

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Melaleuca alternifolia E SUA FORMULAÇÃO EM NANOCÁPSULAS
POLIMÉRICAS**

VINÍCIUS COUTO PIRES

Salvador - Bahia

2019

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Melaleuca alternifolia E SUA FORMULAÇÃO EM NANOCÁPSULAS
POLIMÉRICAS**

VINÍCIUS COUTO PIRES

Orientador: Dr. Fabio Rocha Formiga

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do grau de Mestre.

**Salvador – Bahia
2018**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Pires, Vinícius Couto.

P667A Avaliação do potencial larvicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e sua formulação em nanocápsulas poliméricas. / Vinícius Couto Pires. - 2019.
107 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rocha Formiga, Laboratório de Doenças
Infecciosas Transmitidas por Vetores.

Dissertação (Mestrado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa)
Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

1. Arboviroses. 2. *Aedes aegypti*. 3. *Melaleuca.alternifolia*. 4. Larvicida.
5. Produtos naturais. 6. Nanotecnologia. I. Título.

CDU 616.91:615.28

" AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA
ALTERNIFOLIA E SUA FORMULAÇÃO EM NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS."

VINICIUS COUTO PIRES

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 21 de fevereiro de 2019.


COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Elaine Christine de Magalhães Cabral
Albuquerque
Professora Associado I
UFBA



Dr. Eudes da Silva Vellozo
Professor Associado II
UFBA



Dr. Daniel Pereira Bezerra
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

CNPq

FAPESB

AGRADECIMENTOS

Existem alguns nomes que tenho a grata obrigação de registrar. O primeiro Nome, aqui e sempre, é YAHWEH, meu Deus, você pode não acreditar nEle, mas sem Ele, com certeza isso aqui não estaria pronto, a Ele sempre Honra e Glória mesmo nesse pequeno estudo. Ao senhor Décio Vieira Pires e à senhora Maria de Fátima Couto Pires, meus amados pais, apoio e consolo inestimáveis, vocês entregaram tanto por mim todos esses anos que essa homenagem parece pequena demais, mas obrigado. Minha amada esposa, Marta Couto Pires, agradeço pela paciência, incentivo nos momentos de desencanto (para não dizer desespero) e correções textuais do meu português medíocre, essa conquista é nossa. Minhas tias, Silvana Pires e Solange Maria, sempre haverá espaço para demonstrar minha gratidão à vocês.

Tecnicamente, registro meus agradecimentos ao Dr. Fábio Formiga pelo projeto, ao Dr. José Carlos Miranda por fornecer tão atenciosamente os ovos de *Aedes aegypti*, ao Dr. Paulo Mesquita pelas árduas horas nas análises por cromatografia gasosa, a Dra. Elaine Albuquerque por me indicar um espectrofotômetro e a doutoranda Luciana Toralles pelas instruções no uso, isso com certeza me tirou de uma bela enrascada, à Dra. Adriana Lanfredi Rangel e Dra. Maria Lúcia Vieira Moreno pelo auxílio tão bem-humorado nas análises de microscopia eletrônica, à Arlene Souza Lessa por aturar meus constantes agendamentos e ainda assim me ajudar nas preparações de amostras, ao mestre Valdinei Martins pelo treinamento com o *Zeta Sizer analyser*, a Pedro Brito e Myla Lôbo, os melhores professores de cultura de células. Meus agradecimentos a Ana Maria Fiscina, bibliotecária da Fiocruz.

Esses anos no Instituto de Gonçalo Moniz me proporcionaram conhecer pessoas muito queridas que, das mais diversas maneiras, foram suportes nesse cansativo capítulo da minha história, quero agradecer a Carla Magalhães Pires, Mariana Ivo Khuri, Cibele Tereza Deolinda Machado Orge (sim, é uma pessoa só), Luiza Reis Pedrosa, Kercia Pinheiro Cruz e, em especial, Noélia J. B.Santos.

“Deus não dá ponto sem nó.”

(Ailton Fonseca)

PIRES, Vinícius Couto. Avaliação do potencial larvicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e sua formulação em nanocápsulas poliméricas. 2019. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Dengue, febre chikungunya e febre por Zika vírus representam as arboviroses de maior carga no Brasil, onde o *Aedes aegypti* é o principal vetor de transmissão viral. A principal abordagem de prevenção dessas arboviroses é o controle da população de mosquitos adultos. Estudos fitoquímicos têm demonstrado o potencial de óleos essenciais como larvicidas, sendo uma alternativa promissora de combate ao *A. aegypti*. Contudo, estes óleos apresentam limitações de solubilidade em meio aquoso e tendem a perder atividade após períodos de exposição à radiação solar. Visando superar tais limitações, a encapsulação de frações oleosas em nanocápsulas poliméricas deve permitir o aumento do tempo de vida útil dos compostos bioativos, garantindo, assim, sua bioatividade e ação larvicida. **OBJETIVO:** Este trabalho busca desenvolver nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* como nanolarvicida contra o *Aedes aegypti*. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Inicialmente, o óleo de *M. alternifolia* foi caracterizado por cromatografia gasosa. Nanocápsulas foram produzidas pelo método de nanoprecipitação e caracterizadas quanto ao tamanho, polidispersão, potencial de superfície, morfologia e eficiência de encapsulação. A estabilidade físico-química das nanosuspensões armazenadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ foi avaliada pelo monitoramento do tamanho de partícula, pH, condutividade elétrica e turbidez durante 90 dias. Ensaios colorimétricos de viabilidade celular (Alamar Blue) foram realizados para caracterizar o efeito citotóxico do óleo essencial em macrófagos J774 e queratinócitos da linhagem HaCat. A atividade larvicida do óleo livre (emulsionado em Tween 80) e nanoencapsulado foi determinada através de bioensaios de acordo com a metodologia preconizada pela OMS. **RESULTADOS:** Na caracterização do óleo, foram identificados 20 compostos voláteis - sendo terpinen-4-ol o composto majoritário. Com relação ao efeito larvicida do óleo, observou-se que partir de 100 ppm todas as larvas expostas morreram, sendo possível determinar a doses letais em 24 horas ($\text{LC}_{50}=69,374$ ppm; $\text{LC}_{90}=101,56$ ppm) e em 48 horas ($\text{LC}_{50}=68,325$ ppm; $\text{LC}_{90}=98,908$ ppm). Nos ensaios de citotoxicidade, não houve redução significativa da viabilidade de macrófagos e queratinócitos em concentrações próximas ao LC_{90} do óleo contra larvas de *A. aegypti*. As nanocápsulas contendo o óleo de *M. alternifolia* apresentaram-se esféricas, com tamanho médio de 172,4 nm, PDI 0,1 e potencial zeta -26,35 mV. No processo de nanoprecipitação houve uma perda de 29% na massa de óleo e a eficiência de encapsulação em relação ao óleo presente na formulação foi de 90%. Durante 60 dias de armazenamento, as nanosuspensões mantiveram seu aspecto visual, sem evidências macroscópicas de fenômenos de instabilidade física. Neste período, não foram observadas variações nos valores de turbidez e tamanho de partícula. As nanocápsulas prolongaram o tempo de vida útil do óleo após formulação e apresentaram efeito inseticida de ação moderadamente lenta, com LC_{50} 564,9 ppm em 48 horas. **CONCLUSÃO:** Este trabalho demonstrou o potencial larvicida do óleo de *M. alternifolia*, o qual pôde ser formulado em nanocápsulas poliméricas, cujo incremento da atividade larvicida poderá ser alvo de futura investigação.

Palavras-Chave: Arboviroses; *Aedes Aegypti*; Larvicidas; Produtos naturais; Nanobiotecnologia.

PIRES, Evaluation of the larvicidal potential of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its formulation in polymeric nanocapsules. 2019. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Dengue fever, chikungunya fever and Zika virus represent the most heavily loaded arboviruses in Brazil, where *Aedes aegypti* is the main vector of viral transmission. The main approach to prevention of these arboviruses is adult mosquito population controlling. Phytochemical studies have demonstrated the essential oils potential as larvicides, being a promising alternative against *A. aegypti*. However, these oils exhibit solubility limitations in aqueous media and tend to lose activity after solar radiation exposure. In order to overcome these limitations, the encapsulation of oily fractions in polymeric nanocapsules should allow the bioactive compounds to increase their shelf life, thus guaranteeing their bioactivity and larvicidal action. **AIM:** This work aims to develop poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules containing *Melaleuca alternifolia* essential oil as nanolarvicide against *Aedes aegypti*. **MATERIAL AND METHODS:** Initially, *M. alternifolia* oil was characterized by gas chromatography and high resolution mass spectrometry. Nanocapsules were produced by the nanoprecipitation method and characterized by size, polydispersity, surface potential, morphology and encapsulation efficiency. The physico-chemical stability of nanosuspensions stored at 25 ± 2 ° C was evaluated by monitoring particle size, pH, electrical conductivity and turbidity for 90 days. Colorimetric cell viability assays (Alamar Blue) were performed to characterize the cytotoxic effect of essential oil on J774 macrophages and HaCat keratinocytes. The larvicidal activity of the free oil (emulsified in Tween 80) and nanoencapsulated oil was determined by bioassays according to the methodology recommended by the WHO. **RESULTS:** In the characterization of the oil, 20 volatile compounds were identified - terpinen-4-ol as major compound - and 22 non-volatile compounds. With regard to the larvicidal effect of the oil, it was observed as of 100 ppm all exposed larvae died, and it was possible to determine lethal doses in 24 hours (LC50 = 69.374 ppm and LC90 = 101.56 ppm) and in 48 hours (LC50 = 68.325 ppm and LC90 = 98.908 ppm). In the cytotoxicity assays, there was no significant reduction in the viability of macrophages and keratinocytes at concentrations close to the LC90 of the oil against *A. aegypti* larvae. The nanocapsules containing the *M. alternifolia* oil were spherical, with an average size of 172.4 nm, PDI 0,1 and zeta potential -26.35 mV. Although the nanoprecipitation process resulted in a 29% oil content loss, the encapsulation efficiency was 90%. During 60 days of storage, the nanosuspensions maintained their visual appearance without macroscopic evidence of physical instability phenomena. At this time, no changes in turbidity and particle size were observed. The nanocapsules extended the shelf life of the oil after formulation and showed a moderately slow action insecticidal effect with LC50 564.9 ppm in 48 hours. **CONCLUSION:** This work demonstrated the larvicidal potential of the oil of *M. alternifolia*, which could be formulated in polymer nanocapsules, whose increase in larvicidal activity may be the subject of future research.

