



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GESTÃO AMBIENTAL
MESTRADO PROFISSIONAL EM GESTAO AMBIENTAL**

ANDRÉIA GREGÓRIO DA SILVA SANTOS

**CONTROLE DE VETORES EM SAÚDE AMBIENTAL: ATIVIDADE LARVICIDA
DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton rhamnifolioides* ENCAPSULADO EM
NANOSSISTEMA POLIMÉRICO FRENTE AO MOSQUITO *Aedes aegypti***

Recife, 2019

ANDRÉIA GREGÓRIO DA SILVA SANTOS

**CONTROLE DE VETORES EM SAÚDE AMBIENTAL: ATIVIDADE LARVICIDA
DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton rhamnifolioides* ENCAPSULADO EM
NANOSSISTEMA POLIMÉRICO FRENTE AO MOSQUITO *Aedes aegypti***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Gestão Ambiental, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Gestão Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco.

Prof^ª. Dra. Sofia Suely Ferreira Brandão Rodrigues
Orientadora

Prof^ª. Dra. Maria Núbia Medeiros de Araújo Frutuoso
Co-Orientadora

Recife, 2019

a

S237c Santos, Andréia Gregório da Silva.
Controle de vetores em saúde ambiental: atividade larvicida de óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* encapsulado em manossistema polimérico frente ao mosquito *Aedes aegypti*./ Andréia Gregório da Silva Santos. – Recife, PE: O autor, 2019.
57 f.: il., color. ; 30 cm.

Orientadora: Profª. Drª Sofia Suely Ferreira Brandão Rodrigues
Co-orientadora: Profª Drª Maria Núbia Medeiros de Araújo Frutuoso

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco - IFPE, Campus Recife, Coordenação de Pós-Graduação - Mestrado Profissional em Gestão Ambiental, 2019.

Inclui referências

1. *Aedes aegypti*. 2. Óleos essenciais. 3. Larvicida.. 4. *Croton rhamnifolioides*. 5. Nanopartículas I. Rodrigues, Sofia Suely Ferreira Brandão (Orientadora). II. Frutuoso, Maria Núbia Medeiros de Araújo. (Co-orientadora). III. Título.

614 CDD (22 Ed.)

ANDRÉIA GREGÓRIO DA SILVA SANTOS

**CONTROLE DE VETORES EM SAÚDE AMBIENTAL POR MEIO DE SISTEMAS
DE LIBERAÇÃO CONTROLADA COM ATIVIDADE LARVICIDA FRENTE AO
MOSQUITO *Aedes aegypti***

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Gestão Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco como parte integrante dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Gestão Ambiental.

Data da aprovação: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Sofia Suely Ferreira Brandão Rodrigues
Orientadora – IFPE

Prof^ª. Dra. Maria Núbia Medeiros de Araújo Frutuoso
Co-Orientadora

Prof^ª. Dra. Marília Regina Costa Castro Lyra
Examinadora Interna - MPGA

Prof^ª. Dra. Sarah Brandão Palácio
Examinadora Externa – LIKA - UFPE

Prof^ª. Dra. Cláudia de Albuquerque Maranhão
Examinadora Externa - IFPE

APRESENTAÇÃO

A autora é formada em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE e Tecnologia em Gestão Ambiental pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco - IFPE. Iniciou sua pesquisa com fitoterápicos, no Departamento de Microbiologia da UFRPE sob orientação da Prof^a. Dra. Rosa Maria Nunes Galdino. Posteriormente, ingressou na área educacional lecionando no Ensino Fundamental II em escolas públicas e privadas. Ao ingressar no IFPE, participou da seleção para o projeto de pesquisa e extensão, coordenado pela Prof^a. Dra. Maria Núbia Medeiros de Araújo Frutuoso, “Ação interdisciplinar para a sustentabilidade socioambiental de mercados públicos da região metropolitana do Recife”, no ano de 2012, sendo aprovada. Seu primeiro plano de trabalho, como bolsista do Programa PIBIC/CNPq, dentro desse projeto, intitulou-se “Estudo químico de plantas comercializadas em mercados públicos na região metropolitana do Recife”, tendo como objetivo geral desenvolver um estudo de modelo de implementação e gestão dos mercados públicos da região metropolitana do Recife, observando aspectos relacionados ao manejo e uso de plantas medicinais para elaboração de uma proposta de gestão ambiental. Em 2013, novamente como bolsista do Programa PIBIC/CNPq, trabalhou com o plano de trabalho intitulado “Atividade biológica do óleo essencial de plantas medicinais comercializadas em mercados públicos da região metropolitana do Recife”, tendo como um dos objetivos observar os aspectos relacionados à saúde e segurança alimentar do manejo e uso de plantas medicinais, realizar levantamento das plantas produtoras de óleo essencial comercializadas em mercados públicos, avaliando as atividades biológicas, objetivando uma proposta de gerenciamento ambiental. No ano de 2014, em seu terceiro ano de iniciação científica (bolsa PIBIC/CNPq) trabalhou o plano “Avaliação do teor e da composição química do óleo essencial de plantas medicinais comercializadas em mercados públicos da região metropolitana do Recife – PE”, onde estudou a influência do método de conservação das plantas medicinais comercializadas por feirantes de mercados públicos no teor e rendimento de seus óleos essenciais. Todos os trabalhos foram orientados pela Prof^a. Dra. Sofia Suely Ferreira Brandão Rodrigues do Instituto Federal de Pernambuco. A culminância da graduação em Gestão Ambiental se deu com a defesa da monografia “Avaliação do uso e conservação de plantas medicinais comercializadas no mercado público de Casa Amarela, Recife – PE: problemáticas e proposições”, orientada pela Prof^a. Dra. Maria Núbia Medeiros de Araújo Frutuoso, com co-orientação da Prof^a. Dra. Sofia Suely Ferreira Brandão Rodrigues. Fruto desse trabalho foi escrito e aprovado artigo na revista *Holos*. Após o término da segunda graduação prosseguiu com o mestrado na mesma área, no qual trabalhou com o controle de vetores por meio de sistemas de liberação controlada com atividade larvicida frente ao mosquito *Aedes aegypti*.

Dedico esta dissertação ao criador de todas as coisas: DEUS. Aos meus pais, irmãos, amigos, esposo e principalmente a minha orientadora Prof^a. Dra. Sofia Brandão pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza. Sem os apoios constantes nenhuma conquista seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, senhor de todos os tempos.

Ao IFPE pela oportunidade de realizar o Curso de Graduação e Pós Graduação e pelas bolsas de pesquisa ofertadas.

Ao CNPq pelas bolsas de Iniciação Científica, importante base para o mestrado;

À orientadora Prof^a. Dra. Sofia Suely Ferreira Brandão Rodrigues e a Co-orientadora Dra. Maria Núbia Medeiros de Araújo Frutuoso, por me acolherem desde o início de minhas pesquisas na época da graduação, bem como no decorrer do mestrado, pelas orientações e diálogos sempre proveitosos e incentivadores, pela boa vontade, educação e paciência com que sempre me recebem em todos os ambientes.

Ao grupo de pesquisa e desenvolvimento de produtos tecnológicos, especialmente às professoras Cláudia Maranhão, Fabíola Soraia Barbosa e Sofia Brandão, pelo acolhimento, paciência, incentivo, disponibilidade e pelos ensinamentos e contribuições que levarei para a vida.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Gestão Ambiental (MPGA), especialmente à coordenação do mestrado profissional, na pessoa da Prof^a. Dra. Renata Maria Caminha Mendes de Oliveira Carvalho, pela dedicação e paciência em responder minhas perguntas e ajudar-me em questões burocráticas nestes anos de pesquisa.

À Prof^a. Dra. Daniela Navarro do Departamento de Química Experimental da UFPE, pela parceria firmada com nosso projeto e ao técnico Júlio César Aguiar, pelas primeiras análises dos testes larvicidas e análises cromatográficas.

À Prof^a. Dra. Maria Alice Varjal, da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) – Pernambuco/Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), como também à Ana Paula Araújo, tecnóloga, pelo apoio incondicional, pelos ensinamentos, paciência, incentivo na pesquisa e realização dos testes de atividade larvicida.

À Prof^a. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães, bem como a pesquisadora Milena Sales Ferraz, ambas do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica (LNFarm) e do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (/LIKA-UFPE), pela ajuda na produção das nanopartículas e parceria nas pesquisas.

Aos bolsistas do laboratório de Pesquisa da Coordenação de Química do IFPE, Maria Eduarda Oliveira, Gabriel Reis, Nilson Araújo, Lígia Sotero, Ayrton Amaral, pelo apoio nas extrações do óleo essencial, bem como na preparação de soluções.

Aos técnicos da Coordenação de Química do IFPE, Enderson José Dias de Melo, Alan Jonas de Arantes, Ricardo Marinho, pela disponibilidade e paciência em nos ajudar no preparo das soluções.

Aos amigos Iara Cristina Ribeiro, Silvana Cunha, Joel Sales, Padre Tarcísio Paiva e principalmente a Juliana Braz, pelo apoio em todos os momentos, bem como aos colegas de

turma MPGA pela parceria, incentivo e apoio sempre.

Aos técnicos da biblioteca do mestrado profissional em Gestão Ambiental do IFPE, generosidade, profissionalismo e grande boa vontade em ajudar, em todos os momentos, indicando livros, teses, sites, periódicos, entre outros instrumentos que me auxiliaram em minhas pesquisas iniciadas em 2016.

Ao Grupo de Pesquisa Ação Interdisciplinar para Sustentabilidade de Mercados Públicos da Região Metropolitana do Recife-PE, onde iniciei minhas pesquisas com fitoterápicos, em especial às professoras Núbia Frutuoso, Tereza Dutra e Patrícia Arruda.

Aos meus pais, que mesmo sem saber da importância desse mestrado na minha vida, nunca descreditaram em mim.

Ao meu esposo Eduardo Oliveira, pela paciência, incentivo, apoio, compreensão e ajuda em todos os momentos em que precisei, não hesitando em nenhum deles, e por sempre acreditar em mim.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

RESUMO

Aedes aegypti é o mosquito com maior dispersão em áreas urbanas do mundo e de grande importância para a medicina por se tratar de um vetor de quatro sorotipos do flavivírus, agente causador da dengue clássica. Não existe vacina para a dengue, sendo suas principais formas de controle as medidas de combate, eliminando os locais onde ocorre a oviposição do hospedeiro e seu desenvolvimento. Esse controle é realizado através de aplicações de inseticidas, larvicidas e repelentes. No entanto, o frequente uso desses produtos tem causado a resistência ao mosquito transmissor da dengue. Diversas pesquisas têm sido realizadas no intuito de encontrar substâncias de origem vegetal que possam servir de alternativa para o controle da dengue. Neste sentido, as plantas medicinais têm-se mostrado promissoras quanto a sua ação larvicida, inseticida e deterrente que agregada a novas tecnologias, viabiliza novos produtos que não sejam nocivos ao meio ambiente. Sistemas de liberação controlada do princípio são alternativas que podem aumentar o período de aplicação do larvicida a ser testado, garantindo-lhe um maior tempo de ação. Tais sistemas contendo óleo essencial se apresentam como importantes estratégias para o controle desse vetor. Sendo assim, as plantas aromáticas, por meio de seus óleos essenciais, obtidos através do seu metabolismo secundário, apresentam-se como viáveis para o combate a esse mosquito. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade larvicida do óleo essencial extraído de partes aéreas de *Croton rhamnifolioides* puro e em formulações de nanocápsulas frente a larvas na fase L3 de *Aedes aegypti*. O óleo essencial foi extraído das folhas por hidrodestilação, usando um aparelho de Clevenger adaptado. A análise dos óleos essenciais foi feita por cromatografia gasosa acoplada a um espectômetro de massas (CG/MS). Foram produzidas formulações contendo concentrações que variaram de 40 a 80 µg/mL de óleo essencial puro e nanocápsulas de policaprolactona com variação de 30 a 80 µg/mL com o óleo essencial encapsulado. Os ensaios larvicidas foram realizados utilizando-se 20 larvas por teste, em um copo contendo 100 ml de água destilada, realizando-se triplicata nas concentrações pré-estabelecidas para cada dosagem, de acordo com o protocolo estabelecido pela Organização Mundial de Saúde. Como resultados, obtiveram-se os valores de CL₅₀ que variaram de 26,3 µg/mL a 52,2 µg/mL e CL₉₀ variando de 37,8 µg/mL a 68,7 µg/mL para o óleo puro. Já para o óleo encapsulado o valor de CL₅₀ foi 63,4 µg/mL e CL₉₀ de 104,8 µg/mL. O óleo puro foi considerado fortemente ativo (CL₅₀ < 50 µg/mL) contra as larvas de *A. aegypti* e moderadamente ativo (CL₅₀ < 100 µg/mL) para o óleo encapsulado. Levando em conta a prospecção do óleo essencial testado, podemos afirmar que o mesmo apresentou-se como fortemente ativo contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Isto sugere que o óleo dessa espécie vegetal pode ser uma alternativa no combate ao vetor da dengue, diminuindo o impacto sobre o ambiente e a saúde da população, porém são necessárias pesquisas mais aprofundada, uma vez que o óleo apresenta diversas variáveis que precisam ser controladas. Estudos mais profundos também são necessários no método de encapsulação do óleo com os polímeros sintéticos para que se possa determinar um perfil de liberação mais adequada.

Palavras-Chaves: *Aedes aegypti*. Óleos essenciais. Larvicida. *Croton rhamnifolioides*. Nanopartículas.

ABSTRACT

Aedes aegypti is the mosquito with the greatest dispersion in urban areas of the world and of great importance for medicine because it is a vector of four serotypes of flavivirus, the causative agent of classical dengue fever. There is no vaccine for dengue, its main forms of control being the combat measures, eliminating the sites where the oviposition of the host occurs and its development. This control is carried out through applications of insecticides, larvicides and repellents. However, the frequent use of these products has caused resistance to mosquitoes transmitting dengue. Several researches have been carried out in order to find substances of plant origin that can serve as an alternative for the control of dengue. In this sense, medicinal plants have shown promise for their larvicidal, insecticidal and deterrent action, which, combined with new technologies, enables new products that are not harmful to the environment. Controlled release systems of the principle are alternatives that can increase the period of application of the larvicide to be tested, guaranteeing a greater time of action. Such systems containing essential oil present themselves as important strategies for the control of this vector. Thus, the aromatic plants, through their essential oils, obtained through their secondary metabolism, are presented as viable to combat this mosquito. Therefore, the objective of this work was to evaluate the larvicidal activity of essential oil extracted from aerial parts of pure *Croton rhamnifolioides* and in formulations of nanocapsules against larvae in the L3 phase of *Aedes aegypti*. The essential oil was extracted from the leaves by hydrodistillation using an adapted Clevenger apparatus. The essential oils were analyzed by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (CG / MS). Formulations containing concentrations ranging from 40 to 80 $\mu\text{g} / \text{mL}$ of pure essential oil and polycaprolactone nanocapsules ranging from 30 to 80 $\mu\text{g} / \text{mL}$ with the encapsulated essential oil were produced. The larvicidal assays were performed using 20 larvae per test in a beaker containing 100 ml of distilled water, with triplicate being performed at the pre-established concentrations for each dosage, according to the protocol established by the World Health Organization. , LC50 values ranging from 26.3 $\mu\text{g} / \text{mL}$ to 52.2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and LC90 ranging from 37.8 $\mu\text{g} / \text{mL}$ to 68.7 $\mu\text{g} / \text{mL}$ were obtained for pure oil. For the encapsulated oil the LC50 value was 63.4 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and the CL90 was 104.8 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Pure oil was considered strongly active (LC50 <50 $\mu\text{g} / \text{mL}$) against *A. aegypti* larvae and moderately active (LC50 <100 $\mu\text{g} / \text{mL}$) for the encapsulated oil. Taking into account the prospecting of the essential oil tested, we can affirm that it presented itself as strongly active against the larvae of the *Aedes aegypti* mosquito. This suggests that the oil of this plant species may be an alternative in combating the vector of dengue, reducing the impact on the environment and the health of the population, however further research is needed, since the oil presents several variables that need to be controlled . Further studies are also required in the method of encapsulating the oil with the synthetic polymers so that a more suitable release profile can be determined.

