C. F.; Estevam, E. B. B.; Santiago, M. B.; Martins, C. H. G.; Dos Santos, T. C. L.; Crotti, A. E. M.; Miranda, M. L. D.; Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Citrus aurantifolia* leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **2018**, *90*, 1285. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
  16. Julaha, E.; Puspita, S.; Eddy, D. R.; Wahyudi, T.; Nurzaman, M.; Nugraha, J.; Herlina, T.; Al Anshori, J.; Microencapsulation of lime (*Citrus aurantifolia*) oil for antibacterial finishing of cotton fabric. *RSC Advances* **2021**, *11*, 1743. [[Crossref](#)]
  17. Hung, P. Van; Chi, P. T. L.; Phi, N. T. L.; Comparison of antifungal activities of Vietnamese citrus essential oils. *Natural Product Research* **2013**, *27*, 506. [[Crossref](#)]
  18. Soonwera, M.; Efficacy of Essential Oils from Citrus plants against Mosquito vectors *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Journal of Agricultural Technology* **2015**, *11*, 669. [[Link](#)]
  19. Sarma, R.; Adhikari, K.; Mahanta, S.; Khanikor, B.; Insecticidal activities of *Citrus aurantifolia* essential oil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Toxicology Reports* **2019**, *6*, 1091. [[Crossref](#)]
  20. Castro, H. G.; Moura Perini, V. B.; Santos, G. R.; Leal, T. C. A. B.; Evaluation of content and composition of the essential oil of *Cymbopogon nardus* (L.) in different harvest times. *Revista Ciência Agronômica* **2010**, *41*, 308. [[Crossref](#)]
  21. Cetin, H.; Erler, F.; Yanikoglu, A.; Larvicidal activity of a botanical natural product, AkseBio2, against *Culex pipiens*. *Fitoterapia* **2004**, *75*, 724. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
  22. Gomes, P. R. B.; Sousa, D. A.; Everton, G. O.; Fontenele, M. A.; Marques, J. N. L.; Freitas, A. C.; Hunaldo, V. K. L.; Louzeiro, H. C.; Paula, M. L.; Reis, J. B.; Melo, A. V.; Lima, H. S.; Filho, V. E. M.; Chemical composition and larvicidal activity of Citrus limonia Osbeck bark essential oil. *Journal of Medicinal Plants Research* **2020**, *14*, 354. [[Crossref](#)]
  23. Braga, I. A.; Gomes, A. de C.; Nelson, M.; Mello, R. de C. G.; Bergamaschi, D. P.; Souza, J. M. P. de; Comparação entre pesquisa larvária e armadilha de oviposição, para detecção de *Aedes aegypti*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2000**, *33*, 347. [[Crossref](#)]
  24. World Health Organization; *Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides* 2005. [[Link](#)]
  25. Cheng, S. S.; Chang, H. T.; Chang, S. T.; Tsai, K. H.; Chen, W. J.; Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technology* **2003**, *89*, 99. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
  26. Dias, C. N.; Moraes, D. F. C.; Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: Review. *Parasitology Research* **2014**, *113*, 565. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
  27. Adams, R. P.; *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*, 4th ed., Illinois Allured Publishing Corporation: Carol Stream, 2017.