Keywords: Arboviruses; *Aedes Aegypti*; Larvicides; Natural products; Nanobiotechnology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES OU FIGURAS

| | | |
|------------------|--|-----|
| Figura 1 | Mapa de distribuição global prevista de <i>Aedes aegypti</i> . O mapa indica a probabilidade de ocorrência do artrópode no mundo (de 0 em azul até 1 em vermelho) (KRAEMER et al., 2015b)..... | 29 |
| Figura 2 | Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> | 30 |
| Figura 3 | Anatomia resumida da larva de <i>Aedes aegypti</i> em perspectiva dorsal | 31 |
| Figura 4 | Representação ilustrativa de nanoesféras e nanocápsulas. O princípio ativo está representado em vermelho, na nanoesfera disperso na matriz polimérica, na nanocápsula no interior oleoso (ORIVE et al., 2009)..... | 45 |
| Figura 5 | Gráficos de distribuição de tamanho das nanoformulações. A - Resultados sobrepostos das análises de diâmetro médio por intensidade nos lotes de nanocápsulas contendo óleo de <i>M. alternifolia</i> (direita) e de nanocápsulas contendo MCT (esquerda). B – Porcentagem de subpopulações separadas por variação de tamanho, nanocápsulas com óleo de <i>M. alternifolia</i> (direita) e nanocápsulas contendo MCT (esquerda)..... | 61 |
| Figura 6 | Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo o óleo de <i>Melaleuca alternifolia</i> . A) Campo amplo indicando dispersão de nanopartículas. Escala: 1 μ m; B) e C) Dimensão e forma das nanocápsulas. Escala: 0,5 μ m e 1 μ m. D) Detalhe da nanocápsula esférica delimitada por uma parede polimérica e com um contraste de fundo na região central, indicando um núcleo de natureza lipídica. Escala: 0,2 μ m..... | 62 |
| Figura 7 | Imagens topográficas de microscopia de força atômica (AFM), exibição 2D (esquerda) e 3D (direita). Superfície de nanopartículas poliméricas de PCL contendo óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> | 63 |
| Figura 8 | Espectro de absorvância UV-Vis do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> e NE- ϕ | 64 |
| Figura 9 | Curva analítica do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> em etanol (204 nm) | 65 |
| Figura 10 | Acompanhamento do teor de óleo na formulação por 60 dias..... | 66 |
| Figura 11 | Monitoramento da estabilidade das suspensões de nanopartículas poliméricas de PCL durante 90 dias armazenadas à 25 \pm 1 $^{\circ}$ C. A) pH B) Condutividade elétrica C) Turbidez D) Diâmetro médio de nanocápsulas carregadas..... | 67 |
| Figura 12 | Ensaio de citotoxicidade em células J774 (A) e HaCaT (B). Percentual de viabilidade celular em diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> . A viabilidade do grupo controle negativo (C-) representa 100%. Estão apresentados resultados médios (n=3) em três ensaios independentes..... | 70 |
| Figura 13 | Secção longitudinal da larva de <i>Aedes aegypti</i> adaptada de (CHRISTOPHERS, 1961). Ilustração indica as áreas escurecidas em indivíduos expostos à emulsões e nanocápsulas de PCL contendo óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> e órgãos do sistema digestivo presentes nas regiões..... | 79 |
| Figura 14 | Monitoramento por 30 dias do Potencial Zeta de nanocápsulas de PCL contendo óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> | 106 |

- Figura 15** Aspecto morfológico de larvas de *Aedes aegypti* após exposição ao óleo de *Melaleuca alternifolia* por 24 horas. As larvas apresentaram escurecimento na região superior do tórax. 107
- Figura 16** Aspecto morfológico de larvas de *Aedes aegypti* após exposição nanocápsulas poliméricas de PCL contendo óleo essencial de *M. alternifolia* por 24 horas. As larvas apresentaram escurecimento em diferentes seguimentos do abdômen. 107

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|---|-----|
| Tabela 1 | Atividade larvicida de nanopartículas de prata sobre <i>Aedes aegypti</i> | 43 |
| Tabela 2 | Resumo de estudos de desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo produtos naturais. | 47 |
| Tabela 3 | Composição das fases orgânica e aquosa utilizadas para produzir nanopartículas poliméricas através de nanoprecipitação | 51 |
| Tabela 4 | Dados de CG-SM (composição) para o óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> | 59 |
| Tabela 5 | Parâmetros de caracterização das nanopartículas de ϵ -poli(caprolactona) recém produzidas..... | 60 |
| Tabela 6 | Comparação entre resultados da concentração de óleo obtidos por espectrometria UV-Vis e valores reais..... | 65 |
| Tabela 7 | Atividade larvicida do óleo de <i>Melaleuca alternifolia</i> contra larvas cultivadas de <i>Aedes aegypti</i> | 69 |
| Tabela 8 | Estudos do efeito larvicida de compostos isolados presentes no óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> | 72 |
| Tabela 9 | Tabela de mortalidade de ensaios iniciais. Número de larvas mortas após 24 e 48 horas de exposição ao óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> nas concentrações de 10, 100, 1000 e 10000 ppm. | 101 |
| Tabela 10 | Tabela de mortalidade em intervalos ajustados. Número de larvas mortas após 24 e 48 horas de exposição ao óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> nas concentrações 10, 25, 75 e 100 e 250 ppm..... | 102 |
| Tabela 11 | Tabela de mortalidade em intervalos ajustados. Número de larvas mortas após 24 e 48 horas de exposição a nanocápsulas de PCL contendo o óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> nas concentrações 500, 700, 900 e 1000 ppm. | 102 |
| Tabela 12 | Relação de estudos avaliando a atividade biológica de componentes isolados da <i>M. alternifolia</i> | 103 |

LISTA DE EQUAÇÕES

| | | |
|-----------|--|----|
| Equação 1 | Exatidão dos resultados de determinação de teor de óleo por espectrofotometria, erro relativo percentual (ER%) - | 52 |
| Equação 2 | Eficiência de encapsulação (EE%)..... | 53 |
| Equação 3 | Perda de óleo durante processo de nanoprecipitação | 53 |
| Equação 4 | Porcentagem de óleo perdido durante período de armazenamento..... | 54 |

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

| | |
|------------------|---|
| OE | Oléo Essencial |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| DENV | Vírus da Dengue (<i>Dengue Virus</i>) |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| ORF | Janela aberta de leitura (<i>Open Reading Frame</i>) |
| NS | Proteína não-estrutural (<i>Nonstructural protein</i>) |
| DF | Febre da Dengue (<i>Dengue Fever</i>) |
| SD | Dengue severa (<i>Severe Dengue</i>) |
| DHF | Febre hemorrágica (<i>Dengue Hemorrhagic Fever</i>) |
| CYD-TDV | <i>Dengyaxia</i> |
| ZIKV | Vírus da Zika (<i>Zika vírus</i>) |
| GBS | Síndrome de Guillain-Barré (<i>Guillain-Barré Syndrome</i>) |
| CHIKV | Vírus da Chikungunya (<i>Chikungunya vírus</i>) |
| Bti | <i>Bacillus thuringiensis var. israelense</i> |
| Bin(A/B) | Toxicina binária (<i>Binary toxin</i>) |
| LC ₅₀ | Concentração letal para 50% dos indivíduos expostos |
| LC ₉₀ | Concentração letal para 90% dos indivíduos expostos |
| NE | Nanoemulsões |
| NMV | Nanopartículas metálicas biosintetizadas |
| AgNP | Nanopartículas de prata |
| Uv | Ultravioleta (Ultraviolet)-w4 |
| NC | Nanocápsulas |
| PCL | poli(ϵ -Caprolactona) |
| PLGA | poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) |
| PLA | Ácido poliláctico |
| PEG | Polietilenoglicol |
| CG | Cromatografia Gasosa |
| COV | Composto orgânico volátil |
| MFA | Microscopia de Força Atômica |
| TTO | Tea tree oil |
| PDI | Índice de polidispersão (<i>Polydispersity index</i>) |
| NC-PCL-TTO | Nanocápsulas de PCL contendo Tea tree oil |
| NC-PCL-BLANK | Nanocápsulas vazias |
| PZ | Potencial Zeta |
| ER% | Erro percentual |
| EE% | Eficiência de encapsulação |
| EC ₅₀ | Concentração efetiva para 50% dos indivíduos expostos |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 20 |
| 2.1 | INTRODUÇÃO AOS ARBOVÍRUS E SUAS IMPLICAÇÕES SOCIOECONÔMICAS | 20 |
| 2.1.1 | Impactos do Vírus da Dengue | 20 |
| 2.1.2 | Vírus da Zika: Grave ameaça emergente | 23 |
| 2.1.3 | Vírus da Chikungunya | 26 |
| 2.2 | <i>Aedes aegypti</i> , O PRINCIPAL VETOR DAS ARBOVIROSES EMERGENTES NO BRASIL | 28 |
| 2.2.1 | Distribuição no Brasil e no Mundo | 29 |
| 2.2.2 | Ciclo de Vida e características gerais | 29 |
| 2.3 | ESTRATÉGIAS DE CONTROLE SOBRE O VETOR | 33 |
| 2.3.1 | Larvicidas atuais e suas limitações | 33 |
| 2.4 | PRODUTOS NATURAIS: UMA ALTERNATIVA PROMISSORA | 35 |
| 2.4.1 | Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> | 38 |
| 2.4.2 | Principais limitações na aplicação de produtos naturais como larvicidas | 39 |
| 2.5 | NANOTECNOLOGIA ASSOCIADA A PRODUTOS NATURAIS: INOVAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE LARVICIDAS | 39 |
| 2.5.1 | Nanoemulsões | 40 |
| 2.5.2 | Nanopartículas metálicas p | 41 |
| 2.5.3 | Nanopartículas poliméricas como sistemas potenciais | 45 |
| 3 | OBJETIVOS | 49 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 49 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 49 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 50 |
| 4.1 | CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>M. alternifolia</i> | 50 |
| 4.1.1 | Análise por Cromatografia Gasosa | 50 |
| 4.2 | PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS | 50 |
| 4.3 | CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS | 51 |
| 4.3.1 | Tamanho, Índice de polidispersão (PDI), potencial zeta | 51 |
| 4.3.2 | Microscopia eletrônica de transmissão – MET | 52 |
| 4.3.3 | Microscopia de Força Atômica – MFA | 52 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.4 | DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÓLEO NANOENCAPSULADO | 52 |
| 4.4.1 | Determinação do comprimento de onda de maior absorção do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> | 52 |
| 4.4.2 | Desenvolvimento de curva analítica | 52 |
| 4.4.3 | Determinação da eficiência de encapsulação do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> em nanocápsulas de PCL | 53 |
| 4.5 | AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS DE PCL EM FUNÇÃO DO TEMPO | 54 |
| 4.5.1 | pH e condutividade elétrica | 54 |
| 4.6 | AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melaleuca alternifolia</i> | 55 |
| 4.7 | CULTIVO DE LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> | 55 |
| 4.8 | AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melaleuca alternifolia</i> LIVRE (EMULSIONADO) E NANOESTRUTURADO | 56 |
| 4.8.1 | Preparo de emulsão estoque | 56 |
| 4.8.2 | Preparação de solução coloidal estoque | 56 |
| 4.8.3 | Seleção de Larvas | 56 |
| 4.8.4 | Bioensaio larvicida | 57 |
| 4.9 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 57 |
| 5 | RESULTADOS | 59 |
| 5.1 | CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE <i>Melaleuca alternifolia</i> | 59 |
| 5.2 | PREPARAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE PCL..... | 59 |
| 5.3 | CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS | 60 |
| 5.3.1 | Análise morfológica | 62 |
| 5.4 | DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÓLEO NANOENCAPSULADO (EE%) | 63 |
| 5.4.1 | Comprimento de onda de maior absorbância | 63 |
| 5.4.2 | Desenvolvimento de curva analítica | 64 |
| 5.4.3 | Eficiência de Encapsulação e perda de óleo no processo de nanoprecipitação e durante armazenamento | 65 |
| 5.5 | ESTUDOS DE ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA EM 90 DIAS | 66 |
| 5.6 | DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO DE <i>Melaleuca alternifolia</i> livre E NANOENCAPSULADO | 67 |
| 5.7 | DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA..... | 70 |
| 6 | DISCUSSÃO | 71 |
| 7 | CONCLUSÃO | 81 |
| | REFERÊNCIAS | 82 |

| | |
|---|-----|
| APÊNCIDE | 101 |
| ANEXO I – DADOS DE BIOENSAIOS ENSAIOS DO ÓLEO DE <i>MELALEUCA LIVRE E NANOENCAPSULADO</i> | 101 |
| ANEXO II– COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE <i>Melaleuca alternifolia</i> | 103 |
| ANEXO III – ESTABILIDADE COLOIDAL: Potencial Zeta..... | 106 |
| ANEXO IV– MORFOLOGIA DAS LARVAS | 107 |