Keywords: *Aedes aegypti*. *Essencial oils*. *Larvicida*. *Croton rhamnifolioides*. *Nanoparticles*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	25
Figura 2-	Ovos de <i>Aedes aegypti</i>	26
Figura 3 -	Desenho esquemático de uma nanocapsula (A) e nanoesfera (B).....	35
Figura 4 -	Folhas de <i>Croton rhamnifolioides</i>	37
Figura 5 -	Sistema Clevenger modificado para extração de óleo essencial de <i>Croton rhamnifolioides</i>	38
Figura 6-	Óleo essencial extraído e <i>Croton rhamnifolioides</i>	38
Figura 7-	Esquema de produção das nanopartículas contendo óleo essencial (NC-PCL/OE)	40
Figura 8 -	Nanopartículas contendo óleo essencial (NC-PCL/OE) <i>rhamnifolioides</i>	40
Figura 9 -	Larvas de <i>Aedes aegypti</i> mantidas em temperatura controlada.....	42
Figura 10 -	Bioensaio de <i>Croton rhamnifolioides</i> contendo diferentes concentrações com o óleo essencial	42
Figura 11 -	Teste Controle contendo etanol	43
Figura 12 -	Análise de regressão linear do óleo essencial por espectroscopia (A) e por CLAE (B). A linha vermelha representa o ajuste a regressão linear.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Teores de óleo essencial da primeira coleta do material botânico.....	44
Tabela 2 -	Teores de óleo essencial da segunda coleta do material botânico.....	44
Tabela 3-	Principais constituintes químicos do óleo essencial de <i>Croton rhamnifolioides</i>	45
Tabela 4 -	Tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI), potencial Zeta e eficiência de encapsulação (EE %) determinado por cromatografia líquida de alta performance (CLAE) e espectrofotometria de absorção no UV-Visível (UV-Vis) nas nanocápsulas sem (NC-PCL) e com óleo essencial (NC-PCL/OE) e microcápsulas sem (MC-AL) e com óleo essencial (MC-AL/OE).....	47
Tabela 5 -	Curva analítica do óleo essencial de <i>Croton rhamnifolioides</i> (OE) a 236nm	48
Tabela 6 -	Parâmetros do método espectrofotométrico e CLAE para a quantificação do óleo essencial (OE).....	49
Tabela 7 -	Valores para CL ₅₀ e CL ₉₀ dos bioensaios com o óleo essencial puro - lote A	50
Tabela 8 -	Valores para CL ₅₀ e CL ₉₀ dos bioensaios com o óleo essencial puro - lote B	51
Tabela 9 -	Valores para CL ₅₀ e CL ₉₀ dos bioensaios com o óleo essencial puro - lote C.....	51
Tabela 10 -	Valores para CL ₅₀ e CL ₉₀ dos bioensaios com o óleo puro essencial puro - lote D	52
Tabela 11 -	Valores para CL ₅₀ e CL ₉₀ dos bioensaios com as nanopartículas - lote A.....	52

LISTA DE SIGLAS

Bti	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
COPESA	Comissão Permanente de Saúde Ambiental
CLAE	Cromatografia líquida de alta performance
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DQF	Departamento de Química Fundamental
EE	Eficiência de encapsulação
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
IFPE	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco
LD	Limite de detecção
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
LOQ	Limite de detecção e quantificação
MC	Microcapsulas
MP – AL	Micropartículas de alginato de sódio
MP – AL/OE	Micropartículas de alginato de sódio e óleo essencial
MPGA	Mestrado Profissional em Gestão Ambiental
NC	Nanocápsulas
NP	Nanopartículas
NP-PCL	Nanopartículas de Policaprolactona
NP-PCL/OE	Nanopartículas de Policaprolactona com óleo essencial
OE	Óleo essencial
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PCL	Policaprolactona
PDI	Polidispersão
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
SUS	Sistema Único de Saúde
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
VigiSUS	Gestão da Vigilância em Saúde em Estados e Municípios

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	OBJETIVOS	19
1.1.1	Objetivo geral	19
1.1.2	Objetivos específicos	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	Saúde ambiental	20
2.2	<i>Aedes aegypti</i>	23
2.3	Biolarvicidas.....	27
2.4	Plantas Medicinais.....	30
2.5	<i>Croton rhamnifolioides</i>	31
2.6	Óleo essencial	32
2.7	Sistemas de liberação controlada	34
3	METODOLOGIA.....	37
3.1	Coleta e armazenamento de material botânico	37
3.2	Extração do óleo essencial de <i>Croton rhamnifolioides</i>	38
3.3	Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial	39
3.4	Produção das nanocápsulas.....	39
3.4.1	Reagentes.....	39
3.4.2	Preparação das nanocápsulas.....	40
3.5	Caracterização das formulações contendo óleo essencial.....	40
3.5.1	Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta.....	40
3.5.2	Determinação do conteúdo de óleo nas nanocápsulas.....	41
3.6	Determinação da atividade larvicida	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1	Extração do óleo essencial.....	44
4.2	Composição química do óleo essencial de <i>C. rhamnifolioides</i>	45

4.3	Produção das nanocápsulas com e sem óleo essencial.....	47
4.4	Determinação da atividade larvícida do óleo essencial de <i>C. rhamnifolioides</i>	49
5	CONCLUSÃO	55
6	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

Quando abordamos sobre as condições de saúde da população, as preocupações viram interesse de todos, uma vez que o ambiente onde se vive vai interferir significativamente na sua qualidade de vida. As transformações, quase que irreversíveis no meio ambiente afetam a qualidade de vida de todos que a rodeiam. Tantas modificações tem afetado diretamente a saúde ambiental. Um exemplo prático dessas modificações, podemos visualizar no aumento da densidade de insetos *Aedes aegypti*, o qual está relacionado com seu comportamento sinantrópico (adaptados a viver em centros urbanos) e ao hábito antropofílico (capacidade de localizar atividade humana).

Para prevenir as doenças ocasionadas por essa espécie, tais como dengue, zika vírus e febre chikungunya, a população e a comunidade científica têm-se alarmado, verificando a necessidade de impedir a infecção pelo controle do vetor, reduzindo a transmissão ou bloqueando o mosquito, papel esse exercido por meio das políticas de Saúde Pública, uma vez que não existe vacina para combater o vírus transmitido (CHIARELLA, 2016; BRAGA e VALLE, 2007).

Nesse sentido, o controle do mosquito vem sendo realizado por meio do uso de larvicidas sintéticos, tornando-se um dos métodos mais praticados para o controle de vetores em Saúde Pública (ROSE, 2001). O uso constante desses produtos tem ocasionado diversos danos ao meio ambiente, seja no ar ou na água, interferindo diretamente na saúde do ser humano, além de ocasionar vários transtornos ambientais, sociais e econômicos (JINTANA et al., 2015).

Tendo em vista a necessidade de uma tecnologia limpa, de um novo método para o controle do vetor, que seja viável no ponto de vista ambiental e econômico, que não agridam e nem degradem o meio ambiente e que contribuam de forma positiva para o crescimento científico, que seja tóxico apenas contra o vetor e que não cause modificações significativas nas características da água (OMS, 2006), a utilização de plantas medicinais como método alternativo ao uso dos inseticidas sintéticos tem sido bastante investigado. Muitas destas plantas apresentam atividade larvicida contra o mosquito *A. aegypti* devido à presença de várias substâncias orgânicas que agem de forma isolada ou sinérgica (SANTOS, 2014).

Dentre estas plantas, *Croton rhamnifolioides*, conhecida popularmente como “quebra-faca”, é utilizada também no controle de vetores (SANTOS, 2014), podendo ser empregado como um inseticida natural, sendo uma alternativa sustentável para programas de controle de vetor contra a dengue.

Aliada a este fato, a biotecnologia tem investido no desenvolvimento de nanopartículas biodegradáveis, tendo como objetivo obter a liberação controlada de ativos, com uma concentração ideal (SOPPIMATH et al., 2001). Sendo assim, a utilização de nanoencapsulação no controle do vetor, utilizando os óleos essenciais como agentes larvicidas, no âmbito da Saúde Pública, pode-se apresentar como uma alternativa viável.

Diante do exposto, a presente dissertação avaliou a atividade larvicida do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* utilizando sistemas de liberação controlada por meio de nanocápsulas que visam o encapsulamento do óleo essencial extraído da *Croton rhamnifolioides*, bem como sua ação isolada para o combate ao mosquito *Aedes aegypti*, visando a obtenção de novos biolarvicidas potenciais, que agridam menos o meio ambiente e mais eficazes no controle do vetor, causando um menor impacto ambiental, melhorando assim, a qualidade de vida dos seres humanos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade larvicida do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* através de sistemas de liberação controlada, com produção e caracterização de nanocápsulas a base de policaprolactona e de óleo essencial da planta *Croton rhamnifolioides*, para o combate ao mosquito *Aedes aegypti*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Extrair óleo essencial de partes aéreas de *Croton rhamnifolioides* e determinar a composição química por CG-MS.
- Produzir e caracterizar nanocápsulas de policaprolactona contendo núcleo oleoso de *Croton rhamnifolioides*.
- Determinar a taxa de encapsulação do ativo nas nano e micropartículas, através do doseamento dos componentes principais dos óleos essenciais por cromatografia líquida de alta performance (CLAE) e espectrofotometria de absorção no UV-Visível.
- Avaliar a atividade larvicida do óleo puro e das nano e micropartículas contendo óleo essencial frente a larvas na fase L3 de *Aedes aegypti*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Esta seção está separada em sete subitens que dizem respeito às sete categorias teóricas classificadas de suma importância para a contextualização e justificativa do estudo em questão, são elas: Saúde ambiental, *Aedes aegypti*, biolarvicidas, plantas medicinais, *Croton rhamnifolioides*, óleo essencial e sistemas de liberação controlada.

2.1 Saúde ambiental

É notório que o discurso em torno das questões ambientais vem englobando preocupações crescentes, quando se referi na relação existente entre saúde e ambiente. Mesmo nosso país sediando importantes eventos ambientais, envolvendo-se inteiramente nestas discussões e dispondo de diversos marcos legais e normativas que subsidiam a saúde pública, como por exemplo, a Constituição Federal e Lei Orgânica da Saúde, a realidade no Brasil é que existe um afastamento exorbitante entre as ações em saúde e sua ligação com as questões ambientais (SANTOS et al, 2011).

Nesse contexto, o documento que recomenda a formulação da Política Nacional de Saúde Ambiental (PNSA), fundamenta a necessidade de conciliar a atenção à saúde de indivíduos e coletividades, beneficiando as ações de atenção básica, voltada a promoção da saúde, diante das principais necessidades de saúde da população (BRASL, 2007).

A elaboração de uma política nacional de saúde ambiental é um grande avanço, uma vez que se posiciona como uma política agregadora e interdisciplinar, possibilitando a promoção de saúde ambiental, onde as enfermidades não estão relacionadas ao funcionamento biológico do corpo humano e sim, sua interação com o ambiente social e político, uma vez que é considerada uma política pública intersetorial. A complexidade em interpretar os novos padrões de saúde – doença propõe uma estratégia interdisciplinar, agregando o conhecimento de diversas áreas. Nesse sentido, nasce o campo da saúde ambiental, procurando demonstrar uma relação entre a saúde humana e a dos ecossistemas, de forma interdependente, de maneira que as questões ambientais são apontadas como questões de risco para a qualidade de vida do ser humano. O campo da saúde ambiental busca associar a saúde humana aos fatores do meio ambiente natural e antrópico, tendo a necessidade de elaborar marcos, capazes de intervir na relação entre meio ambiente-saúde-desenvolvimento econômico e social. Para isto, sua elaboração exigiu um novo conceito de saúde e de natureza (meio ambiente) (RAMOS, 2013).

Quando se pensa em meio ambiente, vem logo na mente às áreas naturais como,

matas, florestas, rios, lagos entre outros. No entanto, meio ambiente é muito mais que isso, compreende-se como:

“O conjunto de condições, leis, influências e interações de ordem física, química e biológica, que permite, abriga e rege a vida em todas as suas formas” (Lei nº 6.938 de 31/08, Brasil, 1981).

Este conceito foi aperfeiçoado pela Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA:

“Meio Ambiente é o conjunto de condições, leis, influências e interações de ordem física, química, biológica, social, cultural e urbanística que permite, abriga e rege a vida em todas as suas formas” - Resolução CONAMA Nº 306/2002 (BRASIL, 2005).

Nesse contexto, o meio ambiente compreende o local onde se vive, existindo uma relação entre o meio ambiente criado e a qualidade de vida de quem vive neste ambiente. Há décadas, se sabem da relação existente entre as modificações do meio ambiente, a degradação dos recursos naturais e a aparição de fatores ambientais de risco. Assim, se partirmos da origem que a saúde do homem esta relacionada diretamente da boa saúde do meio ambiente, então, pode-se dizer que essa saúde está muito comprometida.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define a saúde como um estado de completo bem-estar físico, mental e social e não somente restringindo o problema sanitário a ausência de patologias e enfermidades (OMS, 2000).

A interrelação entre saúde e ambiente foi aos poucos sendo inserida aos marcos legislativo brasileiro. Esse novo modelo de pensar e promover a saúde exige uma modificação dos sistemas de saúde, uma vez que se constatou que o setor sanitário não seria capaz de atender aos novos determinantes e condicionantes em saúde.

Para a implementação da saúde ambiental, o Ministério da Saúde decide implantar o projeto VigiSUS, em 1997. Com intuito de estruturar o Sistema Nacional de Vigilância em Saúde Ambiental, conforme as diretrizes do Sistema Único de Saúde - SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Em 2001, o SUS cria a Comissão Permanente de Saúde Ambiental – Copesa, instituída pela Portaria nº 2.253 do Ministério da Saúde. Em 2002, por meio do Decreto nº 3.450, a Vigilância em Saúde Ambiental é garantida em todo o território nacional, sendo o marco inicial de institucionalização deste novo setor da saúde. Por meio do Decreto nº 4.726, no ano de 2003, o Centro Nacional de Epidemiologia da Fundação Nacional de Saúde - Funasa é alterado para Secretaria de Vigilância em Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

O Ministério da Saúde instituiu o programa de Fomento às Ações de Educação em Saúde Ambiental, em 2012, com objetivo da promoção da saúde e contribuição da melhoria da qualidade de vida, entendendo dessa forma a relação existente entre Saúde Ambiental e Saúde Pública. A saúde pública nos indica a predominância de várias enfermidades no indivíduo, onde algumas delas estão diretamente relacionadas com os problemas ambientais (BRASIL, 2013).

As condições na infraestrutura sanitária influenciam diretamente na saúde e nas condições de vida do indivíduo, principalmente em países em fase de desenvolvimento, onde o aumento das doenças infecciosas é a principal razão da mortalidade, sendo o aumento da incidência de doenças um forte indicativo de vulnerabilidade dos sistemas públicos de saneamento (DANIEL *et al.*, 2001).

Na realidade do nosso País, as situações indicadas anteriormente resumem-se na coexistência de doenças infectocontagiosas a qual está ligada à presença de vetores e a contaminação das águas, interligadas aos fatores e poluição ambiental (BRASIL, 1999).

Cerca de 233 mil pessoas falece todo ano no Brasil devido a exposição aos fatores de risco ambiental, tais como a poluição da água, ar e a falta de infraestrutura urbana, onde 19% das mortes poderiam ser evitadas caso fossem realizadas políticas públicas eficazes (BBC, 2018).

Com a falta de eficiência e infraestrutura no saneamento básico, várias são as doenças desencadeadas, tais como, a cólera, dengue, doença de Chagas aguda, esquistossomose, febre amarela, febre tifoide, hepatite, leishmaniose visceral, leptospirose e malária. Dentre estas, as principais doenças associadas a falta de saneamento básico com maior incidência de casos notificados no período de 2001 a 2009 foram, em ordem decrescente, a dengue, a hepatite, a esquistossomose e a leptospirose (BRASIL, 2011).