  28. Voris, D. G. R.; Dias, L. S.; Lima, J. A.; Lima, K. S. C.; Lima, J. B. P.; Lima, A. L. S.; Evaluation of larvicidal, adulticidal, and anticholinesterase activities of essential oils of *Illicium verum* Hook. f., *Pimenta dioica* (L.) Merr., and *Myristica fragrans* Houtt. against Zika virus vectors. *Environmental Science and Pollution Research* **2018**, *25*, 22541. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
  29. Mehl, F.; Marti, G.; Boccard, J.; Debrus, B.; Merle, P.; Delort, E.; Baroux, L.; Raymo, V.; Velazco, M. I.; Sommer, H.; Wolfender, J. L.; Rudaz, S.; Differentiation of lemon essential oil based on volatile and non-volatile fractions with various analytical techniques: A metabolomic approach. *Food Chemistry* **2014**, *143*, 325. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
  30. Simas, D. L. R.; Amorim, S. H. B. M. de; Oliveira, J. M. de; Alviano, D. S.; Silva, A. J. R. da; Characterization of essential oils of citrus fruits. *Citrus Research Technology* **2017**, *36*, 15. [[Crossref](#)]
  31. Adokoh, C. K.; Asante, D. B.; Acheampong, D. O.; Kotsuchibashi, Y.; Armah, F. A.; Sirikiyi, I. H.; Kimura, K.; Gmakame, E.; Abdul-Rauf, S.; Chemical profile and in vivo toxicity evaluation of unripe *Citrus aurantifolia* essential oil. *Toxicology Reports* **2019**, *6*, 692. [[Crossref](#)]
  32. Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P.; Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* **2007**, *30*, 374. [[Crossref](#)]
  33. Silva, P. T.; Santos, H. S.; Teixeira, A. M. R.; Bandeira, P. N.; Holanda, C. L.; Vale, J. P. C.; Pereira, E. J. P.; Menezes, J. E.

- S. A.; Rodrigues, T. H. S.; Souza, E. B.; Silva, H. C.; Santiago, G. M. P.; Seasonal variation in the chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oils from *Vitex gardneriana* Schauer. *South African Journal of Botany* **2019**, *124*, 329. [[Crossref](#)]
34. Gomes, P. R. B.; Oliveira, M. B.; De Sousa, D. A.; Da Silva, J. C.; Fernandes, R. P.; Louzeiro, H. C.; De Oliveira, R. W. S.; De Paula, M. D. L.; Mouchrek Filho, V. E.; Fontenele, M. A.; Larvicidal activity, molluscicide and toxicity of the essential oil of *Citrus limon* peels against, respectively, *Aedes aegypti*, *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. *Eclética Química Journal* **2019**, *44*, 85. [[Crossref](#)]
35. Giatropoulos, A.; Papachristos, D. P.; Kimbaris, A.; Koliopoulos, G.; Polissiou, M. G.; Emmanouel, N.; Michaelakis, A.; Evaluation of bioefficacy of three *Citrus* essential oils against the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in correlation to their components enantiomeric distribution. *Parasitology Research* **2012**, *111*, 2253. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
36. Fernandez, C. M. M.; Barba, E. L.; Fernandez, A. C. M.; Cardoso, B. K.; Borges, I. B.; Takemura, O. S.; Martins, L. de A.; Cortez, L. E. R.; Cortez, D. A. G.; Gazim, Z. C.; 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* **2014**, *17*, 813. [[Crossref](#)]
37. 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.; Simões, M. R.; Colauto, N. B.; Lobo, V. D. S.; Gazim, Z. C.; Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Laurus nobilis* leaves obtained at different seasons. *Journal of Essential Oil Research* **2018**, *30*, 379. [[Crossref](#)]
38. Lucia, A.; Audino, P. G.; Seccacini, E.; Licastro, S.; Zerba, E.; Masuh, H.; Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association* **2007**, *23*, 299. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
39. Gbolade, A. A.; Lockwood, G. B.; Toxicity of *Ocimum sanctum* L. Essential oil to *Aedes aegypti* Larvae and its Chemical Composition. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* **2008**, *11*, 148. [[Crossref](#)]
40. Sarma, R.; Adhikari, K.; Mahanta, S.; Khanikor, B.; Combinations of Plant Essential Oil Based Terpene Compounds as Larvicidal and Adulticidal Agent against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Scientific Reports* **2019**, *9*, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
41. Vani, S. R.; Cheng, S. F.; Chuah, C. H.; Comparative study of volatile compounds from genus *Ocimum*. *American Journal of Applied Sciences* **2009**, *6*, 523. [[Crossref](#)]
42. Santos, S. R. L.; Melo, M. A.; Cardoso, A. V.; Santos, R. L. C.; Sousa, D. P. de; Cavalcanti, S. C. H.; Structure-activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. *Chemosphere* **2011**, *84*, 150. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]