1 INTRODUÇÃO

Doenças causadas por um arbovírus, conhecidas como arboviroses, representam uma preocupante ameaça à saúde pública em todo o mundo, especialmente em países tropicais e subtropicais, pois sobrecarregam o sistema público de saúde e causam extensos déficits econômicos. Dengue, Chikungunya e Zika tem se expandido rapidamente ao redor do globo nos últimos anos, sendo responsáveis por epidemias em larga escala em diversos territórios do hemisfério oeste (PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016), principalmente países sul-americanos. Apesar dos esforços na pesquisa, não há terapias específicas para o tratamento da dengue, zika e chikungunya. Dessa forma, a prevenção na maioria dos países e casos é limitada a medidas voltadas para o controle do vetor (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). No Brasil, o principal vetor do vírus da dengue, zika e chikungunya é o mosquito da espécie *Aedes (Stegomyia) aegypti* (CARVALHO; MOREIRA, 2017). No país, *A. aegypti* está presente em todos os estados e em aproximadamente 4.500 municípios (DAVID; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; FREITAS, 2009). Mosquitos da espécie *A. aegypti* são ectoparasitas hematófagos temporários, a aquisição e transmissão dos vírus ocorre durante a nutrição sanguínea, (IOOS et al., 2014). A espécie é considerada a mais sinantrópica dentro da família *Culicidae*, sempre em convivência com seres humanos (CARVALHO; MOREIRA, 2017) e esta notável associação do mosquito vetor com humanos e ambientes urbanos é um desafio para a saúde pública (LIMA-CAMARA, 2016).

Uma das principais abordagens utilizadas contra o mosquito é a redução da densidade da população de adultos através de larvicidas, pois as larvas apresentam uma mobilidade limitada e frequentemente são mais acessíveis que os insetos adultos, não podendo mudar seu habitat para evitar as estratégias de controle (FILLINGER; LINDSAY, 2011). Em geral, os principais agentes larvicidas são baseados em químicos organofosforados e agentes bacterianos (GOVINDARAJAN; BENELLI, 2016). Esses agentes apresentam sérias limitações e efeitos indesejados, tais como: efeitos tóxicos ao meio ambiente e a organismos não-alvo. Seu uso indiscriminado resulta na seleção artificial de indivíduos com fenótipos resistentes (PAVELA; GOVINDARAJAN, 2017). Além disso, tais agentes larvicidas não são formulados em sistemas que os protejam contra elementos externos de degradação ou permitam sua liberação controlada, demandando repetidas exposições com curtos períodos de ação larvicida. Por isso,

atualmente, nenhuma dessas estratégias aplicadas individualmente é completamente bem sucedida (BENELLI; CASELLI; CANALE, 2016).

Entre as estratégias alternativas existentes, inseticidas baseados em compostos botânicos, tais como óleos vegetais, óleos essenciais e oleoresinas são, atualmente, uma das abordagens mais promissoras (PAVELA, 2015). Dentro deste grupo, os óleos essenciais (OE) são considerados ótimas alternativas para o controle de vetores arbovirais (BILAL e HASSAN, 2012; LIU et al., 2013; MAHESWARAN; IGNACIMUTHU, 2012; WARIKOO; WAHAB; KUMAR, 2011). Na literatura, estão disponíveis extensas revisões bibliográficas de estudos avaliando a eficiência larvicida de diversos óleos essenciais (DIAS; MORAES, 2014; PAVELA, 2015). Muitos autores defendem que a exposição às misturas complexas e variáveis de constituintes botânicos bioativos e seus diferentes modos de ação podem diminuir ou retardar a chance de resistência nas populações de mosquitos (DIAS; MORAES, 2014; ISMAN, 2000; OKUMU; KNOLS; FILLINGER, 2007; PAVELA, 2015). Além disso, a maioria dos compostos presentes em OEs são seletivos, apresentando baixo ou nenhum efeito prejudicial a organismos não alvo (DURINGER et al., 2010), principalmente em mamíferos (DURINGER et al., 2010; GOVINDARAJAN; RAJESWARY; BENELLI, 2016). O impacto ao meio ambiente é muito reduzido devido a rápida biodegradabilidade dos compostos bioativos (CHENG, 2003; GOVINDARAJAN; RAJESWARY; BENELLI, 2016). Por outro lado, produtos naturais apresentam uma série de limitações físico-químicas, tais como: baixa solubilidade em meio aquoso – nicho característico das lavas –, alta fotossensibilidade e oxidação que impedem sua aplicação direta no nicho das larvas de *Aedes aegypti*. Desta forma, o desenvolvimento de novas tecnologias de formulação que possam viabilizar a utilização de produtos naturais são necessários para garantir sua aplicação larvicida. Sob esta perspectiva, a nanotecnologia tem sido utilizada em diversas áreas com o intuito de fornecer estratégias para solucionar limitações inerentes as propriedades físico-químicas de moléculas bioativas. Sistemas nanoestruturados representam uma oportunidade de inovação para o desenvolvimento de uma formulação larvicida à base de produtos naturais, tornando possível o aumento da solubilidade dos compostos bioativos, sua liberação controlada e a proteção contra a radiação solar e volatilidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INTRODUÇÃO AOS ARBOVÍRUS E SUAS IMPLICAÇÕES SOCIOECONÔMICAS

Arbovirus, *arthropod-borne viroses*, é a denominação generalizada dada aos vírus que são mantidos e disseminados na natureza, principalmente ou em grande parte, através da transmissão biológica entre artrópodes hematófagos e hospedeiros vertebrados susceptíveis (ARTSOB; LINDSAY; DREBOT, 2017). Existem mais de 500 arbovírus conhecidos, dos quais, aproximadamente 100 são capazes de causar doenças em seres humanos. Os principais artrópodes transmissores são mosquitos, carrapatos, moscas e flebótomos. Arbovírus são um grupo mundialmente distribuído composto por vírus pertencentes a diversas famílias taxonômicas, destacando-se a família *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* ou *Togaviridae*, em menor número, a família *Reoviridae* e *Orthomyxoviridae* (CLETON et al., 2012).

Doenças causadas por um arbovírus, conhecidas como arbovirose, representam uma preocupante ameaça à saúde pública em todo o mundo, especialmente em países tropicais e subtropicais, pois sobrecarregam sistemas públicos de saúde e causam extensos déficits econômicos. Somado a isto, o número de casos tende a aumentar significativamente por causa de diversos fatores concomitantes: desmatamento, migração, ocupação desordenada de áreas urbanas, saneamento básico negligenciado, além de mudanças climáticas que possibilitam a propagação dos vetores em novas áreas. (MOTA et al., 2016). Os arbovírus que causam Dengue, Chikungunya e Zika tem se expandido rapidamente nos últimos anos, sendo responsáveis por epidemias em larga escala em diversos territórios (PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016), principalmente países sul-americanos.

2.1.1 Impactos do Vírus da Dengue

A Dengue é uma doença negligenciada e epidêmica em muitas partes do mundo, sendo uma das maiores ameaças à saúde pública nos países tropicais e subtropicais com possibilidade de extensão para outras áreas geográficas (GUZMAN et al., 2017). Segundo a OMS, esta é a doença viral transmitida por mosquito que se dissemina mais rapidamente em todo o mundo (WHO, 2012).

Quatro vírus com sorotipos distintos (DENV-1,-2,-3,-4) constituem os agentes etiológicos da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). DENV é um vírus de fita simples de RNA positivo, aproximadamente 10.700 pares de bases, delimitado por um capsídeo coberto por uma membrana lipídica. O genoma compreende um único *Open Reading Frame* (ORF), que é translacionalmente clivada em três proteínas estruturais (capsídeos, pré-membrana e envelope) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). O precursor da poliproteína é flanqueado por duas regiões não-traduzidas (5' e 3') (LEITMEYER et al., 1999). A diversidade genética de DENV pode ser atribuída a RNA polimerase que não tem atividade corretora *proofreading*; sugere-se que aproximadamente uma mutação é produzida por ciclo de replicação genômica (CHEN; VASILAKIS, 2011).

DENV é membro do gênero *Flavivirus* na família *Flaviviridae* e é principalmente transmitido entre humanos através da picada de mosquitos do gênero *Aedes* (D. J. GUBLER, G. KUNO, 2007). O mosquito *Aedes aegypti* é o vetor primário da dengue, uma espécie que tem se adaptado para procriar, alimentar-se, repousar e depositar ovos dentro e ao redor de habitações urbanas. O mosquito *Aedes albopictus*, é reconhecido como o vetor secundário na Ásia e tem se espalhado amplamente para a América do Norte e Europa (WHO, 2012).

Os surtos de infecção por qualquer um dos sorotipos variam entre infecções assintomáticas, subclínicas e sintomáticas. (FARES et al., 2015; RAMOS-CASTAÑEDA et al., 2017). Infecções sintomáticas podem apresentar características de uma doença branda semelhante a gripe, conhecida como febre da Dengue, *Dengue Fever* (DF) ou uma doença potencialmente fatal chamada de Dengue Severa (SD), previamente conhecida como Dengue hemorrágica (DHF) ou Síndrome de choque (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

A dengue tem evoluído de uma doença esporádica para um dos maiores problemas de saúde pública no mundo apresentando efeitos socioeconômicos substanciais devido ao aumento da sua expansão geográfica, número de casos e severidade da doença (GUZMAN; HARRIS, 2015). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a doença é endêmica em mais de 100 países distribuídos em regiões da Ásia, Américas, Oeste do pacífico, África e Leste mediterrâneo e sua incidência tem crescido 30 vezes nos últimos 50 anos (WHO, 2012). Em 2013, um grupo de pesquisa usando uma nova abordagem de modelagem, publicou na *Nature* a estimativa de que 390 milhões de pessoas estão infectadas pelo vírus da dengue e ocorrem 96 milhões de casos anuais em todo mundo,

mais de três vezes comparado aos dados apresentados pela Organização Mundial da Saúde em 2012, entretanto, a verdadeira prevalência e incidência da doença não é bem conhecida, especialmente na Índia, China, Brasil, África e Indonésia (BHATT et al., 2013). Outros estudos calculam que o número de casos ocorrentes são 2 a 28 vezes mais frequentes que aqueles divulgados pelos sistemas nacionais de vigilância (SHEPARD et al., 2011; STANDISH et al., 2010). Nas Américas, 2.338.848 casos suspeitos de dengue foram notificados em 2016, dos quais 433.716 foram confirmados por testes clínicos, 4.274 foram relatados como dengue severa e 1.032 mortes ocorreram devido a infecção (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2016). No sudeste da Ásia são aproximadamente 2,9 milhões de episódios com 5.906 mortes estimadas (SHEPARD; UNDURRAGA; HALASA, 2013).