Atualmente houve uma reemergência de febre amarela nas regiões centrais do Brasil. De acordo com o boletim epidemiológico, no período de janeiro de 2017 a março de 2018, foram registrados e confirmados 1.712 casos e mais de 500 óbitos acometidos pela doença (BRASIL, 2018), estatística que inclui também os turistas estrangeiros (GOSSNER *et al.*, 2018). Estas informações nos mostram o quanto é importante às medidas de controle e a implementação de novas medidas de combate ao mosquito, bem como políticas públicas de saúde mais descentralizadas.

Estas arboviroses, doenças transmitidas por insetos, apresentam grande importância na saúde pública, principalmente no Estado de Pernambuco, o qual apresentou no primeiro semestre de 2016, cerca de 93 mil casos registrados de enfermidades ocasionados por Dengue,

Chikungunya e Zika vírus, 32 óbitos confirmados e 2.104 casos suspeitos de microcefalia, dando ao Estado o primeiro lugar no pódio do informe epidemiológico de monitoramento nos casos de microcefalia, casos estes relacionados às doenças propagadas pelo vetor *Aedes aegypti* (BRASIL, 2016b).

2.2 *Aedes aegypti*

O mosquito responsável pela transmissão da dengue tem origem no Egito, na África, desde o século XVI, na época das Grandes Navegações e vem se dispersando pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Supõe-se que o vetor tenha sido inserido no Novo Mundo, durante o período colonial, através dos navios negreiros, durante as primeiras explorações e colonizações européias. Cientificamente, foi descrito pela primeira vez em 1762, sendo denominado *Culex aegypti*. O nome *Aedes aegypti* só foi estabelecido em 1818, depois da descrição do gênero *Aedes* (FIOCRUZ, 2017).

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) a primeira epidemia de dengue no continente americano surgiu no Peru, no século XIX, se alastrando no Caribe, Estados Unidos, Colômbia e Venezuela. Apenas no final do século XIX foi que surgiram os primeiros relatos do mosquito no Brasil, em Curitiba (PR), e em Niterói (RJ) no início do século XX. No século XX, o mosquito já se encontrava como um problema, não por causa da dengue e sim pela transmissão da febre amarela. No ano de 1955, o Brasil eliminou o *Aedes aegypti*, mas em 1960, o não cuidado das medidas de controle levou ao reaparecimento do vetor no país. Nos dias atuais, o mosquito é detectado em todos os Estados brasileiros (FIOCRUZ, 2018).

De acordo com o Ministério da Saúde, os primeiros aparecimentos do vírus no Brasil foram documentados clínica e laboratorialmente entre 1981 a 1982, em Boa Vista (RR), ocasionada pelo vírus DENV-1 e DENV-4. Em 1986, ocorreu uma epidemia no Rio de Janeiro (RJ) e no Nordeste. Após isso, a dengue vem crescendo no Brasil de forma contínua (FIOCRUZ, 2018), recentemente e com grande impacto na saúde pública, ela surge como Zika Vírus e Chikungunya (GUILHERMINO, 2016).

O seu ciclo de vida é bastante astucioso, ou seja, ágil, sendo seu estudo, fundamental para o desaparecimento do mosquito no território nacional, seus hábitos de vida são bastante estudados despertando diversas pesquisas que norteiam o controle do vetor. Diversas descobertas nos mostram que a relação do mosquito com a temperatura e a densidade populacional é bastante estreita, uma vez que a queda da temperatura ambiente para 20°C

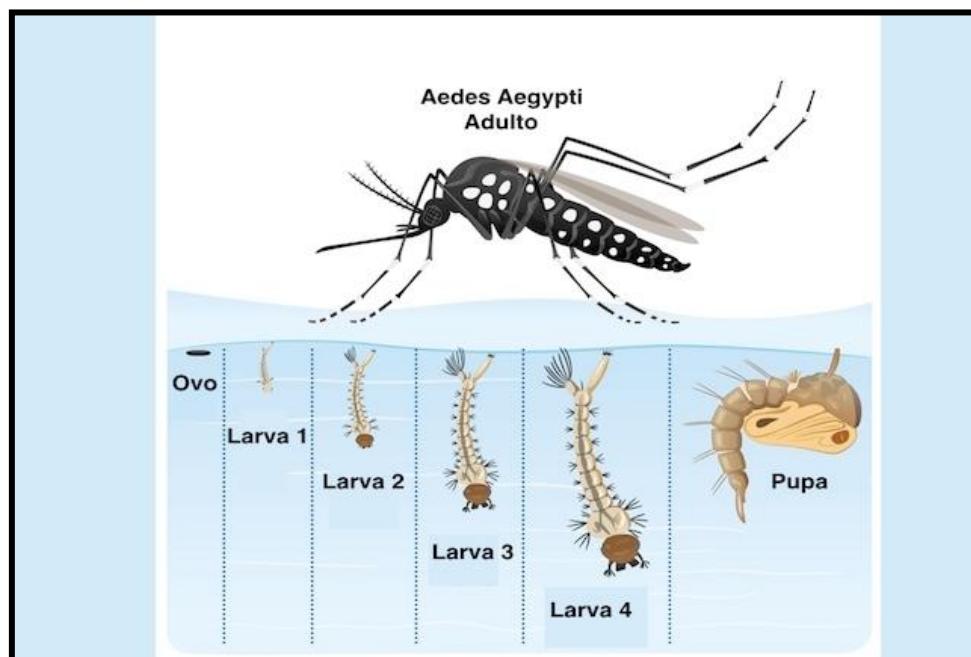
interferi diretamente no desenvolvimento e conseqüentemente em sua reprodução, reduzindo-o drasticamente e com isso diminuindo os casos, na década de 1920 foi controlado na cidade do Rio de Janeiro pelo sanitarista Oswaldo Cruz e erradicado do Brasil por um período de trinta anos (FIOCRUZ, 2017).

De hábitos oportunistas, uma vez que é um mosquito doméstico, vivendo ao redor ou dentro de domicílios ou em demais locais onde habita pessoas, como por exemplo, lojas, escolas, igrejas, o mosquito *Aedes aegypti* possui hábitos diurnos, alimentando-se de sangue humano, preferencialmente ao amanhecer e ao entardecer, podendo também picar no período noturno. Por viver ao redor do homem, é mais comum observarmos sua presença em áreas urbanas, sendo as regiões com maior densidade populacional as mais afetadas sobretudo nas ocupações não planejadas, que oferecem um ambiente propício (oportunidades de alimentação e criadouros) para a fêmea desovar (FIOCRUZ, 2017).

No verão, a proliferação do mosquito é mais intensa, devido à elevação da temperatura, fator este que possibilita a eclosão de ovos do mosquito. Para prevenir tal situação, é necessário adotar ações permanentes para o controle do vetor, durante todas as estações do ano, com medidas preventivas de erradicação de focos do vetor. Pesquisas feitas em campo mostram que os grandes reservatórios como tonéis, baldes, caixas d'água, estão como os criadouros que mais proliferam *A. aegypti* e, conseqüentemente os mais perigosos (FIOCRUZ, 2017).

O ciclo de vida do *A. aegypti* pode alterar de acordo com a temperatura, outras situações como a quantidade de larvas disponíveis no mesmo criadouro e a disponibilidade de alimentos consistem em um empecilho ao amadurecimento do inseto à fase adulta, uma vez que as larvas nessas condições possuem uma competição por alimentos quando encontram-se no mesmo criadouro com água insuficiente. Encontrando condições ambientais oportunos, acontece a eclosão do ovo e seu desenvolvimento até a fase adulta, durando um período de 10 dias. Por isso, recomenda-se a limpeza de criadouros pelo menos uma vez na semana, interrompendo assim, o ciclo de vida do mosquito (BRASIL, 2018).

Seu ciclo de vida (Figura 1) compreende as fases de ovo, quatro estágios larvais, a fase de pupa e adulto (TORRES, 2014). Ocorrendo a primeira fase no ambiente aquático, as fêmeas depositam os ovos nas paredes dos reservatórios com água. Até a formação do indivíduo adulto, temos um período de aproximadamente dez dias, a larva cresce e vira pupa e, dois dias depois, o mosquito está completamente formado. Alimentando-se na fase adulta de seiva vegetal e realizando a hematofagia (fêmea), alimentos necessários para o desenvolvimento dos ovos (TORRES, 2014).

Figura 1 – Ciclo de vida do *Aedes aegypti*

Fonte: <http://isags-unasur.org>, 2018.

Bairros com alta densidade populacional e baixa cobertura vegetal possuem os maiores índices de infestação por *Aedes aegypti*, encontrando nesses locais fatores que influenciam diretamente em seu desenvolvimento. Tanto os machos quanto as fêmeas do *Aedes aegypti* alimentam-se de produtos açucaradas, como por exemplo, o néctar e a seiva. Sendo a fêmea responsável por absorver sangue do homem, comida indispensável ao desenvolvimento dos ovos (BRASIL, 2018).

A reprodução do *A. aegypti* ocorre ao redor e dentro das habitações, na maioria das vezes nos primeiros dias após o mosquito chegar à fase adulta, necessitando apenas de uma cópula para o acasalamento ser concretizado, após o ato sexual, a fêmea necessita se alimentar de sangue, nutriente importante para o desenvolvimento de seus ovos, estando aptas para a postura de ovos três dias após essa ingestão, procurando dessa forma um local adequado para procriar (BRASIL, 2018).

Ocorrendo a desova em lugares com água limpa e parada, os ovos são dispostos nas paredes dos criadouros, próximo à superfície da água e não de modo direto na água. Por isso, a importância de manter os recipientes que possam acumular água limpos e sem acúmulo de água (TORRES, 2014).

A reprodutividade da fêmea pode originar 1.500 mosquitos por toda sua vida, os quais são distribuídos em diversos criadouros, método que assegura a preservação e dispersão da espécie. Quanto as características microscópicas, os ovos (Figura 2) apresenta a cor branca e,

posteriormente, escurecem, uma vez que tem contato com o oxigênio (FIOCRUZ, 2018).

Figura 2 – Ovos de *Aedes aegypti*



Fonte: FIOCRUZ, 2018.

Ainda segundo Fiocruz (2018), os ovos do *A. aegypti* podem resistir até 450 dias sem contato direto com a água, adquirindo resistência em apenas 15h após a postura. Com tanta resistência, o mosquito alcança longos períodos de dessecação, sendo uma enorme vantagem, uma vez que possibilita os ovos sobreviverem por períodos longos em ambientes secos, até a próxima estação chuvosa e quente, propiciando sua eclosão. Possuindo um ambiente favorável de umidade e temperatura, o crescimento do mosquito é concluído em 48h. Todas essas características do ciclo de vida do mosquito comprova a necessidade de combater constantemente seus criadouros, em qualquer época do ano.

Os primeiros programas de controle no combate ao vetor eram baseados em medidas físicas e no emprego de óleo nos criadouros (ROZENDA, 1997).

Mesmo com o avanço da tecnologia, ainda não foi desenvolvida uma vacina que combata a dengue. Atualmente, sua prevenção é através do controle do vetor, sendo realizado com a eliminação dos criadouros potenciais do vetor com aplicação de larvicidas nos recipientes de água de consumo, bem como uso de inseticidas nas fases adultas em períodos de transmissão (TAUIL, 2001).

2.3 Biolarvicidas

Na Saúde Pública, o controle de vetores compreende diversas metodologias na perspectiva de limitar ou eliminar insetos ou outros organismos que disseminem patógenos transmissores de doenças.

O controle vetorial atualmente é dividido em controle biológico, mecânico ou ambiental e químico. O controle biológico corresponde ao uso de parasitas, patógenos e/ou predadores naturais no controle de vetores, entre eles o *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti). Quanto ao controle mecânico ou ambiental, são utilizadas práticas que reduzem ou eliminam as áreas em que os vetores desenvolvem-se, estando entre elas, o esvaziamento de recipientes que acumulam água ou que servem como um ambiente de criadouros de mosquito. Outros métodos também utilizados incluem o uso de mosquiteiros, roupas de proteção e telas nas janelas das residências. No controle químico, tem-se o uso de inseticidas para o controle de diferentes fases dos insetos, podendo ser classificados também como larvicidas (o alvo são as fases larvárias) ou adulticidas (BRASIL, 2018).

O Programa Nacional de Controle da Dengue/MS - PNCD, desde 1998, avalia novas alternativas de controle químico, como também novas formulações que possam ser desenvolvidas para esta finalidade, além de investigar a resistência de populações de *Aedes aegypti* em vários municípios do país perante os inseticidas que são recomendados pelo PNCD (BRASIL, 2018).

Os larvicidas empregados no controle de vetores pertencem, especialmente, àqueles do grupo dos biolarvicidas. É recomendada pela Organização Mundial de Saúde a utilização de cinco grupos de larvicidas, entre eles podemos citar o temefós empregado entre 1999 e 2012, diflubenzuron e novaluron, em 2013, e, em 2014, o pyriproxyfen (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). O principal larvicida empregado para o controle de *Aedes aegypti* nos últimos anos foi o temefós. Porém, desde 1999 vem sendo encontrada certa resistência do vetor a esse larvicida, situação que fez com que especialistas intervissem no uso do mesmo (BRASIL, 2014).

Assim sendo, o temefós foi empregado de maneira restrita em 2013, sendo, porém mais utilizado neste mesmo ano os larvicidas diflubenzuron e novaluron e no ano de 2014 deixou de ser aplicado, sendo substituído por pyriproxyfen (BRASIL, 2014). Uma das metodologias mais adotadas no combate aos vetores é o uso do controle químico, sendo reportado como elemento de manejo sustentável integrado. O uso de inseticidas de origem

orgânica ou inorgânica, a busca por inseticidas que permaneçam ativos por longos períodos é um dos enormes progressos no controle de insetos sucedidos do século XX (ROSE, 2001).

O dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), foi o marco inicial no desenvolvimento de um inseticida que tivesse um efeito prolongado, sendo formulado na Segunda Guerra Mundial, seu efeito permanecia durante vários meses contra os insetos, nas paredes e tetos das residências (ROZENDAAL, 1997).

Outra questão bastante discutida se refere ao impacto ambiental, no uso desses inseticidas, uma vez que estamos criando populações de mosquitos cada vez mais resistentes e com isso, temos que elevar cada vez mais as dosagens desses produtos, o que causa danos irreparáveis ao meio ambiente. O uso irracional do controle químico no combate aos vetores pode desencadear grandes desequilíbrios ambientais, seja no solo, na água, atmosfera e principalmente nos seres vivos. No entanto, a utilização desenfreada de larvicidas, biocidas e inseticidas tem ocasionado uma resistência do mosquito *A. aegypti*, e apesar da liberação perante os órgãos competentes, esse composto interfere diretamente na contaminação dos solos, lençóis freáticos, além de desencadear diversos problemas de saúde ambiental como contaminação e intoxicações (GUILERMINO, 2016).

Sabe-se, no entanto, que qualquer substância química pode causar danos à saúde, isso vai depender muito da dose aplicada e das condições às quais a população é exposta (PAUMGARTTEN, 1993).

Sendo a resistência a inseticida uma das variáveis que contribui para a reemergência de doenças disseminadas por vetores, os inseticidas químicos continuam exercendo papel de extrema importância nos programas de controle (LYRA, 2009). Assim sendo, a resistência pode se espalhar nas populações de insetos que contraem habilidade de sobreviver a doses de compostos tóxicos que seriam letais para grande parcela dos indivíduos suscetíveis da mesma espécie (GARCIA, 2012; AMORIM, 2013; PAIVA, 2016).

Vários estudos buscam alternativas naturais para o controle de mosquitos vetores, entre eles podemos destacar a utilização da bactéria *Wolbachia* utilizada para diminuir a potencialidade de infecção viral do vetor (DUTRA et al., 2016). Além disso, testes com larvicidas de natureza biológica têm se apresentado eficiente no combate ao mosquito, sendo utilizados como opções perante os larvicidas químicos. No meio deles, destacam-se os originados a partir de partes de plantas, algas marinhas e fungos (TORRES, 2014; AGUIAR, 2015; DE PAULA, 2016).