O impacto econômico e o tamanho da população em risco confirmam a importância global das infecções pelo vírus da dengue (RAMOS-CASTAÑEDA et al., 2017). Custos diretos e indiretos devido a dengue são extensos, mundialmente é estimado um gasto médio de aproximadamente U\$ 39 bilhões por ano, valores utilizados no atendimento médico, controle do vetor, vigilância e perda de produtividade (baseado em dados de 2010) (SELCK; ADALJA; BODDIE, 2014). Especificamente, em países americanos a doença tem um custo anual de U\$ 1-2 bilhões em média, excluindo gastos com o controle do vetor (SHEPARD et al., 2011). No sudeste asiático o custo econômico chega a U\$ 950 milhões (SHEPARD; UNDURRAGA; HALASA, 2013). A acelerada disseminação global do vírus está associado as mudanças sociodemográficas dos últimos 50-60 anos, incluindo um crescimento populacional sem precedentes, aumento na circulação de pessoas (e conseqüentemente do vírus) (CLETON et al., 2012), urbanização descontrolada, mudanças climáticas, em paralelo ao baixo investimento em infraestrutura urbana e em programas de controle do vetor (GUZMAN; HARRIS, 2015).

A primeira vacina contra a dengue, “*Dengvaxia*” (CYD-TDV) por Sanofi Pasteur, foi registrada em dezembro de 2015, sendo licenciada para indivíduos de 9 a 45 anos em áreas endêmicas. Desde então, CYD-TDV tem sido licenciada por Autoridades Reguladoras Nacionais de diversos países com regiões endêmicas severas. CYD-TDV é uma vacina recombinante tetravalente administrada em três doses, baseada no *backbone* YF17D. CYD-TDV inclui todas as três proteínas estruturais, sem a inclusão de proteínas não-estruturais (VANNICE; DURBIN; HOMBACH, 2016). Esta vacina foi avaliada em dois amplos estudos clínicos piloto de fase 3 em 5 países na Ásia e 5 países na América Latina (CAPEDING et al., 2014; VILLAR et al., 2015). A eficiência da vacina foi maior

contra os sorotipos 3 e 4 (71.6% e 76.9%, respectivamente) comparada aos sorotipos 1 e 2 (54.7% e 43.0%, respectivamente) (VANNICE; DURBIN; HOMBACH, 2016). Existem pelo menos 5 candidatos vacinais sendo avaliados em estudos clínicos, incluindo outras vacinas atenuadas, subunidades, DNA e vacinas inativas purificadas. Tecnologias adicionais, como vacinas baseadas em estruturas que mimetizam vírus (*virus-like particle*), estão sobre avaliação em estudos pré-clínicos. Apesar dos esforços na pesquisa, não há terapias específicas para o tratamento da dengue e a prevenção na maioria dos países e casos é limitada a medidas voltadas para o controle do vetor (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

2.1.2 Vírus da Zika: Grave ameaça emergente

Entre 2015 e 2016, o vírus da Zika (ZIKV) estava no centro de uma epidemia emergencial (PLOURDE; BLOCH, 2016) tornando-se uma ameaça global à saúde humana, uma vez que espalhou-se rapidamente pela América Latina, Caribe, Estados Unidos e Ásia, após causar um grande surto na região nordeste do Brasil em 2015 (POSSAS, 2016).

ZIKV foi descoberto em 1947 em macacos da espécie *Macaca mulata* presentes na floresta Zika em Uganda (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). O primeiro caso de infecção humana foi documentado cinco anos depois em Uganda e Tanzânia (SMITHBURN, 1952). Antes de 2015, o vírus era limitado a África, sudeste asiático e às Ilhas do Pacífico (POSSAS, 2016) e por aproximadamente 67 anos, o vírus foi predominantemente ignorado pela comunidade científica (89 publicações de 1947 à 2014, comparada a 850 no período entre maio de 2015 a agosto de 2016) (GRUBAUGH; ANDERSEN, 2016). Isto ocorreu por que quando o vírus Zika foi descoberto em 1947, não se pensava que causasse uma doença suficientemente grave em seres humanos para justificar uma pesquisa intensa (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; GRUBAUGH; ANDERSEN, 2016).

Indubitavelmente, o vírus da Zika que circula hoje é geneticamente diferente do Zika passado (GRUBAUGH; ANDERSEN, 2016). ZIKV é um arbovírus de RNA fita simples de sentido positivo, pertencente à família *Flaviviridae* (LANCIOTTI et al., 2008), seu genoma contém 10.795 nucleotídeos codificando 3.419 aminoácidos. Como outros flavivirus, o vírus da Zika é composto por duas regiões não-codificantes (5' e 3') que flanqueiam uma Fase de Leitura Aberta, *Open Reading Frame*, a qual codifica uma poliproteína que quando clivada forma o capsídeo, o precursor da membrana, envelope

viral e sete proteínas não estruturais (KUNO; CHANG, 2007). A característica central da biologia de um vírus de RNA é que a replicação destes vírus, produzem grandes tamanhos de população, mas o faz com uma grande quantidade de erros (em sua maioria, causados pela ausência do mecanismo de reparo *proofreading*, que leva a uma mutação por replicação do genoma (GRUBAUGH; ANDERSEN, 2016; HOLLAND et al., 1982; STEINHAEUER; DOMINGO; HOLLAND, 1992). Análises filogenéticas demonstram que o vírus da Zika pode ser classificado em duas linhagens distintas, africana e asiáticas, ambas emergentes do oeste africano durante o final do século XIX ou início do século XX (GATHERER; KOHL, 2016). O vírus envolvido no surto no Brasil e nas Américas tem sido identificado como da linhagem asiática (FREIRE et al., 2015) que se originou durante a migração do vírus da África para o sudeste da Ásia (GATHERER; KOHL, 2016) e foi isolado pela primeira vez na Polinésia Francesa em 2013 e 2014 (FREIRE et al., 2015).

ZIKV, assim como outros flavivirus, é transmitido entre humanos por mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente *A. aegypti* (comumente conhecido como o mosquito da febre amarela), *A. albopictus* (o mosquito tigre asiático) e *A. africanus* (FARIA et al., 2016; FELLNER, 2016; PLOURDE; BLOCH, 2016) espécies que se adaptam bem a climas quentes (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; KINDHAUSER et al., 2016).

Em maio de 2015, o vírus foi descrito pela primeira vez no Brasil (HENNESSEY; FISCHER; STAPLES, 2016) e subsequentemente em diversos países da América Central, do sul e no Caribe. No Brasil, aproximadamente 30.000 casos de infecção por Zika tinham sido indicados até 30 de janeiro de 2016. Essas ocorrências apontam um pico epidêmico em meados de Julho de 2015, e a maioria dos casos brasileiros (93%) foram relatados no estado da Bahia (FARIA et al., 2016). Atualmente ZIKV é amplamente disseminado no Brasil, com transmissão autóctone e alta incidência notificadas em 22 dos 27 estados (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Enquanto isso, o vírus se movia ao norte. Em novembro do mesmo ano, casos de ZIKV adquiridos localmente foram descritos na Colômbia, El Salvador, México, Paraguai e Venezuela (“WHO | Zika virus infection – El Salvador”, 2015; “WHO | Zika virus infection – Mexico”, 2015; “WHO | Zika virus infection – Paraguay”, 2015; “WHO | Zika virus infection – Venezuela”, 2015). Em dezembro do mesmo ano, a doença se espalhou para Honduras, Panamá e Guiana Francesa (“WHO | Zika virus infection – France - French Guiana and Martinique”, 2016; “WHO | Zika virus infection – Honduras”, 2015; “WHO | Zika virus infection – Panama”, 2016). Em 31 de dezembro, o Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC)

anunciou o primeiro caso confirmado de ZIKV em Porto Rico (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015).

Em humanos, o período desde a picada do mosquito ao desenvolvimento de sintomas começa de 3 a 12 dias. A infecção é em sua maioria assintomática, aproximadamente 80% dos casos (DUFFY et al., 2009; IOOS et al., 2014). Quando os sintomas ocorrem são tipicamente leves, auto limitantes e inespecíficos. Similaridades com outras infecções virais podem confundir o diagnóstico, entre os sintomas característicos estão erupção cutânea, febre, artralgia, mialgia, fadiga, dores de cabeça e conjuntivites (PLOURDE; BLOCH, 2016). Erupções cutâneas, uma característica proeminente, são maculopapular e pruriginosa na maioria dos casos, começa proximalmente e se espalha para as extremidades com uma resolução espontânea dentro de 1 a 4 dias a partir do início. Sequelas clínicas mais severas têm sido cada vez mais associadas ao vírus do Zika (PLOURDE; BLOCH, 2016). Durante o surto ocorrido no Brasil, a ocorrência de recém-nascidos com microcefalia cresceu acentuadamente, mais de 3.800 casos, 20 casos/10⁴ recém nascidos versus 0,5/10⁴ recém nascidos no ano anterior ao surto (SCHULER-FACCINI et al., 2016). Logo, a infecção por Zika durante a gestação foi relacionada como a causa para microcefalia e anomalias congênitas (MARTINES et al., 2016; MLAKAR et al., 2016; SCHULER-FACCINI et al., 2016; VENTURA et al., 2016). A detecção do ZIKV em tecidos do cérebro fetal (FARIA et al., 2016; SCHULER-FACCINI et al., 2016) e no líquido amniótico (CALVET et al., 2016) apoiam a hipótese de que ZIKV é transmitido de mãe para filho (BESNARD et al., 2014; FARIA et al., 2016), além disso, *in vitro*, o vírus infecta células progenitoras neurais (TANG et al., 2016). Em 2016, um estudo do Instituto *Pastuer* na França descobriu que ZIKV é capaz de infectar e prejudicar células tronco neurais no neocortex de camundongos em desenvolvimento (INSTITUT PASTEUR, 2016). No mesmo ano, a Organização Mundial da Saúde anuncia oficialmente que o vírus é neurotrófico, preferencialmente afetando tecidos do cérebro e do tronco encefálico de fetos em desenvolvimento (“WHO | WHO Director-General addresses media after Zika Emergency Committee”, 2016).

As características neurotrópicas do ZIKV e alta afinidade a tecidos cerebrais pode também ser manifestada como Síndrome de Guillain-Barré (GBS) em adultos infectados (DEL CARPIO-ORANTES, 2016; FELLNER, 2016; “Key Messages – ZIKA virus disease”, 2017). GBS é uma doença rara no sistema nervoso que afetava cerca de 3.000-6.000 pessoas por ano nos Estados Unidos antes do vírus Zika chegar ao país. Em

pacientes com GBS, as células nervosas danificadas levam a fraqueza muscular e algumas vezes paralisia (FELLNER, 2016). Em casos severos, fraqueza e paralisia podem afetar músculos que controlam a respiração. Sintomas podem durar de semanas a meses, a maioria das pessoas recuperam-se totalmente.