Todos esses indicadores deixam a comunidade científica em extremo estado de alerta, forçando-a a buscar alternativas sustentáveis para o controle dos insetos vetores. Perante esta

realidade, os inseticidas botânicos e os bioinseticidas mostram-se como uma alternativa ecologicamente sustentável e ao mesmo tempo viável, além de ser mais econômico. Porém alguns aspectos podem influenciar e alterar a composição química dessas plantas, uma vez que a flora responde a estímulos ambientais bastante variáveis, podendo ser de natureza física, química ou biológica. O tipo de solo, radiação solar, umidade, temperatura, vento e poluição atmosférica são fatores que também influenciam bastante em sua composição (MACIEL et al., 2002).

Perante esta adaptação no meio ambiente, os vegetais produzem substâncias essenciais para sua manutenção e sobrevivência. É no metabolismo primário que a planta produz suas principais substâncias responsáveis pelas suas funções vitais, entre elas a celulose, proteínas, lignina, lipídios, açúcares entre outras. No metabolismo secundário são produzidas poucas substâncias, as quais podem citar os terpenóides, alcalóides e derivados de fenilpropanóides, as quais possuem um papel de defesa do vegetal, protegendo a planta de possíveis predadores. A presença, principalmente, de constituintes da classe dos terpenóides e do fenilpropanóides no vegetal representa a interação planta-inseto (ALVES, 2001).

Na procura por plantas que tenham substâncias ativas contra os insetos, a medicina popular se mostra como uma fonte riquíssima de informações. A literatura nos mostra que existe uma maior possibilidade de encontrarmos atividade biológica em vegetais já conhecidos pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas aleatoriamente (CECHINEL et al., 1998). Sendo visto como um organismo que co-evolue como qualquer outro micro-organismo e produz mecanismo de defesa contra seus predadores, as plantas são fontes naturais de substâncias antimicrobianas e inseticidas.

A utilização doméstica de plantas medicinais, em todo o mundo, é um hábito comum na cultura popular. No entanto, sua utilização no combate aos mosquitos portadores de doenças ainda é vista como uma grande novidade em vigilância entomológica e no mundo científico (SIMAS et al., 2004). Neste contexto, substâncias extraídas de diversas partes das plantas têm apresentado propriedades larvicidas no controle de diversos culicídeos (SILVA et al., 2004).

Apesar do crescente uso destas plantas na medicina popular, ainda se encontra bastante resistência em investimentos no meio científico e financeiros, ocasionando poucas investigações em estudos toxicológicos, químicos e biológicos perante elas.

Apesar da grande biodiversidade existente em nosso país, são poucos os estudos sobre a capacidade terapêutica das plantas. Tendo como característica o não ataque ao meio ambiente, o controle biológico, realizado através da flora é natural e biodegradável, sendo

improvável a obtenção de resistência pelo vetor. Uma vez que provém da natureza e pra ela é destinada, seu tempo de vida é curto, impedindo assim, o acúmulo no solo, seus compostos produzidos, possuem uma característica importante, pois não apresenta toxidade a humanos, sendo uma especialidade importante, uma vez que os agentes de controle são aplicados em áreas urbanas (POLANCZYK et al., 2003).

Estudos sobre as propriedades das plantas nos retoma a um provável controle vetorial que pode vir a se dá com baixo custo econômico, além de um baixo possível impacto ambiental. Os produtos vegetais revelam-se mais eficientes, atacando alvos específicos, uma vez que não ataca outros organismos, diminuindo assim o risco de prejuízos ao meio ambiente.

2.4 Plantas medicinais

A biodiversidade pode ser avaliada pelo seu papel evolutivo e ecológico. Mas através de seus recursos biológico é que podemos identificar as substâncias, dessa vasta diversidade, que possui em uma utilização direta, indireta ou até potencial para a população (LÉVÊQUE, 1999). Dentre os componentes que fazem parte dessa biodiversidade, encontramos as plantas medicinais, as quais são usadas pela população como remédios caseiros, consideradas importantes matéria-primas no preparo de fitoterápicos, além de outros medicamentos (LEÃO et al., 2007).

Segundo Lopes et al (2005), planta medicinal é toda aquela que aplicada ao homem, por qualquer via ou forma, desempenhe alguma ação terapêutica. A fitoterapia é o tratamento realizado com o uso de plantas medicinais e os fitoterápicos são os produtos derivados a parti dessas plantas. Assim sendo, a fitoterapia é definida pelo tratamento com a utilização de plantas medicinais e suas inúmeras formas farmacêuticas, sem o emprego de princípios ativos isolados (SCHENKEL et al., 2000)

É estimado pela OMS que 80% da população mundial faz uso desses recursos por não possuir condições favoráveis de assistência médica (CECHINEL, 2001). Morgan (1994) confirma que toda planta que contenha um ou mais princípios ativos em seus compostos e que são benéficos à saúde dos seres humanos são consideradas plantas medicinais.

Entre as variedades de plantas, temos as plantas aromáticas e medicinais, as quais por metabolismo secundário produzem óleos essenciais, os quais estão contidos em diversas partes anatômicas das plantas, constituindo elementos voláteis (ALVES, 2001).

As plantas apresentam-se como inseticidas botânicos, respondendo a estímulos ambientais diversos, seja de natureza física, biológica ou química (MACIEL et al., 2002).

Desta maneira, substâncias extraídas de diversas partes da planta como a casca do caule, das folhas e dos frutos têm demonstrado propriedades larvicidas no controle de diversos insetos (GUILHERMINO, 2016).

Diversas pesquisas científicas vêm sendo realizadas para validar os saberes populares quanto ao uso das plantas medicinais. Podemos citar o grande interesse da indústria farmacêutica em desenvolver pesquisas com o propósito de encontrar novos princípios ativos, além de aperfeiçoar as novas atividades farmacológicas de substâncias descobertas e aquelas já conhecidas e advindas de plantas (GURIB-FAKIM, 2006), porém, seu manejo no combate aos mosquitos transmissores de doenças ainda tem sido alvo de demasiada investigação (SANTOS et al., 2015; SANTANA et al., 2015; ROSA et al., 2016).

Experimentos realizados em laboratórios especializados comprovaram o potencial larvicida de diversas plantas, entre elas *Sapindus saponaria* (Sabão-de-soldado), perante as larvas de *A. aegypti*. Outras plantas como *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e *Magonia pubescens* (tinguá) sobre *A. aegypti* apresentaram resultados consistentes (SIMAS et al., 2004). Já para o controle do mosquito *Culex quinquefasciatus*, transmissor da filariose bancroftiana, confirmou-se o efeito larvicida do óleo-resina de *Copaifera reticulata*, mais conhecido como o óleo de copaíba (SILVA et al., 2003).

Pesquisas recentes sugerem a ação terapêutica de várias plantas como inseticida natural, o qual é vista como uma alternativa de inseticida seguro para o meio ambiente, tornando-se uma alternativa no controle das larvas de *Aedes aegypti* (NAVARRO et al., 2014). Ainda segundo Navarro et al (2014), entre as vantagens de utilizar produtos naturais está a sua biodegradabilidade no meio ambiente. Na área da agricultura, por exemplo, o manejo de inseticidas botânicos é antigo e possibilitou enormes benefícios, entre eles a diminuição dos custos de produção, além da preservação do ambiente e dos alimentos contra contaminação química, auxiliando no aprimoramento da qualidade de vida da população (BARRETO, 2005).

2.5 *Croton rhamnifolioides*

Nosso país abriga uma grande biodiversidade, apresentando um habitat específico para plantas medicinais e aromáticas não vista em outras partes do mundo (MAIA, 2004). Embora a flora tenha grande importância, seu potencial ainda é pouco explorado, uma vez que existe uma parcela considerável de plantas que não tiveram suas propriedades conhecidas.

Sendo uma espécie endêmica do Nordeste do Brasil, *Croton rhamnifolioides* é bastante utilizado na medicina popular, contudo pouco estudada. Devido o seu uso popular ser

bastante praticada e a mesma ser rica em óleo essencial, essa espécie atrai bastante interesse com o intuito de descobrir novos compostos naturais (SILVEIRA, 2005).

O gênero *Croton* é um dos maiores da família Euphorbiaceae contendo aproximadamente 1.200 espécies, distribuída em sua maior parte no continente americano, especialmente no Brasil, com cerca de 350 espécies, possui também representações também na África, Ásia e Oceania (BERRY et al., 2005).

Diversas espécies deste gênero caracterizam-se por serem odoríferas, além de possuir uma grande quantidade de óleo essencial distribuída em todos os órgãos do vegetal, principalmente em suas folhas, cascas e caule (SILVEIRA, 2005). Possuindo constituintes ativos como terpenóides, flavonoides e alcalóides juntamente com os óleos essenciais apresentam propriedades terapêuticas já comprovadas (SALATINO et al., 2007).

Conhecido popularmente como quebra-faca ou caatinga branca, *Croton rhamnifolioides* é encontrado vastamente no nordeste brasileiro. Tendo forma de um subarbusto ou arbusto é usada na medicina popular no tratamento de inflamações, úlceras e hipertensão (RANDAU et al., 2004). Apesar de ser encontrada vastamente no continente Americano e da grande variedade de dados encontrados sobre espécies de *Croton*, pesquisas sobre *Croton rhamnifolioides* é bastante escassa (FERREIRA, 1998).

Sendo as plantas e as algas uma fonte favorável de compostos com propriedades larvicidas e inseticidas, os esforços investidos no estudo de extratos delas, bem como seus óleos essenciais e moléculas naturais ativas, sucederam na descoberta de vários compostos que podem ser empregados como agentes de controle em combate as larvas e adultos de *Aedes aegypti* (NAVARRO et al., 2014).

O óleo essencial presente nas folhas de *Croton rhamnifolioides*, vegetal cujo gênero contém várias espécies utilizadas na medicina popular, evidenciou atividade larvicida, bem como impedimento na oviposição em *Aedes aegypti* (SANTOS et al., 2014).

2.6 Óleo essencial

Obtidos de plantas aromáticas, os óleos essenciais se caracterizam por apresentarem substâncias voláteis, extremamente concentradas, sendo utilizada na medicina popular, indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia. Os óleos podem ser encontrados em diversas partes anatômica da planta, contendo composição lipofílica, o que lhe diferencia dos verdadeiros óleos e gorduras que apresentam em sua composição a glicerídica.

Estes óleos estão relacionados a diversas funções as quais são necessárias à sobrevivência e proteção do vegetal. Na medicina popular, os óleos essenciais possuem uma grande tradição de uso (SIANI et al., 2000). Comprovados em trabalhos científicos, os óleos essenciais contêm ação larvicida perante *Aedes aegypti*, sendo atribuída à ação isolada ou sinérgica de suas substâncias (NAVARRO et al., 2013).

É relatada na literatura a presença de 361 óleos essenciais de 229 espécies que demonstram ação contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Sendo das famílias *Myrtaceae*, *Lamiaceae* e *Rutaceae*. O *Croton rhamnifolioides* compõe 27% das plantas estudadas no Brasil, 77% destas se localizam no Nordeste brasileiro (DIAS, 2014). Dentre tantas famílias de plantas localizadas no Brasil, ela vem chamando a atenção devido as características pertencentes a este gênero, o qual apresenta cerca de 1.200 espécies de arvores, ervas e arbustos (LIMA, 2008), destacando-se *Croton rhamnifolioides*, mais conhecido como “quebra-faca”, sendo bastante utilizado na medicina popular para dores no estomago, mal-estar-gastrico, vômitos, entre outros, além de demonstrar também ação antimicrobiana (COSTA, 2013).

Segundo Cheng et al. (2003), resultados obtidos com óleos essenciais em sua LC 50 < 100 ppm apresentam-se ativos frente à larva de *Aedes aegypti* e resultados com LC 50 < 50 ppm, são considerados bastante ativos.

Os óleos essenciais se caracterizam por possuírem misturas complexas de substâncias voláteis, odoríferas, lipofílicas e líquidas, que são produzidas no metabolismo secundário das plantas aromáticas, sendo armazenadas em estruturas especializadas em secreção, podendo ocorrer nas folhas, cascas, sementes, madeira, flores e frutos (ONOFRE et al., 2008). Apresenta aparência oleosa à temperatura ambiente, aroma agradável e intenso, são solúveis em solventes orgânicos apolares, apresenta solubilidade limitada em água e grande volatilidade, o que o difere dos óleos fixos (BOURKE, 2008).

Apresentam aparência incolor ou amarelada, são instáveis, possuindo índice de refração, além de serem opticamente ativas, propriedades que podem ser usadas no seu controle da qualidade e na sua identificação (SIMÕES, 2004).

Tendo como função assegurar a adaptação da planta no meio ambiente, protegendo-a de predadores, perda hídrica e aumento de temperatura, o óleo essencial também pode ser utilizado como aromatizante em cosméticos, alimentos e produtos de limpeza industriais e na medicina alternativa, por causa das suas propriedades biológicas (ONOFRE et al., 2008).

Os fatores que influenciam na composição química do óleo essencial são a sazonalidade, a disponibilidade de água, o ciclo de crescimento da planta, a incidência de sol,

nutrientes presentes no solo, a poluição atmosférica, a altitude, ataques de patógenos, sua localização geográfica, o tempo de colheita e a obtenção do óleo (ONOFRE et al., 2008).

Outros fatores também podem influenciar na composição química dos óleos essenciais, como por exemplo, o local onde a planta se desenvolve, bem como o tipo de cultivo (VALBORMIDA et al., 2006).

Podemos obter os óleos essenciais através de vários processos, no entanto, algumas características são importantes, como a localização do óleo no vegetal, a quantidade e particularidades requeridas para o produto final. As técnicas utilizadas são a prensagem (vegetais ricos em óleo volátil e quando o óleo se localiza em tecidos periféricos), extração com solvente orgânico (matéria prima delicada, como por exemplo, pétalas de flores), extração com fluido supercrítico (quando há o interesse de determinar a fração de óleo) e destilação por arraste de vapor (para substâncias termoresistentes) (PRABUSEENIVASAN et al., 2006).

A técnica de destilação por arraste de vapor de água é a mais empregada a nível industrial, sendo a sua simplicidade uma característica bem marcante. A amostra extraída é colocada num recipiente onde passa uma corrente de vapor de água, podendo ser com ou sem pressão. Uma vez que o óleo possui pressão de vapor mais elevada que a água acaba sendo arrastada pelo vapor de água, onde a mistura de vapores é transportada a um condensador, sendo o óleo recolhido por um separador (RODRIGUES, 2002).

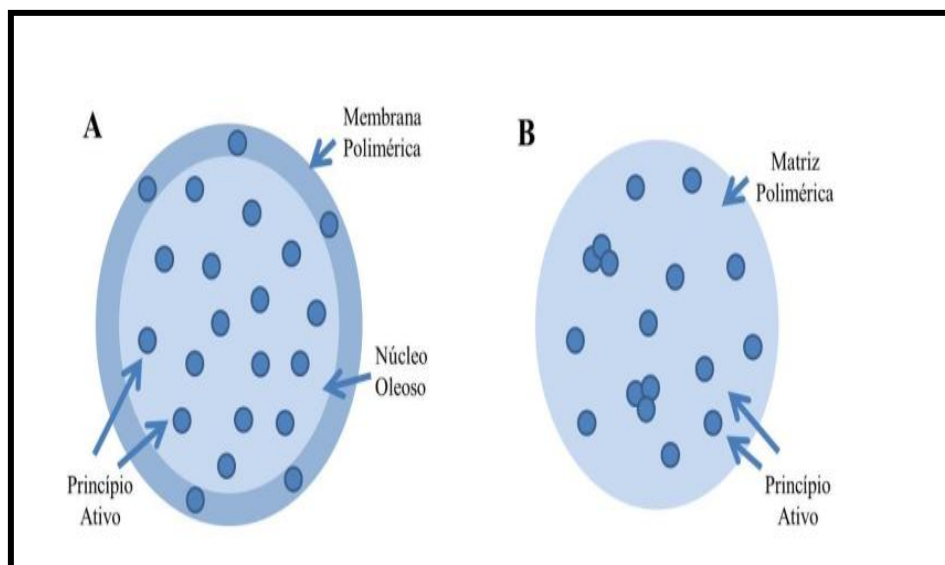
Porém, em escala laboratorial, o método mais utilizado é a hidrodestilação, a qual ocorre em um aparelho chamado Clevenger. Tal extração consiste em submergir a matéria prima diretamente na água e após a ebulição os componentes voláteis presentes no vegetal são carregados até o condensador, o qual se resfria e posteriormente são separados na água (MECHKOVSKI, 1992).

2.7 Sistemas de liberação controlada

Nas últimas décadas tem crescido o interesse no desenvolvimento da nanotecnologia, especialmente depois do avanço da microscopia eletrônica nos anos 80, após a chegada dos microscópios de varredura por sonda (KEIPER, 2003). A biotecnologia tem contribuído com a crescente pesquisa na nanotecnologia para o desenvolvimento de nanopartículas biodegradáveis, com o objetivo de obter a liberação controlada de substâncias ativas contidas em seu núcleo (SOPPIMATH et al., 2001). A nanotecnologia vem desempenhando importante papel em vários setores, tendo aplicações na área de biomedicina, engenharia, farmacologia, parasitologia e entomologia (BENELLI, 2018).

Definidas como partículas sólidas, as nanopartículas podem ser classificadas como nanocápsulas (NC) ou nanoesferas (NS). A substância pode estar encapsulada ou uniformemente dispersa em uma matriz (SOPPIMATH et al., 2001). De acordo com Azevedo (2008), as nanocápsulas (Figura 3A) se caracterizam por ser um sistema parecido a um reservatório onde o princípio ativo está englobado por uma membrana polimérica, quanto as nanoesferas (Figura 3B) são aquelas em que o princípio ativo encontra-se disperso de modo homogêneo no interior da matriz polimérica, não diferenciando o núcleo.

Figura 3 – Desenho esquemático de uma nanocápsula (A) e nanoesfera (B)



Fonte: Schaffazick, 2003.

Caracterizada pelo seu tamanho, as nanopartículas possui tamanho mínimo de cerca de 5-10 nm até no máximo 1000 nm, aproximadamente, entretanto o tamanho das nanopartículas obtidas mostra-se geralmente entre 100 e 500 nm (QUINTANAR et al., 1998). Contudo as nanocápsulas podem arrastar a substância ativas adsorvida em sua superfície ou empregada à parede polimérica (KHOEE & YAGHOBIAN, 2009). Sendo uma das vantagens das nanocápsulas sobre as nanoesferas, o baixo conteúdo polimérico e a elevada capacidade de carregamento de fármacos (BLOUZA et al., 2006).

Outra forma bastante estudada é a técnica da microencapsulação o qual consiste em sistemas de liberação que proporciona proteção a materiais instáveis e liberação lenta (BENITA, 2006). As microcapsulas constitui-se uma alternativa viável na veiculação de substância, devido à sua instabilidade e liberação controlada do princípio ativo (DINARVAND et al., 2003). A microencapsulação caracteriza-se por proporcionar a liberação constante de uma substancia por um período determinado, não necessitando de uma segunda aplicação. Em virtude disto, o uso de nano e micropartículas no controle de vetores em saúde

pública torna-se um método eficiente e eficaz, sendo comprovado em estudos os quais foram abordados como método de liberação controlada de princípios ativos para óleos essenciais (PENG, 2014) e medicamentos (VELLOSO, 2009).

Sendo utilizada na agricultura, a nanotecnologia desenvolve várias aplicações, principalmente no campo de pesticidas, fertilizantes e proteção de plantas (CHHIPA, 2017). Sendo encontrado na literatura relatos sobre formulações específicas para pesticidas, incluindo nanopartículas inorgânicas, nano-suspensão e nanoemulsão (ANJALI et al., 2010).

Possuindo uma vantagem em relação aos pesticidas tradicionais, uma vez que os nanopesticidas têm menor tamanho de partícula, com maior área superficial específica, o qual lhe torna melhor distribuído na superfície da lavoura, penetrando melhor nas pragas e bactérias, aumentando o efeito curativo mesmo em dosagens mais baixas (RAI et al., 2012; KAH et al., 2013; YU et al., 2017).

Diversos estudos que reportam sobre a liberação gradual dos princípios ativos, ressaltam a utilização de polímeros biodegradáveis (CHRISTOFOLI, 2014) e uma das fundamentais classes de polímeros biodegradáveis são os poliésteres alifáticos sintéticos, os quais englobam o poli- ϵ -caprolactona (PCL), que em contato com a água, sua degradação inicia pela hidrólise das ligações ésteres dando origem aos oligômeros ou monômeros solúveis e não tóxicos, o qual posteriormente venha a sofrer alguma ação de algum mecanismo biológico (BARBANTI et al., 2006).

Os estudos por alternativas que visam melhorar as características físico-químicas de substâncias ativas nos leva a descobertas de inovações tecnológicas como a nanotecnologia. Nanoesferas, nanoemulsões, nanocápsulas, bem como os demais materiais nanoestruturados são produtos de interesse atual. Tais sistemas coloidais estão sendo alvo de estudos importantes no que se refere à questão de aperfeiçoamento da liberação de substâncias em determinado local, operando como um sistema carregador de fármaco, proporcionando sua distribuição em locais específicos (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Uma vez que seu emprego em formulações tópicas garante a proteção da área afetada perante a toxicidade do ativo, livrando-o de possíveis reações de sensibilidade. Tal efeito protetor se deve à diminuição do contato direto do ativo com a região alvo, além de atribuir uma melhora nas propriedades físico-químicas de fármacos, promovendo assim um aumento no tempo de permanência do ativo, aparentando grande potencialidade (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

3 METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Pesquisa da Coordenação Acadêmica do Curso Técnico de Química Industrial do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco (IFPE) – *Campus* Recife, no Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica (LNFarm), do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (/LIKA-UFPE) da Universidade Federal de Pernambuco, no Laboratório de Biologia Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (DQF-UFPE) e no Laboratório de Serviço de Referência em Controle de Culicídeos Vetores (SRCCV) do CPqAM-Fiocruz/ PE na Universidade Federal de Pernambuco. As atividades constaram da extração do óleo essencial, identificação da composição do óleo essencial, produção de nanocápsulas contendo óleo essencial e determinação da atividade larvicida.

3.1 Coleta e armazenamento de material botânico

Croton rhamnifolioides foi coletada no município de Serra Talhada, localizado no sertão de Pernambuco, entre os meses de janeiro a março de 2017. Foi realizada a identificação botânica da planta pela professora Dra. Elba Ferraz, sendo uma exsicata depositada no Herbário Vasconcelos Sobrinho na Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob número de tombamento 49855. As folhas da planta foram separadas manualmente e posteriormente depositadas em recipientes (Figura 4), ficando três dias consecutivos para secar naturalmente, à sombra e sem incidência de luz solar. Uma vez secas, as folhas foram distribuídas em sacos plásticos e conservadas em refrigeração até o momento da sua utilização.

Figura 4- Folhas de *Croton rhamnifolioides*



Autoria: Ligia Sotero, 2017.

3.2 Extração do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides*

Para a extração de óleos essenciais foi utilizada a técnica da hidrodestilação, utilizando uma adaptação do sistema de Clevenger (Figura 5). As folhas secas foram cortadas para aumentar a superfície de contato. Em seguida, foram introduzidas em um balão de fundo redondo com capacidade de 5L, sendo adicionada posteriormente água destilada. O processo de extração ocorreu em duas horas, sob aquecimento em manta aquecedora Lucadema 5000. No condensador de bolas foi utilizada água refrigerada proveniente de uma unidade de refrigeração Biothec BT SOUR. O óleo foi separado em tubo de Dean Stark, seco em sulfato de sódio anidro e armazenado sob-refrigeração até o momento do uso (Figuras 6A e 6B).

Figura 5 - Sistema Clevenger modificado para extração de óleo essencial de *Croton rhamnifolioides*.



Autoria: Ligia Sotero, 2016.

Figura 6 – Óleo essencial extraído de *Croton rhamnifolioides*.



Autoria: Andréia Santos, 2016.

3.3 Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial

Os componentes do óleo essencial de *C. rhamnifolioides* foram quantificados e identificados através dos métodos de CG e CG-MS no Departamento de Química Fundamental da UFPE, utilizando um cromatógrafo a gás GC HP5890 Series II com detector de ionização de chamas e uma coluna capilar Ultra 1 (25mx0,32mmx0,52µm). Utilizando o hidrogênio como gás de arraste, as condições de programação foram de inicialmente 60 °C, variando 10 °C/minuto até 280 °C, mantida por 35 minutos. A temperatura do injetor foi de 200 °C e do detector de 290 °C. Utilizando-se um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas Finnigan GCQ Mat tipo quadrupolo-ion trap, 70 eV de energia de ionização e Coluna capilar DB5 (25mx32mmx0,52µm), para a identificação dos componentes do óleo essencial. O hélio foi utilizado como gás de arraste e as condições de programação foi inicialmente 60° C, variando 10° C/minuto até 275° C, mantida por 30 minutos. A temperatura do injetor foi de 250° C.

3.4 Produção das nanocápsulas

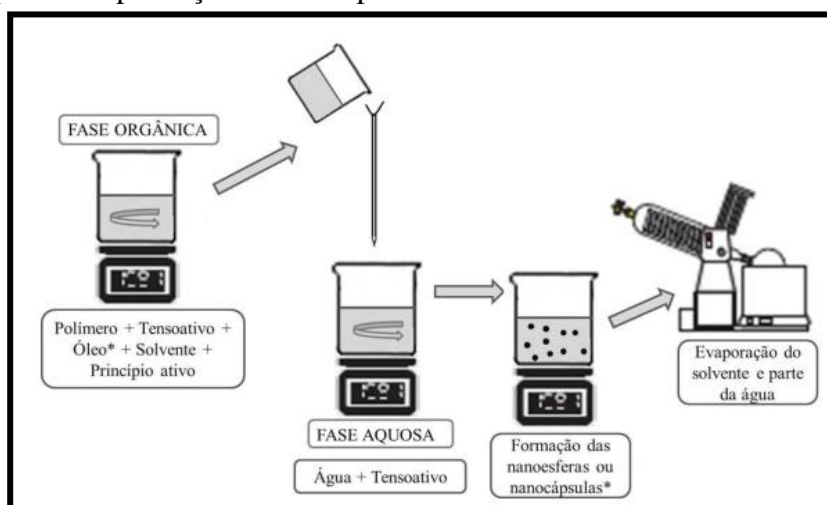
3.4.1 Reagentes

O Policaprolactona (PCL, MW~14000), span 80, tween 80 foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os solventes P.A. utilizados foram da Merck Millipore. O óleo essencial foi extraído da planta *Croton rhamnifolioides*.

3.4.2 Preparação das nanocápsulas

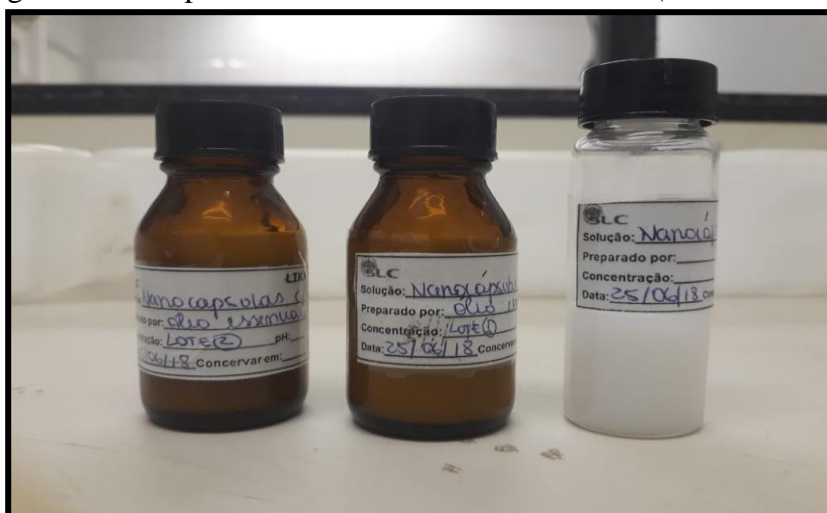
As nanocápsulas contendo o óleo essencial (NP-PCL/OE) foram preparadas segundo o método de deposição interfacial do polímero pré-formado conforme descrito por Flores et al (2011), com algumas modificações (Figura 7 e 8). Solubilizados, 50 mg de polímero (PCL), 77 mg de Span 80 e 100 mg de óleo essencial foram dissolvidos em 5 mL de acetona. Esta fase orgânica foi introduzida lentamente numa solução aquosa (10 mL) contendo o 77 mg de Tween 80, sob agitação magnética durante 10 min. Em seguida, a acetona foi removida por evaporação sob pressão reduzida para retirada do solvente. O volume final das formulações foi fixado em 10 mL para obter uma concentração final de óleo de 10 mg/mL (1%). As formulações sem o OE (NC-PCL) também foram preparadas.

Figura 7 – Esquema de produção das nanopartículas contendo o óleo essencial (NC-PCL/OE)



Fonte: Schaffazick, Guterres et al., 2003.

Figura 8 - Nanopartículas contendo o óleo essencial (NC-PCL/OE)



Autoria: Andréia Santos, 2018.

3.5 Caracterização das formulações contendo óleo essencial

3.5.1 Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

O diâmetro médio de partícula e o índice de polidispersão das nanocápsulas foram determinados no equipamento ZetasizerNano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, UK), utilizando a técnica de espectroscopia de autocorrelação de fótons (PCS), após diluição adequada da amostra em água ultrapura. O potencial zeta foi medido pela técnica de mobilidade eletroforética usando o mesmo aparelho a 25°C, após diluição da amostra em NaCl 10 Mm adequada da amostra.

3.5.2 Determinação do conteúdo de óleo nas nanocápsulas

O conteúdo de OE nas nanocápsulas foi determinado por duas técnicas: cromatografia líquida de alta performance (CLAE) e espectrofotometria de absorção no UV-Visível. Para quantificação uma curva padrão do OE foi preparada em acetonitrila em concentrações variando de 50 a 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para efetuar a quantificação do OE, uma curva analítica foi inicialmente preparada com concentrações variando de 50 a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente, estabeleceu-se correlação linear entre concentração, considerada variável independente (x), e relação entre as áreas dos picos cromatográficos do fármaco e do padrão interno, considerada variável dependente (y). A linearidade foi avaliada através de análise de regressão linear, utilizando ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LOQ) foram estimados de acordo com as diretrizes do ICH. O limite de detecção foi calculado através da fórmula: $\text{LD} = 3,3 (\sigma / I)$, e o limite de quantificação foi calculado através da fórmula: $\text{LQ} = 10 (\sigma / I)$, onde σ é o desvio padrão do intercepto com relação ao eixo dos Y e I é o valor da inclinação da curva analítica.

Quanto ao doseamento do óleo essencial nas nanocápsulas foi utilizado 0,1 mL da suspensão das nanocápsulas as quais foram solubilizadas em 5 ml de acetonitrila. A solução foi, posteriormente, submetida à sonicação por 5 min, filtrada em filtros Millex[®] (0,22 μm) e quantificada. Os experimentos foram realizados em triplicata. Para a eficiência da encapsulação do OE nas nanocápsulas foi empregado 0,4 mL da suspensão das nanocápsulas onde foram ultrafiltradas em filtros de filtrantes Microcon[®] (Millipore, Billerica, EUA) e submetidas a ultrafiltração associada com centrifugação a 10.000 rpm durante 1 h. A concentração de OE no ultrafiltrado foi determinada por CLAE e a eficiência de encapsulação (%) calculada pela diferença entre a concentração total do fármaco usada na preparação da formulação e a quantidade não encapsulada (livre no ultrafiltrado). Quanto as condições cromatográficas sua análise foi realizada em equipamento Alliance 2695 (Waters, EUA) acoplado a um detector de arranjos de diodos (PDA) 2998 (Waters, EUA), operado a 263 nm. Uma coluna de fase reversa C₁₈ (250 mm \times 4,6 mm, 5 mm, XBridge[™] Waters) protegida por uma pré-coluna da mesma composição (20 mm \times 4,6mm). A fase móvel foi composta por água: acetonitrila (20:80) (v/v). O fluxo utilizado foi de 1,5 mL/min a 30°C e um volume de injeção de 50 μL . Para as condições espectrofotométricas sua análise foi realizada em equipamento Ultrospec[®] 3000 pro (Amersham Biosciences, Alemanha) em um comprimento de onda de 236 nm a temperatura ambiente.