No final de agosto de 2016, pesquisadores da Organização de Saúde Pan-americana comparou as proporções de casos de GBS antes e depois da Zika ter chegado em sete países e relataram uma forte associação entre o vírus e a doença. Em carta publicada no *New England Journal of Medicine*, Marcos Espinal e colaboradores, analisaram as razões de GBS e ZIKV no Brasil, República Dominicana, El Salvador, Suriname, Honduras, Colômbia e Venezuela. Eles observaram que entre abril de 2015 e março de 2016, ocorrem 164.237 casos confirmados e suspeitos de infecção por Zika e 1.474 casos de GBS (DOS SANTOS et al., 2016).

Até a presente data, não há uma vacina, nem tratamento específico disponível contra ZIKV, a recomendação dada pela OMS a uma pessoa infectada pelo vírus é de pleno descanso, beber bastante líquido e tratar dores e febre com fármacos analgésicos e anti-inflamatórios. A principal forma de prevenção é a proteção contra a picada do mosquito além de cuidados quanto a transmissão sexual (“WHO | Zika virus”, 2017).

2.1.3 Vírus da Chikungunya

O vírus da Chikungunya (CHIKV) surgiu nas Américas no final de 2013 causando morbidades substanciais. Aproximadamente 1,1 milhões de casos foram relatados dentro de um ano, incluindo casos severos e fatalidades (YACTAYO et al., 2016). Em 2016, A febre de Chikungunya foi considerado como uma das maiores ameaças a saúde pública em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (BALA MURUGAN; SATHISHKUMAR, 2016).

CHIKV é um arbovírus pertencente ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*, transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o agente etiológico da febre de Chikungunya em humanos (SOLIGNAT et al., 2009; YACTAYO et al., 2016). Membros do gênero *Alphavirus* são vírus envelopados por membrana, que consistem de uma fita simples de RNA como material genético e um nucleocapside icosaedro com 60-70 nm diâmetro (WAGNER et al., 2014). O genoma de CHIKV é constituído de uma fita de RNA simples, de senso positivo de cerca 11,9 kb com uma estrutura *cap 5'* e uma calda de poliadenosina 3' (ROSS, 1956). CHIKV contém duas fases abertas de leitura, *Open*

Reading Frames, que codificam proteínas estruturais e não estruturais (BALA MURUGAN; SATHISHKUMAR, 2016).

Acredita-se que o vírus se originou na África e subsequentemente foi transferido para Ásia. A primeira infecção por CHIKV foi relatada na Tanzânia em 1905 e em 1953 o vírus foi isolado (BALA MURUGAN; SATHISHKUMAR, 2016; ROSS, 1956). Geograficamente CHIKV era distribuído nas regiões tropicais e subtropicais de muitos países asiáticos e africanos. Na África, o vírus é transmitido por mosquitos *Aedes* comuns em regiões arbóreas (*A. furcifer-taylori*, *A. luteocephalus*, *A. africanus*, e *A. neoffricanus*) apresentando como principal reservatório primatas não-humanos (DIALLO et al., 1999; VU; JUNGKIND; ANGELLE DESIREE LABEAUD, 2017). Entre os anos 1960 e 1990, infecções humanas acidentais levaram a numerosos surtos em pequena escala nos países da África Central e do Sul, Senegal, Guiné e Nigéria (POWERS; LOGUE, 2007). Os casos ocorriam após longos períodos de chuva, fator associados ao aumento na densidade populacional de mosquitos transmissores. Em contraste, os surtos de CHIKV no sudeste asiático ocorrem em cidades maiores onde mosquitos da espécie *Aedes aegypti* foram indicados como vetores de transmissão primário (VU; JUNGKIND; ANGELLE DESIREE LABEAUD, 2017).

Atualmente, *A. albopictus* e *A. aegypti* são os principais responsáveis pela doença de Chikungunya. Embora *A. aegypti* seja o vetor primário clássico para CHIKV, ambas as espécies são conhecidas como susceptíveis a infecção por CHIKV (SOLIGNAT et al., 2009). *A. albopictus* foi responsável pelo surto epidêmico de CHIKV em 2005-2006 nas Ilhas Reunião e foi identificado como o principal vetor na Europa, enquanto *A. aegypti* é o vetor dominante de CHIKV na Índia e Américas (KRAEMER et al., 2015b).

Em 2004, uma epidemia de larga escala irrompeu pela costa do Kenya, Ilhas no oceano Índico, Índia, Sudeste da Ásia e China (KARIUKI NJENGA et al., 2008; VU; JUNGKIND; ANGELLE DESIREE LABEAUD, 2017). Embora infecções causadas por CHIKV em viajantes retornando à Europa tenham sido descritas anteriormente, transmissões autóctones de CHIKV foram observadas pela primeira vez na Itália em 2007 (REZZA et al., 2007; VU; JUNGKIND; ANGELLE DESIREE LABEAUD, 2017) e França em 2009 (GRANDADAM et al., 2011; VU; JUNGKIND; ANGELLE DESIREE LABEAUD, 2017). Em Dezembro de 2013, foi anunciado o aparecimento de CHIKV nas Américas, quando o Centro de Referência Nacional Francês para Arboviroses diagnosticou o primeiro caso local de Chikungunya em São Martinho (CASSADOU et al., 2014). Desde que foi relatado pela primeira vez em São Martinho, o vírus se espalhou

por 45 países das Américas Central, do Sul e do Norte (YACTAYO et al., 2016) causando mais de 2.060.193 casos suspeitos ou confirmados e 447 mortes – dados obtidos até o dia 5 de maio de 2017 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). No Brasil, alguns casos foram relatados desde Junho de 2014, desde então mais de 25.000 casos suspeitos de infecção por CHIKV tem sido registrados no país (MOTA et al., 2016).

Chikungunya e Dengue apresentam manifestações clínicas similares, o que torna o diagnóstico difícil (YACTAYO et al., 2016). Os principais sintomas incluem febre, enxaqueca, dores articulares e poliartralgia que duram de muitos dias a meses (DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012). A palavra Chkungunya significa “aqueles que se dobram” referindo-se a postura dos pacientes afetados devido a dores insuportáveis nas juntas e outras complicações reumatológicas (HER et al., 2009). Após o mosquito infectado picar um ser humano, o vírus começa a replicar-se e distribuir-se no fígado e em articulações, causando danos ao colágeno e interrompendo o metabolismo em tecidos conectivos, levando a artrites agudas (RAMACHANDRAN et al., 2012). Erupção cutânea às vezes é observada sendo tipicamente maculopapular, embora casos tenham sido relatados com erupções bolhosas em alguns bebês infectados por CHIKV (ROBIN et al., 2010). Fatalidades são raras na maioria dos casos (SOLIGNAT et al., 2009; YACTAYO et al., 2016). Em contraste com DENV e ZIKV, que pode causar uma infecção assintomática, a maioria dos indivíduos com chikungunya são sintomáticos. Durante epidemias, quase 2/3 dos pacientes infectados tinham que ser hospitalizados (SIMON et al., 2007; TSETSARKIN; MCGEE; HIGGS, 2011), entretanto infecções assintomáticas também são relatadas em 3%-25% das pessoas (MOLONEY et al., 2014). Atualmente não há nenhuma terapia antiviral disponível para inibir a replicação do CHIKV durante a infecção em humanos (BALA MURUGAN; SATHISHKUMAR, 2016), o tratamento é suportivo e inclui o uso de analgésicos e anti-inflamatórios, reidratação e repouso para reduzir os sintomas da viremia (VU; JUNGKIND; ANGELLE DESIREE LABEAUD, 2017). Segundo a OMS, são recomendáveis medidas de controle contra os vetores que reduzam a densidade populacional de *A. aegypti* e *A. albopictus*. (“WHO | Chikungunya”, 2017).

2.2 *Aedes aegypti*, O PRINCIPAL VETOR DAS ARBOVIROSES EMERGENTES NO BRASIL

Nas últimas três décadas, o Brasil tem sido acometido por severas epidemias de Dengue devido a ampla circulação dos quatro sorotipos virais. Esta situação no país se

tornou ainda mais complicada em 2014 e 2015 (HENNESSEY; FISCHER; STAPLES, 2016; MOTA et al., 2016) pela introdução dos vírus Chikungunya e Zika, causando uma situação de tripla epidemia. No centro desta ameaça à saúde pública brasileira está o mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti*, o principal vetor transmissor dos três vírus no país: DENV, ZIKV e CHIKV (CARVALHO; MOREIRA, 2017). *Aedes aegypti* é a espécie de mosquito mais bem caracterizada da família *Culicidae*, ordem *Diptera* (CHRISTOPHERS, 1961; NENE et al., 2007).

2.2.1 Distribuição no Brasil e no Mundo

O *Aedes aegypti* é uma espécie nativa da África, entretanto atualmente está distribuída em diversas regiões do mundo (figura 1) (KRAEMER et al., 2015a). Existe a hipótese de que a disseminação ocorreu por meio de embarcações associadas ao tráfico de escravos em meados do século XVI e dessa forma foi introduzida ao “Novo Mundo”, de onde foi subsequentemente espalhada para regiões tropicais e subtropicais do globo (BROWN et al., 2014), onde condições climáticas e de estruturas urbanas negligenciadas são favoráveis ao seu desenvolvimento. No Brasil, *A. aegypti* está presente em todos os estados e em aproximadamente 4.500 municípios (85% do país) (DAVID; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; FREITAS, 2009).

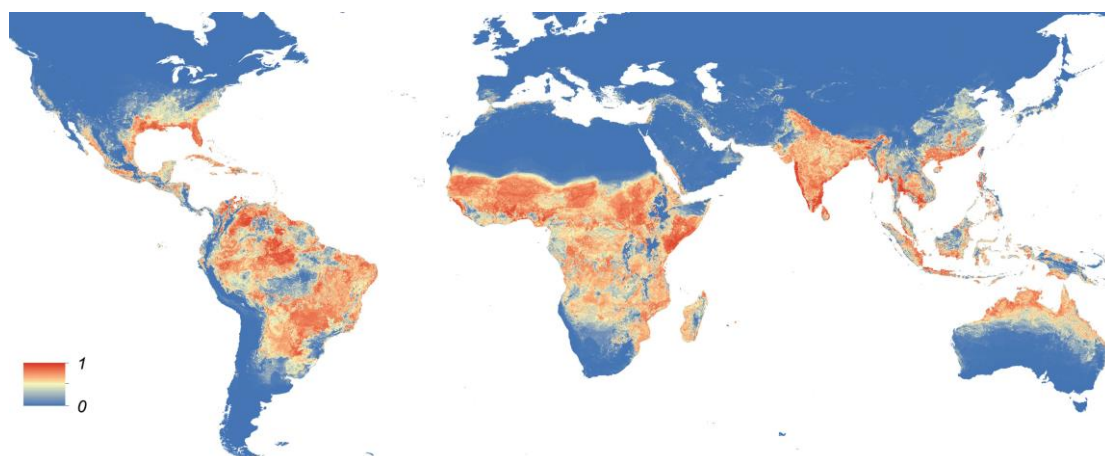


Figura 1. Mapa de distribuição global prevista de *Aedes aegypti*. O mapa indica a probabilidade de ocorrência do artrópode no mundo (de 0 em azul até 1 em vermelho) (KRAEMER et al., 2015b).