3.6 Determinação da atividade larvicida

Os testes larvicidas foram realizados de acordo com as recomendações do protocolo da OMS (OMS, 2006). As larvas de *Aedes aegypti* foram obtidas no Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (Universidade Federal de Pernambuco, Brasil). O ensaio biológico foi realizado em condições controladas, sendo larvas do terceiro estágio mantidas a $26 \pm 1^\circ \text{C}$ (Figura 9).

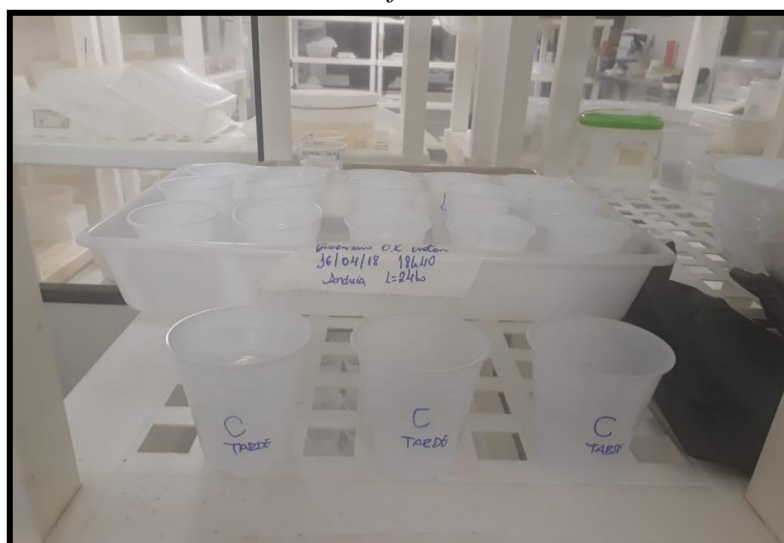
Figura 9 - Larvas de *Aedes aegypti* mantidas em temperatura controlada



Autoria: Andréia Santos, 2018.

Todas as experiências foram realizadas em triplicata com 20 larvas em cada amostra, utilizando 2g do óleo essencial para cada 14 ml de etanol para concentração com o óleo puro e PCL para as nanocápsulas (Figura 10).

Figura 10 - Bioensaio contendo diferentes concentrações com o óleo essencial de *C. rhamnifolioides*.



Autoria: Andréia Santos, 2018.

O controle negativo foi realizado com etanol na mesma concentração de amostras testadas (Figura 11). Os níveis de mortalidade foram registrados após 24 e 48 h de exposição. As larvas eram consideradas mortas quando não respondiam ao estímulo ou não emergiam à superfície da solução.

Figura 11 - Teste controle contendo etanol.



Autoria: Andréia Santos, 2018.

Para a realização dos testes larvicidas preliminares, preparou-se uma solução inicial com concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$ de emulsão do óleo essencial. Dissolvendo-se 50 mg da amostra de óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* puro em 3,5 mL de etanol, completando-se para 250 mL com água destilada. A partir da solução inicial, foram preparadas formulações com o óleo essencial em diferentes concentrações até obtenção dos probits os quais obtivemos os valores da Concentração Letal (CL_{50} e CL_{90}). Foram testadas amostras no intervalo de 2 a 160 $\mu\text{g/ml}$ com o objetivo de observar a faixa de concentração onde o composto é mais ativo. Para determinação da CL_{50} e CL_{90} , os valores foram tratados usando-se o software Probit com o programa estatístico SPSS for Windows versão 21.0 a um nível de confiança de 95%.

Foram realizados pré-testes com o intuito de encontrar o intervalo onde o composto obtivesse uma mortalidade crescente. Ao todo foram realizados 34 testes, com intervalo de concentrações que ficaram entre 2 e 160 $\mu\text{g/ml}$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os principais resultados obtidos com a presente pesquisa estão abaixo apresentados e discutidos em tópicos específicos, visando o cumprimento dos objetivos específicos estabelecidos para a presente pesquisa.

4.1 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

A partir das extrações realizadas com as folhas de *Croton rhamnifolioides* foram obtidos os seguintes teores de óleo essencial: 1,4% (w/w) para a primeira coleta e 0,58% (w/w) para a segunda coleta do material botânico. Estes valores foram calculados pela média dos teores apresentados nas Tabelas 1 e 2, comparáveis aos reportados anteriormente por Santos et al., (2014), para a mesma espécie do gênero *Croton*, que correspondeu a 0,80% e Carvalho et al., (2016), que correspondeu a 2,73% para *Croton tetradenius*.

Quando comparada a primeira amostra com a segunda, observou-se a partir da análise dos dados que houve uma diminuição na média dos teores de óleo essencial da segunda coleta. As variações nos teores de óleo essencial podem ser justificadas por diversos fatores, como por exemplo, o horário de coleta da amostra, a idade da planta, as condições climáticas entre outros parâmetros, uma vez que esses fatores influenciarão tanto o teor de óleo essencial como a composição química deste (KERROLA, 1994; FILHO, 2006).

Tabela 1- Teores de óleo essencial da primeira coleta de material botânico.

Amostras	Massa fresca (g)	Massa de óleo (g)	Teor de óleo (%)
1	249,8	3,5633	1,43
2	249,6	3,4496	1,38
3	249,4	3,1262	1,25
4	250,1	3,8713	1,55

Autoria: Lígia Sotero, 2017.

Tabela 2 - Teores de óleo essencial da segunda coleta de material botânico.

Amostras	Massa fresca (g)	Massa de óleo (g)	Teor de óleo (%)
1	250	1,3703	0,55
2	250	1,4526	0,58
3	250	1,6755	0,67
4	250	1,3601	0,54

Autoria: Lígia Sotero, 2017.

4.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *C. rhamnifolioides*

Os constituintes químicos do óleo essencial foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS). Após análise dos cromatogramas (Tabela 3), observou-se que os principais componentes do óleo essencial identificados foram o eucalyptol ou 1,8-cineol (16,57%) e o (E)-Caryophyllene (11,32 %), os quais apresentaram maiores porcentagens, perante os demais constituintes. Tais resultados estão de acordo com dados obtidos anteriormente na literatura para *Croton rhamnifolioides*, reportados por Santos et al. (2014) e Vidal et al. (2017), que verificaram porcentagem de eucalyptol de 7,24 e 18,32 %, respectivamente.

Tabela 3- Principais constituintes químicos do óleo essencial de *C. rhamnifolioides*.

Composto	RI Cal.	Ri. Lit.	A %	D.P.
tricyclene	918	921	0,27	0,01
α -thujene	924	924	1,55	0,04
α -pinene	930	932	4,34	0,11
camphene	944	946	1,39	0,03
Sabinene	971	969	6,84	0,15
β -myrcene	990	988	0,74	0,02
α-phellandrene	1002	1002	5,52	0,08
α -terpinene (trace)	1015	1014	0,01	0,00
o-cymene	1022	1022	6,69	0,01
eucalyptol	1028	1026	16,57	0,22
(E)- β -ocimene	1048	1044	0,38	0,03
γ -terpinene	1057	1054	0,19	0,03
cis-sabinene hydrate	1065	1065	0,20	0,02
terpinolene	1087	1086	0,11	0,01
trans-sabinene hydrate (trace)	1096	1098	0,01	0,00
linalool	1099	1095	1,39	0,02
cis-p-menth-2-en-1-ol (trace)	1120	1118	0,01	0,00
camphor	1142	1141	0,57	0,01
cis-chrysanthenol	1162	1160	0,30	0,04
borneol	1164	1165	0,40	0,01
terpinene-4-ol	1176	1174	0,60	0,01

Composto	RI Cal.	Ri. Lit.	A %	D.P.
α -terpineol	1190	1186	1,34	0,01
myrtenol	1194	1195	0,26	0,01
linalool acetate	1253	1254	0,17	0,03
cis-chrysanthylacetate	1261	1261	0,18	0,03
bornyl acetate	1285	1284	0,17	0,01
δ -elemene	1337	1335	2,35	0,05
α -copaene	1376	1374	0,11	0,01
β -bourbonene	1385	1387	0,29	0,01
β -elemene	1392	1389	3,30	0,03
cis- α -bergamotene (trace)	1415	1411	0,01	0,00
(E)-Caryophyllene	1420	1417	11,32	0,17
trans- α -bergamotene	1436	1432	0,16	0,01
α -humulene	1454	1452	2,27	0,04
allo-aromadendrene	1461	1458	1,34	0,03
γ -muurolene (trace)	1477	1478	0,01	0,00
germacrene D	1482	1480	1,07	0,01
β -selinene (trace)	1487	1489	0,01	0,00
bicyclogermacrene	1497	1500	2,80	0,06
germacrene A	1506	1508	0,32	0,00
sesquicineole	1514	1515	3,70	0,06
δ -cadinene	1524	1522	0,72	0,86
spathulenol	1578	1577	5,35	0,02
caryophyllene oxide	1584	1582	3,29	0,04
cis-beta-elemenone (trace)	1590	1589	0,01	0,00
ledol	1604	1602	1,39	0,04
humulenepoxide II (trace)	1610	1608	0,01	0,00
caryophylla- 4(12),8(13)-dien-5 α - ol	1634	1639	0,31	0,02
cadinol	1642	1638	4,77	0,07
α -muurolol	1647	1644	0,92	0,05
β -eudesmol	1652	1649	0,24	0,01

Composto	RI Cal.	Ri. Lit.	A %	D.P.
α -cadinol	1656	1652	0,25	0,01
germacra-4(15),5,10(14-trien-1- α -ol	1687	1685	0,24	0,01
shyobunol	1691	1688	0,21	0,02
Heptadecane	1699	1700	0,19	0,02
amorpha-4,9-dien-14-al	1704	1704	0,15	0,01
cedroxyde	1719	1713	0,18	0,01
eremophilone	1737	1734	0,36	0,03
Total			97,86	

Legenda: RI cal, RI lit, A%, D.P

4.3 PRODUÇÃO DAS NANOCÁPSULAS COM E SEM ÓLEO ESSENCIAL

Os resultados obtidos na caracterização das nanopartículas estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI), potencial Zeta, doseamento eficiência de encapsulação (EE %) determinado por cromatografia líquida de alta performance (CLAE) e espectrofotometria de absorção no UV-Visível (UV-Vis) nas nanocápsulas sem (NC-PCL) e com óleo essencial (NC-PCL/OE).

Formulação	Tamanho de partícula	PDI	Potencial Zeta (mV)	Doseamento (%)	EE % (CLAE)
NC-PCL	200,7 \pm 6,04 nm	0,160	-10,1 \pm 2,09	-	-
NC-PCL/OE	222,2 \pm 0,53 nm	0,116	-15,5 \pm 3,45	52,5 \pm 1,44	70,7 \pm 1,86

Autoria: Milena Ferraz, 2018.

As NC-PCL e NC-PCL/OE apresentaram um tamanho de 200,7 \pm 6,04 nm e 222,2 \pm 0,53 nm, respectivamente. Um aumento de cerca de 10% foi observado após a adição do óleo, provavelmente, devido a formação do núcleo oleoso na nanopartícula. Os valores de índice de polidispersão foram menores que 0,2 indicando a presença de populações monodispersas de partículas ou apresentando uma faixa estreita de distribuição do tamanho das partículas.

Os valores de potencial zeta das nanopartículas foram de -10,1 \pm 2,09 mV (NC-PCL) e -15,5 \pm 3,45mV (NC-PCL/OE), respectivamente. Estes resultados indicam uma boa estabilidade das formulações. O potencial zeta é um parâmetro que está relacionado à carga de superfície de partículas em suspensão e depende principalmente da natureza química do

polímero, da natureza química do agente estabilizante e do pH do meio. Quando as nanopartículas são preparadas a partir de polímeros de poliéster, são obtidos valores de potencial negativos devido à presença de grupos carboxílicos terminais do polímero.

A eficiência de encapsulação das nanocápsulas foi avaliada por CLAE e por espectrofotometria, nos quais foram observadas diferenças nos resultados quando comparados os dois métodos. A curva analítica utilizada para efetuar a quantificação do óleo essencial foi ajustada por análise de regressão linear, as quais estão apresentadas na Tabela 5.

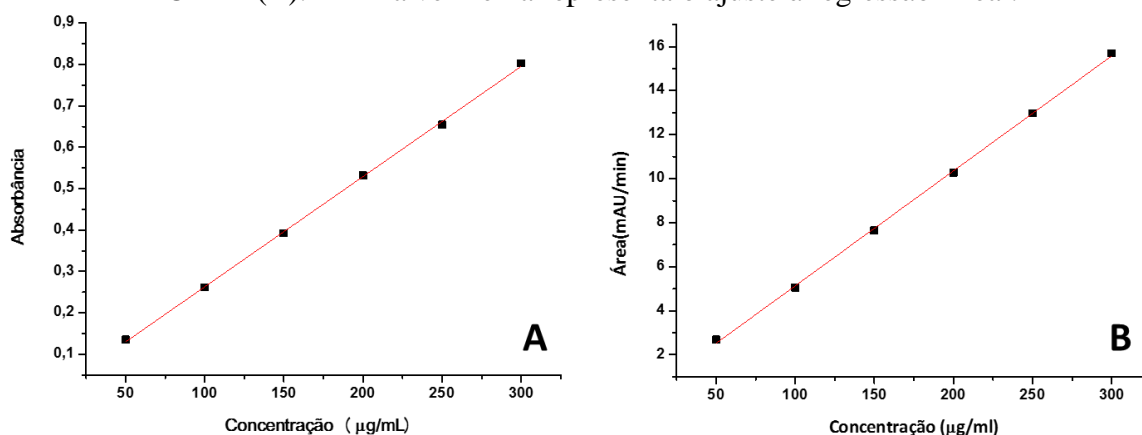
Tabela 5- Curva analítica do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* a 236 nm.

Concentração teórica de OE ($\mu\text{g/mL}$)	Valor da absorbância	Valor da Área OE (mAU/min)
50	0,135	2,69
100	0,262	5,05
150	0,392	7,65
200	0,532	10,27
250	0,654	12,97
300	0,802	15,69

Autoria: Milena Ferraz, 2018.

O método mostrou-se linear entre as concentrações de 50 a 300 $\mu\text{g/mL}$. A equação da regressão linear obtida foi $\gamma = -0,0024 + 0,0027 x$ por espectrofotometria e $\gamma = -0,088 + 0,052 x$, em que y é a absorbância ou área e x a concentração ($\mu\text{g/mL}$) em equivalentes de OE, respectivamente (Figura 12).

Figura 12 - Análise de regressão linear do óleo essencial por espectroscopia (A) e por CLAE (B). A linha vermelha representa o ajuste à regressão linear.



Autoria: Milena Ferraz, 2018.

O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9993, significando que 99,93% da variação total em torno da média é explicada pela regressão linear, comprovando a adequação do método ao intervalo avaliado. Os dados da análise de regressão são resumidos na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros do método espectrofotométrico e CLAE para a quantificação do óleo essencial (OE).

Parâmetros	Espectrofotometria	CLAE
Comprimento de onda de medição (nm)	236	236
Faixa linear ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	50-300	50-300
Intercepto \pm (desvio padrão)	-0,0024 (\pm 0,006)	-0,088 (\pm 0,118)
Inclinação \pm (desvio padrão)	0,0027 (\pm 0,00003)	0,052 (\pm 0,0006)
Coefficiente de correlação (r^2)	0,9993	0,9993
Limite de detecção, LD, ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	7,33	7,49
Limite de quantificação, LQ, ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	22,22	22,69

Autoria: Milena Ferraz, 2018.

A eficiência de encapsulação do OE nas nanocápsulas foi de $51,66 \pm 1,76$ % (espectrofotometria) e $32,78 \pm 1,56$ % (CLAE), o que equivale a uma concentração de fármaco na formulação de 5,17 mg/mL e 3,28 mg/mL, respectivamente. De acordo com estes resultados, sugere-se que o sistema ficou saturado pela grande quantidade de óleo (10mg/mL), com uma proporção polímero/OE de 1:2 (p/p). Além disso, ha uma volatilização natural do óleo essencial, que é intensificada com o processo de rotaevaporação.