2.2.2 Ciclo de Vida e características gerais

O ciclo de vida do *A. aegypti* inclui quatro fases distintas: ovo, larva, pupa e adulto (CARVALHO; MOREIRA, 2017; CHRISTOPHERS, 1961) (Fig. 2). Os ovos são pequenos, cerca de 0,5 mm, de cor branca durante a ovoposição, escurecendo em menos

de duas horas depois (FARNESI et al., 2009; FAULL; WILLIAMS, 2016) devido a produção de eumelanina na membrana interna dos ovos -revisado em (FARNESI et al., 2017). Quando imersos em água os ovos de *A. aegypti* podem eclodir dentro de 2 à 4 dias, mas na ausência de água, a alta resistência a dessecação permite que os ovos se mantenham viáveis por semanas, meses ou até mesmo um ano (FAULL; WILLIAMS, 2015). Essa característica é responsável pelo alto potencial invasivo da espécie, permitindo que os ovos se mantenham viáveis por longos períodos de transporte (BALDACCHINO et al., 2015).

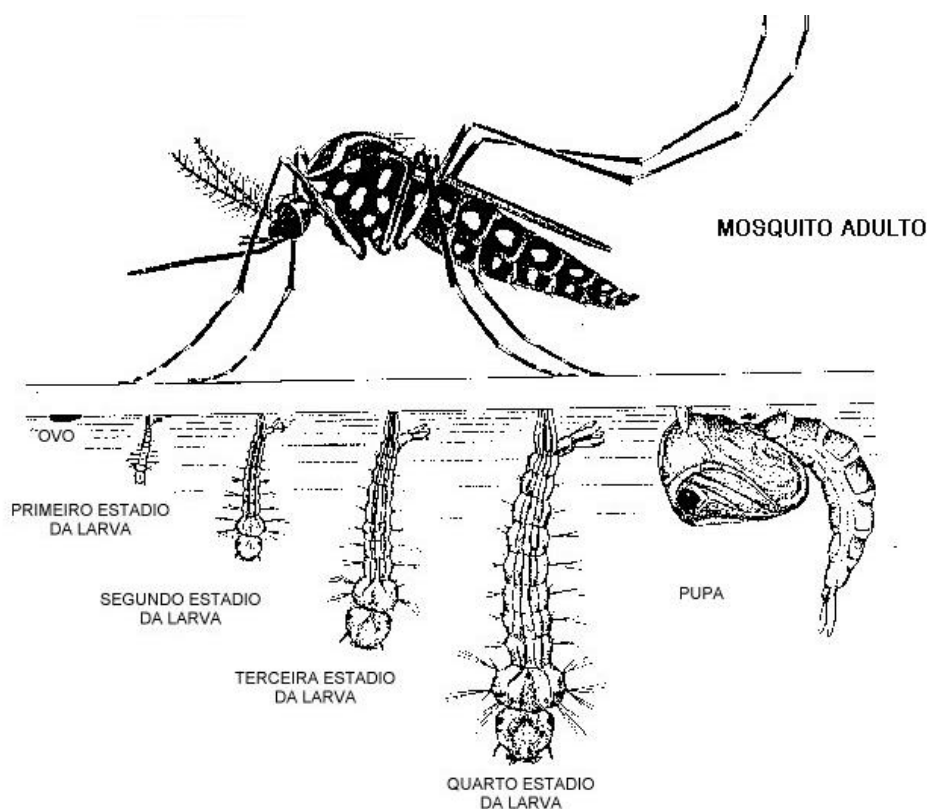


Figura 2. Ciclo de vida do *Aedes aegypti*.

A eclosão dos ovos dá origem as larvas de primeiro *instar* ou estágio. Este é seguido por três sucessivas mudas ou *ecdises*, conduzindo aos respectivos estágios de segundo, terceiro e quarto *instar* larvar (CHRISTOPHERS, 1961). Estes estágios da espécie compreendem as únicas etapas onde ocorrem alimentação em indivíduos ainda imaturos, também são caracterizadas como os únicos estágios onde ocorrem o aumento de tamanho dos indivíduos no ciclo de vida. As larvas de *A. aegypti* são aquáticas e se alimentam de matéria orgânica aderida a parede ou sedimentadas no fundo de reservatórios. Os hábitos de nutrição larval não são seletivos, assim nutricionais, as larvas podem prontamente ingerir larvicidas biológicos e químicos (VALLE, D; PIMENTA,

DN; CUNHA, 2015, p. 75–92). As larvas respiram o ar atmosférico através de aberturas de espiração no sifão, localizado no oitavo segmento abdominal (Figura 3). Este comportamento é uma consideração crucial para programas controle do vetor, uma vez que a larva precisa emergir para a superfície regularmente para respirar. Na superfície a larva se torna mais detectável e susceptível a intervenções de controle (CARVALHO; MOREIRA, 2017).



Figura 3. Anatomia resumida da larva de *Aedes aegypti* em perspectiva dorsal

O período de desenvolvimento das larvas de *A. aegypti* é influenciado por muitos fatores, primeiramente temperatura (SIMOY; SIMOY; CANZIANI, 2015), disponibilidade de comida (LEVI et al., 2014) e a concentração de larvas nos sítio de deposição, também conhecidos como “criadouros”. Sob condições ótimas, larvas de *A. aegypti* podem completar todos os quatro *instars* em 4 a 5 dias.

Uma quarta ecdise conhecida por *pupação* origina a *pupa*, neste estágio de desenvolvimento não ocorre alimentação e dura aproximadamente o mesmo período de tempo independente da condição nutricional dos estágios anteriores (LEVI et al., 2014). As pupas permanecem quase continuamente na superfície da água para respirar, imergindo para o fundo dos reservatórios apenas quando uma ameaça é percebida. Sob condições de temperatura ideais, próximo de 27°C, a fase pupal tem uma duração média de 2 dias. A taxa de mortalidade entre pupas é extremamente baixa, o que sugere que o número de pupas encontradas no reservatório corresponde diretamente ao número de adultos que irão se desenvolver (CARVALHO; MOREIRA, 2017; LEVI et al., 2014; VALLE, D; PIMENTA, DN; CUNHA, 2015).

Uma muda final ocorre após a liberação da exúvia pupal resultando no aparecimento do *imago*, a fase adulta. Para completar o ciclo, ocorre a copulação, conduzindo a fertilização das fêmeas e seguido em seu devido tempo, pela ovoposição. Após a copulação, as fêmeas armazenam o fluido seminal em uma estrutura chamada *espemateca*, que permite que o esperma permaneça viável indefinidamente. Fêmeas podem produzir ovos férteis para o resto da sua vida sem necessidade de cópula adicional (CARVALHO; MOREIRA, 2017; VALLE, D; PIMENTA, DN; CUNHA, 2015).

A. aegypti é a espécie mais sinantrópica dentro da família *Culicidae*, sempre em convivência com seres humanos (CARVALHO; MOREIRA, 2017). O mosquito é muito bem adaptado a ambientes urbanos, ocupa áreas de habitação humana com ou sem vegetação, alimenta-se, descansa e deposita ovos tanto em ambientes fechados, quanto abertos (FELLNER, 2016). A notável associação do mosquito vetor com humanos e com ambientes urbanos é um desafio para a saúde pública (LIMA-CAMARA, 2016).

As fêmeas grávidas procuram áreas com água parada, preferencialmente limpas, com pouca matéria orgânica decomposta, na qual irão realizar a ovoposição. Embora este seja um comportamento conhecido, a espécie apresenta um comportamento oportunista e frequentemente está presente em áreas com condições abaixo do ideal e podem utilizar reservatórios com alta taxa de matéria orgânica (PAPLOSKI et al., 2016). Comumente, a espécie tem preferência por contêineres coloridos ou que possuem um interior escuro, geralmente em áreas sombreadas. Esse comportamento está provavelmente relacionado a aversão à luz ou fotofobia apresentada pelas fases imaturas de desenvolvimento da espécie (CARVALHO; MOREIRA, 2017; CHRISTOPHERS, 1961). Os ovos são depositados individualmente por adesão as paredes do reservatório, usualmente em locais úmidos acima da superfície da água, quando o nível da água dentro do reservatório sobe, os ovos são inundados e eclodem, reiniciando o ciclo.

Quanto ao comportamento alimentar, a espécie é classificada como ectoparasitas hematófagos temporários. Adultos de ambos os sexos se alimentam de substâncias açucaradas, principalmente de origem vegetal, entretanto as fêmeas precisam necessariamente de refeições sanguíneas para a maturação dos ovários e consequente formação de ovos. A alimentação sanguínea ocorre por solenofagia, o que favorece a ingestão de patógenos presentes no sangue (CHRISTOPHERS, 1961; LEHANE; LEHANE, 2005). A aquisição dos vírus frequentemente ocorre durante a nutrição sanguínea, após a ingestão o vírus se replica e é transmitido para um reservatório animal na refeição sanguínea seguinte (IOOS et al., 2014).

Os adultos da espécie *A. aegypti* são mosquitos altamente domesticados, sua alimentação sanguínea é quase exclusivamente realizada em humanos, preferencialmente diurna e tende a ser mais ativa ao amanhecer e entardecer, tipicamente descansando em ambientes fechados (BARGIELOWSKI; LOUNIBOS; CARRASQUILLA, 2013; SCOTT; TAKKEN, 2012) evitando os períodos mais quentes do dia. Apesar destas tendências comportamentais serem claras, a espécie é extremamente oportunista e pode realizar a hematofagia durante o dia ou noite, também é conhecida por ocupar ambientes com condições diferentes de sua preferência (CARVALHO; MOREIRA, 2017).

2.3 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE SOBRE O VETOR

Tendo em vista a ausência de intervenções terapêuticas específicas e eficazes, as estratégias de controle sobre o *A. aegypti* representam importantes ações de combate às arboviroses de maior carga no Brasil, particularmente dengue, chikungunya e zika. Segundo a OMS, medidas efetivas para o controle do vetor são etapas críticas para alcançar e sustentar a redução da morbidade atribuída às arboviroses. Intervenções no controle do vetor objetivam reduzir a população do mosquito e consequentemente diminuir a transmissão dos agentes etiológicos, decrescendo a incidência de infecções, o que contribui para prevenção de surtos de arboviroses. Existem exemplos históricos bem documentados da eliminação ou redução significativa tanto de dengue quanto febre amarela através do controle de *A. aegypti* (WHO, 2012).

2.3.1 Larvicidas atuais e suas limitações

Uma das principais abordagens utilizadas contra o mosquito é a redução da densidade da população de adultos. Esta categoria inclui duas principais estratégias: A primeira é baseada na eliminação de reservatórios apropriados para a eclosão de ovos e desenvolvimento de larvas, através da desidratação de reservatórios naturais ou artificiais. A segunda estratégia é o gerenciamento de fonte larval, *larval source management*, que utiliza inseticidas para matar as larvas do mosquito (PAVELA, 2015). As larvas apresentam uma mobilidade limitada e frequentemente são mais acessíveis que os insetos adultos, não podendo mudar seu habitat para evitar as estratégias de controle (FILLINGER; LINDSAY, 2011). Em geral, os principais agentes larvicidas são baseados em químicos organofosforados e agentes bacterianos (GOVINDARAJAN; BENELLI, 2016). Entretanto, atualmente o uso destes larvicidas tem apresentado problemas sérios (PAVELA, 2015). Além do efeito negativo dos inseticidas sintéticos ao meio ambiente e

a organismos não-alvo, incluindo o ser humano, a seleção artificial de indivíduos com fenótipos resistentes através do uso indiscriminado destes agentes é um dos problemas mais preocupantes (PAVELA; GOVINDARAJAN, 2017).

Um dos agentes químicos larvicida mais comumente utilizados para o controle do vetor da dengue é o composto organofosforado temefós (nome comercial: Abate), seu uso tem sido documentado desde 1965 (SZTANKAY-GULYÁS; LÁNG, 1972) para o eliminação de vetores em geral, embora poucos estudos existam relacionando-o especificamente ao *A. aegypti* (GEORGE et al., 2015). No Brasil, o organofosforado temefós foi o larvicida exclusivo por mais de 30 anos para o controle do mosquito (GOMES et al., 2016). Estudos indicam que após a utilização indiscriminada de agentes químicos organofosforados, populações de *A. aegypti* resistentes à temefós tem aumentado no Brasil (BELLINATO et al., 2016; DOS SANTOS DIAS et al., 2017; MELO-SANTOS et al., 2010). Em Cabo Verde, temefós tem sido utilizado para reduzir a população do mosquito desde 2009, quando ocorreu o primeiro caso diagnosticado de dengue. Em 2015, Rocha e colaboradores publicaram a presença de populações resistentes a temefós (ROCHA et al., 2015). Goindin e colaboradores relataram o aparecimento de populações de *A. aegypti* resistentes a temefós nas ilhas de Guadalupe e São Martinho, onde o composto foi utilizado por 40 anos como inseticida e larvicida (GOINDIN et al., 2017).

Resíduos de temefós, mesmo em concentrações muito baixas (1-25 ppm) causam efeitos tóxicos graves em espécies não-alvo, destacando-se destruição de cartilagens, morte celular em larga escala, hipertrofia e descamação (BA-OMAR; AL-JARDANI; VICTOR, 2011). Em humanos a exposição a inseticidas organofosforados causa o estresse oxidativo e danos genéticos, o que pode levar ao desenvolvimento de câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (ZEPEDA-ARCE et al., 2017). Temefós pode ainda apresentar potenciais efeitos de interrupção do sistema endócrino nos ovários (MILLÁN-MEJÍA; GARCÍA-ZEPEDA; HERNÁNDEZ-OCHOA, 2016).

Posteriormente, agentes de controle microbiano foram introduzidos, *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Bti) é atualmente o larvicida mais comum utilizado em países europeus (BENELLI; CASELLI; CANALE, 2016), também tem sido empregado como medida de controle em estados brasileiros como Rio Grande do Sul, São Paulo e Pernambuco (POLANCZYK; GARCIA; ALVES, 2003). *B. thuringiensis* produz um corpo parasporal, uma proteína cristalina que se forma ao redor do esporo bacteriano durante fase estacionária. O cristal é composto em sua maioria por δ -endotoxinas que se

dissolvem no intestino das larvas do mosquito, tornando-se fragmentos tóxicos. As células do tecido epitelial do intestino médio incham e estouram causando a morte do inseto (HÖFTE; WHITELEY, 1989). *Bacillus sphaericus*, outra bactéria comumente utilizada como larvicida, produz uma toxina binária. Assim como Bti, as toxinas ingeridas pelas larvas são solubilizadas no intestino médio alcalino e clivadas por proteases em uma fração proteica ativa. Os dois componentes da toxina, BinA e BinB se ligam a receptores específicos na membrana celular das células epiteliais do ceco gástrico e intestino médio, provocando a formação de poros e consequente permeabilização, o que resulta no desequilíbrio osmótico, lise celular e finalmente, morte do inseto. (LACEY, 2007).

As toxinas bacterianas não causam danos a humanos e outros organismos não-alvo (BALDACCHINO et al., 2015). Entretanto, há dois problemas associados à utilização do Bti, o baixo efeito residual das formulações existentes no mercado, o que resulta na necessidade de várias aplicações do produto e o aparecimento de cepas de insetos resistentes (MOREIRA; MANSUR; FIGUEIRA-MANSUR, 2012). Além disso, tais agentes larvicidas não são formulados em sistemas que os protejam contra elementos externos de degradação ou permitam sua liberação controlada, demandando repetidas exposições com curtos períodos de ação larvicida.

Atualmente, nenhuma dessas estratégias aplicadas individualmente é completamente bem sucedida (BENELLI; CASELLI; CANALE, 2016). Portanto, novas abordagens sobre a tecnologia de larvicidas devem impactar positivamente o controle do mosquito, contribuindo para reduzir a circulação viral e a incidência das arboviroses associadas. Segundo a OMS, o inseticida ideal deve ser efetivo, ecológica e economicamente viável, sustentável, além de exibir baixa toxicidade em mamíferos. Adicionalmente larvicidas não devem mudar significativamente as características da água no meio ambiente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

2.4 PRODUTOS NATURAIS: UMA ALTERNATIVA PROMISSORA

Entre as estratégias alternativas existentes, inseticidas baseados em compostos botânicos, tais como óleos vegetais, óleos essenciais e oleoresinas são, atualmente, uma das abordagens mais promissoras (PAVELA, 2015). Inseticidas de origem botânica são atrativos porque contém fontes abundantes e variadas de compostos bioativos (GOVINDARAJAN; RAJESWARY; BENELLI, 2016). Dentro deste grupo, os óleos essenciais (OE) são considerados a melhor alternativa para o controle de vetores

arbovirais (BILAL; HASSAN, 2012; LIU et al., 2013; MAHESWARAN; IGNACIMUTHU, 2012; WARIKOO; WAHAB; KUMAR, 2011).

Os critérios para caracterizar o potencial larvicida de produtos naturais variam de acordo com os autores. Kiran et al, consideram que compostos com $LC_{50} < 100$ ppm exibem efeito larvicida significante (RAVI KIRAN et al., 2006). Komalamisra et al, estabeleceram que produtos apresentando $LC_{50} < 50$ ppm são ativos, $50 \text{ ppm} < LC_{50} < 100$ ppm moderadamente ativos, $100 \text{ ppm} < LC_{50} < 750$ ppm efetivos e $LC_{50} > 750$ ppm são inativos (KOMALAMISRA et al., 2005). Cheng et al determinaram como critério que compostos com $LC_{50} > 100$ ppm são considerados não ativos, $LC_{50} < 100$ ppm são ativos, e aqueles que apresentam $LC_{50} < 50$ ppm são altamente efetivos (CHENG, 2003). Segundo Montenegro, o potencial larvicida de produtos naturais pode ser avaliado considerando os níveis de mortalidade após 48 horas de exposição à amostras em 250 ppm, dessa forma, quando ocorre 75% de morte o produto é considerado promissor, $>50\%$ e $<75\%$ parcialmente promissor, $>25\%$ e $<50\%$ fracamente promissor, $< 25\%$ inativo (MONTENEGRO et al., 2006). Portanto, resultados satisfatórios estão associados às amostras que induzem níveis de mortalidade maiores que 75% em 250 ppm ou apresentando valores de LC_{50} abaixo de 100 ppm.

Em 2014, Dias e Moraes revisaram estudos acerca de 361 óleos essenciais que apresentam atividade larvicida, provenientes de 260 espécies de plantas contra *A. aegypti* (DIAS; MORAES, 2014). Em 2015, Pavela revisou 89 óleos essenciais advindos de 26 famílias do reino *Metaphyta*, todos com eficiência larvicida contra *A. aegypti* com LC_{50} abaixo de 100 ppm (PAVELA, 2015). OEs são definidos como óleos voláteis constituídos por misturas complexas de metabólitos secundários, tais como: fenilpropanóides, mono-, sesqui- e diterpenos (ADLARD, 2016). As misturas químicas complexas são formadas por diversos compostos estruturalmente diferentes, dificultando sua separação. Estes compostos se apresentam em diferentes proporções, sendo caracterizados como majoritários e minoritários. Em geral, a bioatividade dos óleos essenciais é correlacionada as substâncias majoritárias. Entretanto, é importante notar que esses metabólitos secundários podem facilitar interações que aumentam ou diminuem a atividade larvicida dos óleos testados (WALIWITIYA; KENNEDY; LOWENBERGER, 2009). Estes compostos podem atuar sinergicamente e são mais efetivos que os compostos isolados (DIAS; MORAES, 2014).

OEs podem interferir no comportamento alimentar dos artrópodes, atuar como um regulador de crescimento ou agir como neurotoxina, entre os mecanismos larvicidas de

toxicidade, os OEs atuam como desnaturantes proteicos, inibidores enzimáticos, além de promoverem a desintegração da membrana plasmática (BALDACCHINO et al., 2015; DIAS; MORAES, 2014). Muitos autores defendem que a exposição às misturas complexas e variáveis de constituintes botânicos bioativos e seus diferentes modos de ação podem diminuir ou retardar a chance de resistência nas populações de mosquitos (DIAS; MORAES, 2014; ISMAN, 2000; OKUMU; KNOLS; FILLINGER, 2007; PAVELA, 2015). Ademais, a maioria dos compostos presentes em OEs são seletivos, apresentando baixo ou nenhum efeito prejudicial a organismos não alvo (DURINGER et al., 2010) principalmente em mamíferos (DURINGER et al., 2010; GOVINDARAJAN; RAJESWARY; BENELLI, 2016).

Geralmente, os OEs são considerados seguros ao meio ambiente e organismos não alvo, entretanto alguns exibem toxicidade contra pequenos vertebrados e crustáceos, incluindo espécies de zooplânctons (ÇAKAL ARSLAN et al., 2014; CONTI et al., 2014). Embora haja na literatura OEs apresentando efeito tóxico à organismos não alvo, esta toxicidade depende da concentração aplicada e do tempo de exposição. Pavela, demonstrou que OEs de Anis (*Pimpinella anisum*) é tóxico para *Daphnia magna* (zooplâncton) reduzindo sua taxa de fertilidade após longa exposição a concentrações do óleo acima de 500 ppm. Por outro lado, nenhum efeito foi observado em baixas concentrações ou exposições mais curtas, as mesmas condições e concentrações que foram suficientes para alcançar uma mortalidade de 100% em larvas do mosquito (PAVELA, 2014). A toxicidade de alguns OEs em peixes também tem sido estudada. OEs podem exercer um efeito anestésico ou sedativo em peixes, porém esse efeito é gradualmente diminuído em função do tempo e concentração (SILVA et al., 2015). Ainda assim a toxicidade em organismos não alvo é muitas vezes menor em comparação ao efeito nocivo causado por agentes químicos, como temefós (VASANTHA-SRINIVASAN et al., 2017). O impacto ao meio ambiente é muito reduzido devido a rápida biodegradabilidade dos compostos bioativos (CHENG, 2003; GOVINDARAJAN; RAJESWARY; BENELLI, 2016), o que pode refletir em baixos níveis de bioacumulação e efeitos tóxicos crônicos causados por frações residuais.