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *C. rhamnifolioides*

Após uma série de extrações, foram obtidos 4 (quatro) lotes de óleo essencial, que, para uso nos testes larvicidas, foram identificados como Lote A (composto pela mistura dos óleos essenciais obtidos nas sete primeiras extrações), Lote B (composto pela junção dos óleos de outras quatro extrações), Lote C e Lote D (provenientes cada um de apenas uma extração). As misturas foram realizadas para uma maior uniformidade dos compostos existentes nos óleos essenciais.

Para os bioensaios larvicidas utilizando o óleo essencial puro, utilizou-se o Lote A e os resultados dos probits obtidos estão expresso na Tabela 7, apresentando um valor médio de \bar{X} $CL_{50} = 48,2$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ com uma variação de limite inferior e superior ($38,8$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ – $60,5$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) respectivamente, apresentando um valor médio de ± 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mais alto e 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ abaixo (Tabela 7), apresentando um valor médio de \bar{X} $CL_{50} = 48,2$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ com uma variação de limite

inferior e superior (38,8 $\mu\text{g/mL}$ – 60,5 $\mu\text{g/mL}$) respectivamente.

Tabela 7 – Valor da CL_{50} e CL_{90} dos bioensaios com o óleo puro lote A

	Estimativa ($\mu\text{g/mL}$)	Limite inferior	Limite superior	Leitura (h)
	44	43,3	44,5	24
CL_{50}	42,5	38,8	45,2	24
	58	55,9	60,5	24
Média (\bar{X})	48,2	Variação (38,8 $\mu\text{g/mL}$ – 60,5 $\mu\text{g/mL}$)		
	Estimativa ($\mu\text{g/mL}$)	Limite inferior	Limite superior	Leitura (h)
	48,7	47,6	50,2	24
CL_{90}	62,0	58,7	67,0	24
	71,3	67,6	76,4	24
Média (\bar{X})	60,7	Variação (47,6 $\mu\text{g/mL}$ – 76,4 $\mu\text{g/mL}$)		

Autoria: Andréia Santos, 2018

Quanto ao valor médio de, $\bar{X} CL_{90} = 60,7 \mu\text{g/mL}$, com variação de limite inferior e superior de 47,6 $\mu\text{g/mL}$ e 76,4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, observou-se-que quanto menor for o intervalo entre o limite inferior e o superior, maior será a segurança nos resultados obtidos. Os três testes com o óleo essencial das folhas de *C. rhamnifolioides* apresentaram resultados semelhantes indicando aumento na mortalidade de larvas do mosquito *A. aegypti* a medida que houve aumento na concentração do óleo, com relação aos controles.

Os quatro componentes majoritários do óleo foram α -phellandrene, eucalyptol (1,8 – cineol), (E)-Caryophyllene, Spathulenol. Estudos prévios realizados por Santos (2014) demonstram que o α -phellandrene revelou forte atividade frente as larvas de *A. aegypti* com um valor de CL_{50} de 39,3 $\mu\text{g/mL}$. Já o 1,8 – cineol não foi efetivo. De acordo com a literatura o (E)-Caryophyllene tem atividade larvicida de moderada a baixa (NAVARRO et al., 2014). Sugere-se que os dois principais componentes do óleo não estão diretamente responsáveis pela sua forte atividade larvicida. Porém o α -phellandrene mesmo em concentração mais baixa no óleo apresenta forte ação larvicida.

Na literatura é aceito que um óleo essencial é ativo contra as larvas de *A. aegypti* quando sua $CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ e fortemente ativo quando a CL_{50} for $< 50 \mu\text{g/mL}$ (NAVARRO, 2014). Desta forma, acredita-se que a alta atividade larvicida deste óleo não pode ser atribuída a um componente químico isolado, podendo estar vinculada a ação sinérgica dos seus componentes.

Para o Lote B, que corresponde a uma segunda amostra de mistura do óleo essencial de diferentes extrações, obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 8, com valor de \bar{X}

CL_{50} = 52,2 $\mu\text{g/mL}$, com variação de limite inferior e superior entre 45,0 $\mu\text{g/mL}$ e 62,0 $\mu\text{g/mL}$) e valor de \bar{X} CL_{90} = 68,7 $\mu\text{g/mL}$, com variação de limite inferior e superior entre 53,7 $\mu\text{g/mL}$ e 93,7 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 8 – Valor da CL_{50} e CL_{90} dos bioensaios com o óleo puro lote B

	Estimativa ($\mu\text{g/mL}$)	Limite inferior	Limite superior	Leitura (h)
CL_{50}	46,0	45,0	47,1	24
	58,3	55,2	62,0	24
Média (\bar{X})	52,2	Variação (45,0 $\mu\text{g/mL}$ – 62,0 $\mu\text{g/mL}$)		
	Estimativa ($\mu\text{g/mL}$)	Limite inferior	Limite superior	Leitura (h)
CL_{90}	55,7	53,7	58,8	24
	81,6	74,9	93,7	24
Média (\bar{X})	68,7	Variação (53,7 $\mu\text{g/mL}$ – 93,7 $\mu\text{g/mL}$)		

Autoria: Andreia Santos, 2018.

Para os resultados gerados nos bioensaios referentes ao Lote C (extração realizada em maio/2018), chegaram-se às seguintes conclusões: \bar{X} CL_{50} = 26,3 $\mu\text{g/mL}$ com uma variação mínima que vai de 20,2 $\mu\text{g/mL}$ a 30,8 $\mu\text{g/mL}$ e \bar{X} CL_{90} = 39,0 $\mu\text{g/mL}$ com variação mínima de 27,8 $\mu\text{g/mL}$ e máxima de 51,0 $\mu\text{g/mL}$, conforme Tabela 9.

Tabela 9 – Valor da CL_{50} e CL_{90} dos bioensaios com o óleo puro lote C

	Estimativa ($\mu\text{g/mL}$)	Limite inferior	Limite superior	Leitura (h)
CL_{50}	28,4	26,9	30,0	24
	21,7	20,2	23,1	24
	28,8	27,0	30,8	24
Média (\bar{X})	26,3	Variação (20,2 $\mu\text{g/mL}$ – 30,8 $\mu\text{g/mL}$)		
	Estimativa ($\mu\text{g/mL}$)	Limite inferior	Limite superior	Leitura (h)
CL_{90}	41,0	38,5	44,3	24
	30,0	27,8	32,3	24
	46,0	42,5	51,0	24
Média (\bar{X})	39,0	Variação (27,8 $\mu\text{g/mL}$ – 51,0 $\mu\text{g/mL}$)		

Autoria: Andréia Santos, 2018.

Para o Lote D (extração realizada em junho/2018), foram obtidos os valores de \bar{X} CL_{50} = 26,4 $\mu\text{g/mL}$, com variação correspondente de 23,5 $\mu\text{g/mL}$ a 29,9 $\mu\text{g/mL}$ e \bar{X} CL_{90} = 37,8 $\mu\text{g/mL}$, com variação inferior de 31,7 $\mu\text{g/mL}$ e superior de 46,1 $\mu\text{g/mL}$, conforme Tabela 10.

Tabela 10 – Valor da CL₅₀ e CL₉₀ dos bioensaios com o óleo puro lote D

	Estimativa (µg/mL)	Limite inferior	Limite superior	Leitura (h)
CL₅₀	25,1	23,5	26,6	24
	25,8	24,4	27,3	24
	28,3	26,7	29,9	24
Média (\bar{X})	26,4	Variação (23,5 µg/mL – 29,9 µg/mL)		
	Estimativa (µg/mL)	Limite inferior	Limite superior	Leitura (h)
CL₉₀	33,8	31,7	37	24
	37,3	34,8	40,8	24
	42,2	39,6	46,1	24
Média (\bar{X})	37,8	Variação (31,7 µg/mL – 46,1 µg/mL)		

Autoria: Andréia Santos, 2018.

Os valores obtidos para a CL₅₀ e a CL₉₀ dos óleos provenientes dos Lotes C e D foram semelhança entre si. Observou-se que as amostras de extrações mais recentes apresentaram uma maior mortalidade. Fazendo uma comparação entre as amostras dos lotes C e D, concluiu-se que as amostras mais recentes, com até 15 dias da data inicial de produção, apresentam resultados de bioensaios que demonstraram ser mais ativas do que as amostras dos bioensaios iniciais.

Para os bioensaios com as nanopartículas (NC-PCL/OE), utilizando os óleos provenientes do Lote A, obtiveram-se os seguintes valores: \bar{X} CL₅₀ = 63,4 µg/mL com variação de limite inferior e superior de (51,6 µg/mL – 74 µg/mL) e \bar{X} CL₉₀ = 104,8 µg/mL, com variação de limite inferior e superior de (84,5 µg/mL – 146,4 µg/mL), para concentrações na faixa de 40, 42, 43, 45, 46, 48, 50, 60, 70 e 80 µg/mL (Tabela 11).

Tabela 11 – Valor da CL₅₀ e CL₉₀ dos bioensaios com as nanopartículas lote A

	Estimativa (µg/mL)	Limite inferior	Limite superior	Leitura (h)
CL₅₀	66,3	60,5	74,0	48
	67,3	64,5	70,6	48
	56,7	51,6	62,3	72
Média (\bar{X})	63,4	Variação (51,6 µg/mL – 74,0 µg/mL)		
	Estimativa (µg/mL)	Limite inferior	Limite superior	Leitura (h)
CL₉₀	90	84,5	97,8	48
	121,4	106,5	146,4	48
	103,1	92,6	119,2	72
Média (\bar{X})	104,8	Variação (84,5 µg/mL – 146,4 µg/mL)		

Autoria: Andréia Santos, 2018.

Conforme a Tabela 11, foi observado que as larvas começaram a ter mortalidade a partir das 48h, porém, com este bioensaio utiliza o óleo essencial encapsulado, a atividade larvicida ficou mais baixa nestas primeiras 48h, quando comparada com os resultados obtidos no bioensaio utilizando o óleo essencial puro. Por esta razão, houve necessidade de estender o tempo dos testes para 72h, objetivando obter a efetividade da mortalidade, a qual já se obtinha com o óleo puro no período de 24h.

O mesmo comportamento foi constatado por Kanés (2011), ao utilizar o polímero sintético PCL na nanoencapsulação do óleo de copaíba, observando um retardo da liberação no período de 48h nos testes realizados. O mesmo sugere estudos residuais no período de 28 dias para que se possa ser detectado um perfil de mortalidade. Assim seria possível constatar se o óleo está sendo liberado de forma constante ou se a formação da membrana polimérica mais o óleo essencial impossibilitou a liberação do princípio ativo. Christofoli (2014) avaliando nanoesferas de PCL com óleo essencial de *Zanthoxylum rhoifolium* e *Z. riedelianum* obteve aproximadamente 81% e 80%, respectivamente, de difusão em 72 horas de ensaio.

Segundo Marques et al (2014), a diminuição na mortalidade pode ser ocasionada pelo efeito de repelência ou até mesmo pelas condições do inseto. Ainda de acordo com Martínez (2002), os insetos possuem quimiorreceptores nos tarsos, o que possibilita detectar a presença do óleo essencial. Fato este que pode ocasionar a inquietabilidade, que ao detectarem a presença de uma substância estranha, fazem com que não parem em um ponto fixo para se alimentar (YANG *et al.*, 2010), deduzindo assim, um efeito de repelência.

Esmeraldo (2016) demonstra uma variação de concentração na faixa de 10 a 1000 µg/mL, após encapsulação de bioprodutos, a fim de se estabelecer as concentrações letais (CL₅₀), valor ideal para ocasionar a mortalidade ou toxicidade à metade das larvas expostas aos testes, além de precisar de 5 dias para obtenção de mortalidade acima de 80%, confirmando assim sua atividade larvicida.

Kanés et al. (2011) demonstra que a utilização de gelatina possibilitou uma liberação mais rápida do óleo quando comparada a outros polímeros, fato que pode estar atribuído à espessura e integridade da partícula formada ao redor do princípio ativo. Outra variável a se levar em conta é o fato de que a gelatina por ser uma proteína faz parte da alimentação das larvas, circunstâncias que pode ter possibilitado a atividade larvicida.

Apesar das variáveis encontradas, o bioensaio com as nanopartículas contendo óleo essencial de *C. rhamnifolioides* apresentou uma boa mortalidade das larvas de *A. aegypti* na fase L3, semelhante aos testes realizados com o óleo puro.

De acordo com os bioensaios, não houve diferença em ambos os controles (nanocapsulas vazias e etanol), demonstrando assim que os produtos utilizados nas nanopartículas não interferiram na mortalidade das larvas. Os resultados dos ensaios com o óleo essencial e as nanopartículas contendo óleo essencial de folhas de *C. rhamnifolioides* foram significativos, uma vez que ambos tiveram mortalidade a medida que se aumentou a concentração. Porém, mesmo que as nanopartículas não tenham conseguido potencializar o efeito do óleo essencial em até 24h, o uso das mesmas pode ser justificado pela proteção que oferece ao ativo, ocasionando uma liberação gradual, da solubilidade em água sem a necessidade de adição de solventes, além de não ter a necessidade do contato do princípio ativo com o homem.

5 CONCLUSÃO

O desenvolvimento de produtos naturais é uma das alternativas eficazes no combate ao *Aedes aegypti*, graças ao sinergismo entre os ativos vegetais, que atuam de forma conjunta. Diante disso, foram observadas as seguintes conclusões para os bioensaios utilizando óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* perante o mosquito *Aedes aegypti*.

Para os bioensaios com o óleo puro se obteve os valores para CL_{50} que variaram de 26,3 $\mu\text{g/mL}$ a 52,2 $\mu\text{g/mL}$ e CL_{90} variando de 37,8 $\mu\text{g/mL}$ a 68,7 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando que o óleo puro é considerado fortemente ativo ($CL_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$) contra as larvas de *A. aegypti*. Sugerindo desta forma que o óleo dessa espécie vegetal pode ser uma alternativa no combate ao vetor da dengue, diminuindo o impacto sobre o ambiente e a saúde da população, no entanto, são necessários estudos mais aprofundados, uma vez que o óleo apresenta diversas variáveis, entre elas, a idade da planta, o horário de coleta, fatores climáticos, volatilização do óleo, produção do óleo e o tempo hábil para utilização do mesmo, conservação do óleo, que precisam ser controladas.

Quanto à nanopartículas testadas, foi observada uma mortalidade após 48h, com valor para CL_{50} de 63,4 $\mu\text{g/mL}$ e CL_{90} de 104,8 $\mu\text{g/mL}$, atingindo um grau de mortalidade moderadamente ativo, uma vez que na literatura se aceita que um óleo essencial é ativo contra as larvas de *A. aegypti* quando sua $CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ e fortemente ativo quando a sua CL_{50} for $< 50 \mu\text{g/mL}$. Os resultados apresentados demonstram que as formulações apresentaram atividade mais baixa àquela observada para o óleo puro. Este comportamento pode ser atribuído à encapsulação do óleo de *C. rhamnifolioides*, necessitando também de estudos mais profundos no método de encapsulação do óleo utilizando-se polímeros sintéticos, para que se possa determinar um perfil de liberação mais adequada do princípio ativo.

No que se refere à diferença entre os dois métodos utilizados na nanoencapsulação, sugere-se realizar um ensaio de exatidão para verificar possíveis interferentes nos excipientes das formulações, bem como retenções na coluna cromatográfica, com uma possível troca de coluna do HPLC.

Os resultados demonstraram que existe a possibilidade de nanoencapsular o óleo de *Croton rhamnifolioides* para aplicação como larvicida.

Contudo, a prática de medidas de controle deve estar sempre ligada a uma campanha de esclarecimento à população, informando-os da importância do papel de cada um deles no combate a esse mosquito, destruindo criadouros existentes, evitando assim, sua proliferação.

Diante do exposto, é cabível investir o desenvolvimento de um produto a base de óleos essenciais de *C. rhamnifolioides*, empregando nanotecnologia para o controle da liberação e prolongamento da ação do ativo, como já ocorre com diversos fármacos, aumentando assim sua estabilidade e reduzindo a toxicidade.

REFERÊNCIAS

ALVES, H.M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**: 10-15, 2001.

ANJALI, C.H.; SUDHEER KHAN, S.; MARGULIS-GOSHEN, K.; MAGDASSI, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Formulation of water-dispersible nanopermethrin for larvicidal applications. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 73:1932–1936, 2010.

AZEVEDO, M. M. M. **Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos**. Monografia, Laboratório de Química d Estado Sólido, UNICAMP, 2008. Disponível em: <http://lqes.iqm.unicamp.br>. Acesso em: 10 set. 2018.

BARRETO, C. F. *Aedes aegypti* - resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos, Goiás**, v. 1, n. 2, p. 62-73. 2005. ISSN 1808-8597. Disponível em: <http://docplayer.com.br/115330-Aedesaegypti-resistencia-aos-inseticidas-quimicos-e-as-novas-alternativas-de-controle.html>. Acesso em: 21 jul. 2016.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Degradação acelerada de suportes poli-ε-caprolactona e poli(D,L,-ácido láctico-co-ácido glicólico) em meio alcalino. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.6, p.141-148, 2006.

BBC. Doenças ambientais matam 233 mil por ano no Brasil. Disponível em: http://www.bbc.com/portuguese/reporterbbc/story/2007/06/070613_oms_doencas_pu.shtml. Acesso em: 10 jan. 2018.

BENITA, S. *Microencapsulation: Methods and industrial applications*. 2.ed. Jerusalem: Culinary and Hospitality Industry Publications Services (C.H.I.P.S.), p.784, 2005.

BENELLI, G. Plant-borne compounds and nanoparticles: challenges for medicine, parasitology and entomology. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25:10149–10150, doi: 10.1007/s11356017-9960-y, 2018.

BLOUZA, I. L.; CHARCOSSET, C.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for pediatric use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, p. 124-131, 2006.

BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência, **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279-293, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Subsídios para construção da Política Nacional de Saúde Ambiental. Brasília; 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política nacional de saúde ambiental para o setor saúde. Brasília: Secretaria de Políticas de Saúde,1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de 24 Agravos de Notificação (SINAN). Brasília. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde 2014. Larvicidas. <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/control-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas/larvicidas>. Acesso em: 05 fev. 2019.

BRASIL Lei Nº 6.938, de 31 de agosto de 1981. Dispõe sobre a Política nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Legislativo, Brasília, DF, 02 nov, 1981.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente, CONAMA. Resolução nº 306 de 5 de julho de 2002. Lex: Coletânea de Legislação de direito ambiental. São Paulo: Revista dos tribunais, 4 ed. Jan. 2005b.

BRASIL. Ministério da Saúde (2011). Portaria GM/MS Nº 104, de 25 de janeiro de 2011. **Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme o disposto no Regulamento Sanitário Internacional**. 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelece fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos Profissionais e serviços de saúde. Diário Oficial da União, 26 jan. 2011.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Brasília (DF). 2002. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pncd_2002.pdf. Acesso em: 12 ago. 2016b.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. Disponível em: Controle de vetores. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/vigilancia-em-saude/emergencia-em-saude-publica>. Acesso em: 02 fev. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento do período Sazonal da Febre Amarela. Brasil – 2017/2018. Informe número 20. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/abril/05/Informe-FA-20-4abr18-nc2.pdf>. Acesso em: 13 maio. 2018.

COSTA, A.C.V.; COSTA, J.G.M.; JUNIOR, F.G.; MADRUGA, M.S.; MELO, G.F.A.; NETO, V.Q. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of a *Croton rhamnifolioides* leaves Pax & Hoffm. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 2853-2864, 2013.

CECHINEL, F. V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

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**, v.89, p.99-102, 2003.

CHIARELLA, J. M. Vacina da dengue: um desafio nacional. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 18, n. 2, p. 123-124, 2016.

CHHIPA, H. Nanofertilizers and nanopesticides for agriculture. *Environ. Chem. Lett.* 15:15–22, 2017.

- CHRISTOFOLI, M. Efeito dos óleos essenciais de *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum riedelianum* nanoencapsulados em *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B. Dissertação de Mestrado, Programa de pós Graduação em Ciências Agrárias, IF Goiano campus Rio Verde, 2014.
- DANIEL, L.A.; BRANDÃO, C.S.S.; GUIMARÃES, J.R.; LIBÂNIO, M.; DE LUCA, S. Processos de desinfecção e desinfetantes alternativos na produção de água potável. Rio de Janeiro: RiMa, ABES, 2001.
- DINARVAND, R.; RAHMANI, E.; FARBOD, E. Gelatin microspheres for the controlled release of all-trans-retinoic acid topical formulation and drug delivery evaluation. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.2, n.1, p.47-50, 2003.
- DIAS, C.N.; MORAES, D.F.C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. **Parasitology Research**, v. 113, p. 565–592, doi: 10.1007/s00436-013-3687-6, 2014.
- DUTRA, H. L. C. et al. Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Cell Host & Microbe**; v. 19, n. 6, p. 771–774, 2016.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N. E.; BENITA, S. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v.55, p.1-4, 1989.
- FIOCRUZ. Dengue. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/oportunista.html>. Acesso em: 05 de jun. 2017.
- FIOCRUZ. Dengue. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/oportunista.html>. Acesso em: 20 de fev. 2018.
- FILHO, J.L.S.C.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; EHLERT, P.A.D.; MELO, A.S.; CAVALCANTI, S.C.H.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; SILVA-MANN, R. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 1, p. 26-30, 2006.
- FLORES, F. C. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Quimica Nova**, v. 34, p. 968-972, 2011.
- GARCIA, G. A. Dinâmica da resistência a inseticidas de populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) de quatro regiões do Brasil. 2012. 140 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária), Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2012.
- GOSSNER, C. M. et al. Increased risk of yellow fever infections among unvaccinated European travellers due to ongoing outbreak in Brazil, July 2017 to March 2018. **Euro surveillance**; v. 23, n. 11, 2018.
- GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n.1, p.91-97, 2008.

GUILHERMINO, J. F.; GUERRERO, A. T. G.; ALMEIDA, F. S.; GRILLO, Z. Del C.F. A Ciência no uso de produtos naturais para controle do vetor do vírus Zika (ZIKV). **Revista Fitos Eletrônica/FIOCRUZ**, v. 10, n. 1, 2016.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. **Drug Target Insights**, v.2, n.147, 2007.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday. **Molecular Aspect of Medicine**, n. 27, p. 1-93, 2006.

GRUPO ETC (Action Group on Erosion Technology and Concentration). PEDROZO, J. F.; BORGHETTI, F. Nanotecnologia os riscos da tecnologia do futuro. **L&PM**, 2005.

JINTANA, Y.; SAOWANEE, C.; NONGKRAN, L.; PRADYA, S. Insecticides resistance in the *Culex quinquefasciatus* populations from northern Thailand and possible resistance mechanisms. **Acta Tropica**, v.149, p.232-7, 2015.

KANIS, L. A.; PROPHIRO, J.S.; GUERREIRO, K.; CLEMES, I.; SILVA, O. S.; VIEIRA, E. S.; NASCIMENTO, M. P.; ZEPON, K. M. Larvicidal activity of *Copaifera* sp. (Leguminosae) oleoresin microcapsules against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Parasitology Research** (1987. Print), v. 108, p. 1-8, 2011.

KAH, M.; BEULKE, S.; TIEDE, K.; HOFMANN, T. Nanopesticides: state of knowledge, environmental fate, and exposure modeling. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 43:1823–1867. 2013.

KEIPER, A. The nanotechnology revolution. **New Atlantis Spring**. v. 17, p. 34, 2003.

KERROLA, K.; GALAMBOSI, B.; KALLIO, H. Volatile Components and Odor Intensity of Four Phenotypes of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 775-781, 1994.

KHOEE, S.; YAGHOUBIAN, M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 6, p. 2392-2399, 2009.

LEÃO, R.B.A.; FERREIRA, M.R.C.; JARDIM, M.A.G. Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 1, p. 21-25, 2007.

LIMA, L.R.; PIRANI, J.R. Taxonomic revision of *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotrop**, v. 8, p. 177–231, 2008.

LOPES, C.R. et al. Folhas de chá. Viçosa: UFV, 2005.

LYRA, T. M. **A Política de Saúde Ambiental do Recife, em 2001 e 2002: uma análise a partir do Programa de Saúde Ambiental**. 2009. 300 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2009.

- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, J.V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.
- MARQUES, M. A.; QUINTELA, E. D.; MASCARIN, G. M.; FERNANDES, P. M.; ARTHUS, S. P. Management of *Bemisia tabaci* biotype B with botanical and mineral oils. **Crop Protection**, 66: 127-132, 2014.
- MARTINEZ, S. S. Ação do nim *Azadirachta indica* – natureza, usos múltiplos, produção. Instituto Agrônômico do Paraná, IAPAR, Londrina, PR, p.31-57, 2002.
- MECHKOVSKI, A.; AKERELE, C.O. Quality control methods for medicinal plant materials. Switzerland: World Health Organization, 1992.
- MILENA, A. E. Bioprodutos derivados de biomassa vegetal no combate ao mosquito transmissor da dengue - *Aedes aegypti*. Fortaleza, 2016. 118f. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia em recursos naturais). Pontifícia Universidade Federal do Ceará, 2016.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Conselho Nacional de Saúde. Subsídios para construção da Política Nacional de Saúde Ambiental / Ministério da Saúde, Conselho Nacional de Saúde. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde – (Série B. Textos Básicos de Saúde). p. 56, 2007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Controle de vetores/inseticidas e larvicidas. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/controle-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas/larvicidas>. Acesso em: 23 nov. 2018.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113–142, 2010.
- MORGAN, R. Enciclopédia das ervas e plantas medicinais. Ed. Hemus, São Paulo, p.555, 1994.
- NATRAJAN, D. et al. Formulation of essential oil-loaded chitosan-alginate nanocapsules. **Journal of food and drug analysis**, v.23, p. 560-568, 2015.
- NAVARRO, D.M.A.F.; SILVA, C.S.B.; SILVA, M.F.R.; NAPOLEÃO, T.H.; PAIVA, P.M.G. Larvicidal Activity of Plant and Algae Extracts, Essential Oils and Isolated Chemical Constituents against *Aedes aegypti*. **The Natural Products Journal**, v. 3, p. 268-291, 2013.
- NAVARRO, D.M.A.F.; SILVA, P.C.B.; SILVA, M.F.R.; NAPOLEAO, T.H.; PAIVA, P.M.G. Larvicidal activity of plant and algae extracts, essential oils and isolated chemical constituents against *Aedes aegypti*. **Journal of Natural Products**, v.3, p.268–291, 2014.
- ONOFRE, S.B.; FABIANE, K.C.; FERRONATTO, R.; SANTOS, A.C. Physicochemical characteristics of the essential oils of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 197-203, 2008.
- OMS. Guidelines for Drinking Water Quality. Geneva, 2000.
- OMS. Pesticide and Their Application. For the Control of Vectors and Pests of Public Health Importance. **Geneva, Switzerland**. WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.

OMS. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/69101.2005>. Acesso em: 20 fev. 2018.

PAUMGARTTEN, F.J.R. Avaliação de risco de substâncias químicas: O elo entre a toxicologia e a saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 9, p. 439-447, 1993.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, J.; IGNACIMUTHU, S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 39, n. 6, 2006.

PENG, C.; ZHAO, S-Q.; ZHANG, J.; HUANG, GY.; CHEN, L.Y.; ZHAO, F-Y. Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of Mustard (*Sinapis alba*) seed essential oil by complex coacervation. **Food Chemistry**, v. 165, p. 560-568, 2014.

POLANCZYK, R.A.; GARCIA, M.O.; ALVES, S.B. Potencial de *Bacillus thuringiensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, p.813-816, 2003.

QUINTANAR, D.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p.1113–1128, 1998.

RAI, M.; INGLE, A. Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. **Applied Microbiology and Biotechnology** 94:287–293, 2012.

RAMOS, R.R. **Saúde Ambiental: uma proposta interdisciplinar**. 2013. 85 f. Artigo (Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar em Meio Ambiente) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, 2013.

RODRIGUES, M.R.A. Estudo dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano. 2002. 163f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

ROSE, R.I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. **Emerging Infectious Diseases journal**, v.7, n. 1, p.17-23, 2001.

ROZENDAAL, J.A. Vector control methods for use by individuals and communities. **Geneve: World Health Organization**; 1997.

SANTOS, A. G. S. et al. Plantas medicinais comercializadas em mercados públicos na região metropolitana do Recife – PE: influência do modo de conservação na composição química do óleo essencial. **Revista HOLOS**, v. 1. p. 36-48, 2015.

SANTOS, G.K.N.; DUTRA, K.A.; LIRA, C.S.; LIMA, B.N.; NAPOLEÃO, T.H.; PAIVA, P.M.G.; MARANHÃO, C.A.; BRANDÃO, S.S.F.; NAVARRO, D.M.A.F. Effects of *Croton rhamnifolioides* essential oil on *Aedes aegypti* oviposition, larval toxicity and trypsin activity. **Molecules**, v.19, p. 16573-16587, 2014.

SANTOS, A.L.; RIGOTTO, R.M. Território e territorialização: incorporando as relações produção, trabalho, ambiente e saúde na atenção básica à saúde. **Trab educ saúde**. 2010-

2011;8(3):387-406. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/tes/v8n3/03.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2018.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. **Química Nova**, v. 26, p.726. 2003.

SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC, cap. 15. 2000.

SILVA, I.G.; ZANON, V.O.M.; SILVA, H.H.G. Larvicidal Activity of *Copaifera reticulata* Ducke Oil-Resin against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, p.729-732, 2003.

SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G.; SANTOS, R.M.G.; FILHO, E.R.; ELIAS, C.N. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 396-399, 2004.

SIMAS, N.K.; LIMA, E.C.; CONCEIÇÃO, S.R.; KUSTER, R.M.; FILHO, AM.O. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myrozylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**, v. 27, p.46-49, 2004.

SIMÕES, C.M.; SPITZEER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed.Porto Alegre: UFSC, 2004.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v.70, p.1–20, 2001.

TORRES, C. M. M. **Avaliação do biolarvicida spinosad sobre a atratividade de *Aedes aegypti* (diptera: culicidae), viabilidade dos ovos e persistência em armadilhas de oviposição**. 2014. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2014.

VALMORBIDA, J.; BOARO, C.F.S.; MARQUES, M.O.M.; FERRI, A.F. Rendimento e composição química de óleos essenciais de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes concentrações de potássio. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 56-61, 2006.

VELLOSO, F.T.; FERRAZ, R.S.; LIRA, A.A.M.; SANTANA, D.P.; MAGALHÃES, N.S.S. Desenvolvimento e validação de método analítico em CLAE-UV para quantificação de ácido retinóico em microcápsulas de alginato de quitosana. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 177-183, 2009.

VIDAL, C.S.; MARTINS, A.O.B.P.B.; SILVA, A.A.; OLIVEIRA, M.R.C.; RIBEIRO-FILHO, J.; ALBUQUERQUE, T.R.; COUTINHO, H.D.M.; ALMEIDA, J.R.G.S.; JUNIOR, L.J.Q.; MENEZES, I.R.A. Gastroprotective effect and mechanism of action of Croton rhamnifolioides essential oil in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 47-55, 2017.

YANG, N.W.; LI, A.L.; WAN, F.H.; LIU, W.X.; JOHNSON, D. Effects of plant essential oils on immature and adult sweetpotato whitefly, Bemisia tabaci biotype B. **Crop Protection**, v.29, p. 1200-1207, 2010.

YU, M.; YAO, J.; LIANG, J.; ZENG, Z.; CUI, B.; ZHAO, X.; SUN, C.; WANG, Y.; LIU, G.; CUI, H. Development of functionalized abamectin poly(lactic acid) nanoparticles with regulatable adhesion to enhance foliar retention. *RSC Adv.* 7:11271–11280, 2017.