A produção de óleos essenciais é comumente mais barata que componentes individuais que devem ser isolados ou sintetizados (BALDACCHINO et al., 2015), adicionalmente as espécies vegetais que dão origem aos óleos essenciais estão disponíveis localmente na maioria das regiões do mundo mais afetadas por arboviroses (SILVA et al., 2008) e por serem advindas de fontes renováveis são amplamente aceitas pela

população (BALDACCHINO et al., 2015; DIAS; MORAES, 2014). Considerando esse aspecto, a utilização de diversos OEs como larvicida seria viável no Brasil. O país apresenta ampla biodiversidade em recursos naturais, a maioria das espécies estudadas são facilmente encontradas em seu território e muitas espécies nativas têm sido estudadas como potenciais fontes de óleos essenciais com ação larvicida. Óleos essenciais são candidatos proeminentes uma vez que, em alguns casos, são altamente ativos, disponíveis em países tropicais e economicamente viáveis (SILVA et al., 2008).

2.4.1 Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

Melaleuca alternifolia, também conhecida como casca de papel (*narrow-leaved paperbark*), em referência as finas cascas que espontaneamente se desassociaam do caule ou árvore do chá (*narrow-leaved tea-tree*), é uma espécie botânica da família *Myrtaceae*, o gênero *Melaleuca* consiste de 290 espécies distribuídas quase inteiramente na Austrália e sudeste da Ásia. *Melaleuca* é a matéria prima de diversas indústrias distribuídas no mundo predominantemente especializadas na extração de óleos essenciais da folhagem de três espécies principais: *Melaleuca alternifolia*, *M. cajuputi subsp cajuputi* e *M. quinquenervia*. A relevância econômica das espécies é refletida pela taxa de produção de óleo essencial por ano, somente na Austrália 3.000 hectares são utilizados para o cultivo de *M. alternifolia*, alcançando a produção 450-500 toneladas de óleo essencial por ano, mas a estimasse que a área de plantio e a produção de óleo no mundo é potencialmente duas vezes maior em diversos países, incluindo China (BROPHY; CRAVEN; DORAN, 2013). A base do interesse comercial no óleo essencial da *Melaleuca alternifolia* (TTO=*tea tree oil*) e o desenvolvimento industrial utilizando plantações da espécie dentro e fora da Austrália começaram por volta da década de 20, onde as propriedades fitoterápicas do óleo foram primeiramente estudadas e publicadas, o terpinen-4-ol produzido a partir do óleo de *M. alternifolia* foi identificado como um potente agente antimicrobiano (PENFOLD; GRANT, 1925). Desde de então, as propriedades do óleo essencial têm sido extensamente investigadas demonstrando ampla atividade biológica: anti-inflamatório (CALDEFIE-CHÉZET et al., 2006; HART et al., 2000), anticancerígeno (NAKAYAMA et al., 2017), antiviral contra vírus influenza (GAROZZO et al., 2009, 2011), vírus do mosaico do tabaco (BISHOP, 1995) e Herpes vírus (SCHNITZLER; SCHÖN; REICHLING, 2001), fungicida e bactericida (amplamente revisado em (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006b)), antiparasitário (BENELLI et al., 2013; GÓMEZ-RINCÓN et al., 2014; GRANDO et al., 2016;

MADALOSSO et al., 2017), repelente e inseticida contra moscas, carrapatos e besouros (BENELLI et al., 2013; BUSTOS-SEGURA; KÜLHEIM; FOLEY, 2015; YIM et al., 2016). Embora até o presente momento o potencial larvicida de *M. alternifolia* não tenha sido estudado, diversas espécies do gênero *Melaleuca* apresentam efeito tóxico sobre larvas do *Aedes aegypti*: *M. dissitiflora*, *M. quinquenervia*, *M. linariifolia* e *M. uncinata* (PARK et al., 2011) e *M. leucadendron* (AMER; MEHLHORN, 2006).

2.4.2 Principais limitações na aplicação de produtos naturais como larvicidas

OEs e outros produtos naturais apresentam uma série de limitações físico-químicas que impedem sua utilização direta como agente larvicida. Pavela cita pelo menos duas: (1) A composição química dos compostos vegetais é bastante variável, o que também resulta em variações significantes na eficiência biológica. Plantas aromáticas de uma única espécie podem sintetizar diferentes metabólitos secundários em concentrações variáveis, e essas diferenças na síntese podem ser condicionadas geneticamente, condições climáticas e pedológicas. Sobre essa limitação, Dias e Moraes acrescentam que a toxicidade dos OEs contra as larvas do mosquito pode variar significativamente dependendo da parte da planta utilizada para extração do óleo e a idade da planta (DIAS; MORAES, 2014). (2) São degradados rapidamente no meio ambiente ou os compostos evaporam e assim sua eficiência declina (PAVELA, 2015). Além da alta volatilidade, produtos naturais são considerados quimicamente instáveis por facilmente sofrerem degradação por oxidação, exposição à luz, temperaturas moderadas (CHRISTOFOLI et al., 2015) e umidade (BILIA et al., 2014). Na maior parte dos casos, óleos essenciais, óleos vegetais e óleo resinas são constituídos por substâncias pouco solúveis em água (RODRIGUES et al., 2014), o que reflete em baixa biodisponibilidade e dispersão no nicho característico das larvas de *A. aegypti*.

2.5 NANOTECNOLOGIA ASSOCIADA A PRODUTOS NATURAIS: INOVAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE LARVICIDAS

O desenvolvimento de tecnologias de formulação que possam viabilizar a utilização de produtos naturais representam novas estratégias para garantir sua aplicação larvicida. A nanotecnologia – ciência relacionada ao desenho, síntese, caracterização e aplicação de sistemas em escala nanométrica (1-1000 nm) (PUNDIR, 2015) –, tem sido utilizada em diversas áreas com o intuito de fornecer estratégias para solucionar limitações inerentes as propriedades físico-químicas de moléculas bioativas. Os atributos

dos sistemas nanoestruturados representam uma oportunidade de inovação para o desenvolvimento de uma formulação larvicida à base de produtos naturais, tornando possível o aumento da solubilidade dos compostos bioativos e a proteção contra a radiação solar. Atualmente, destacam-se dois modelos nanométricos associados a produtos naturais propostos e adequados para atuar como larvicidas para o controle do *Aedes aegypti*: Nanoemulsões e Nanopartículas de prata biosintetizadas.

2.5.1 Nanoemulsões

Nanoemulsões (NE) são sistemas dispersos constituídos por dois líquidos imiscíveis frequentemente estabilizado por um ou mais surfactantes, apresentam gotículas de dimensões diminutas, entre 20-200 nm, possibilitando o desenvolvimento de soluções transparentes ou translúcidas (SOLÈ et al., 2012). Os métodos para preparação de nanoemulsões são basicamente classificados em dois grupos principais: de alta e baixa energia. Métodos de alta energia envolvem equipamentos específicos, *High-shear stirring*, homogeneizadores de alta pressão e ultrasonicadores. Métodos de baixa energia usam as propriedades físico-químicas do sistema e frequentemente envolvem inversão de fases. Possivelmente, a principal vantagem da NE sobre emulsões convencionais é viabilizar a produção de sistemas cineticamente estáveis com baixas concentrações relativas de surfactantes, prevenindo comportamento de instabilidade indesejados, tais como, separação gravitacional ou agregação de partículas (TADROS et al., 2004). Como estratégias para o desenvolvimento de larvicidas associados a produtos naturais, nanoemulsões apresentam características úteis para dispersar substâncias apolares ativas em meios hidrofílicos.

Em 2014, Rodrigues, E. e colaboradores publicaram o desenvolvimento de potenciais nanoemulsões larvicidas a partir de tween 80 e a óleo resina de Copaiba (*Copaifera duckei*) utilizando um método de alta energia. A estratégia permitiu o uso do composto hidrofóbico em soluções aquosas, melhorando sua biodisponibilidade. As nanoemulsões recém produzidas apresentaram tamanhos entre 140-150 nm, baixa polidispersão e manutenção da estabilidade por 1 mês. Testes larvicidas contra o *Aedes aegypti* foram realizados, após 24 horas de exposição à 250 ppm da nanoformulação, $73,3 \pm 11,5\%$ das larvas morreram e em 48 horas $93,3 \pm 11,5\%$ (RODRIGUES et al., 2014). Em 2015, Duarte, J. e colaboradores obtêm nanoemulsões por um método de baixa energia, compostas por Tween 20 e o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, uma espécie de alecrim. Investigações físico-químicas e de estabilidade, demonstraram que

nanoemulsões recém produzidas apresentaram tamanhos médios de $50,15 \pm 1,31$ nm com dispersão bimodal, porém no final de um mês os tamanho aumentaram para $184 \pm 4,13$ nm com dispersão monomodal, evidenciando sinais de contínua desintegração e reassociação de micelas. Os estudos larvicida demonstraram que em 250 ppm, houve $80 \pm 10\%$ de mortalidade após 24 horas e $90 \pm 10\%$ após 48 horas (DUARTE et al., 2015).

Em 2016, Oliveira, A. et al, apresentaram estudos mais elaborados investigando a atividade larvicida e a toxicidade aguda em organismos não alvo de nanoemulsões do óleo de Sucupira, *Pterodon emarginatus* Vogel. Através de um método de emulsificação de baixa energia os autores obtiveram nanoemulsões de $125,1 \pm 0,5$ nm, com baixa polidispersão ($0,175 \pm 0,014$). Após 60 dias não houve mudanças significativas no tamanho e PDI. Ensaio larvicidas contra o *A. aegypti* demonstraram que os grupos tratados com nanoemulsões do óleo de sucupira em concentrações de 250 ppm apresentaram 100% de mortalidade após 24 horas. Estudos de toxicidade aguda em organismos não-alvo foram realizados no modelo camundongo *Swiss albino* (*Mus musculus*), após 14 dias de alimentação diária com doses de 50, 125 e 250 ppm, não houve alterações comportamentais, morte ou mudanças macroscópicas em órgãos vitais. Além disso, não foram observadas mudanças significantes no peso e mudanças nutricionais, sugerindo que nanoemulsões de *P. emarginatus* podem não ser tóxicas para mamíferos.

2.5.2 Nanopartículas metálicas p

A produção e aplicação de nanopartículas metálicas produzidas por síntese verde (NMV) tem sido extensamente estudada, apresentando-se como uma estratégia promissora da bionanotecnologia, revisado em (BENELLI, 2016; DOS SANTOS et al., 2014; IRAVANI, 2011; MONDAL et al., 2014). Durante a última década, tem sido demonstrado que muitos sistemas biológicos podem transformar íons metálicos inorgânicos em nanopartículas metálicas através da capacidade redutora de proteínas e outros metabólitos presentes nesses organismos (IRAVANI, 2011).

In vivo, tem sido bem estabelecido que plantas são capazes de reduzir metais iônicos em diversos tecidos e órgãos afastados dos sites de penetração iônica, processo conhecido como bioacumulação. Estudos acerca da bioacumulação de metais em vegetais demonstram que, usualmente, os íons metálicos são depositados na forma de nanopartículas (GARDEA-TORRESDEY et al., 2002; MANCEAU et al., 2008; MARCHIOL et al., 2014). Através de espectroscopia de infravermelho (FTIR), provou-se que metabólitos vegetais como açúcares, terpenóides, polifenóis, alcaloides, ácidos

fenólicos e proteínas desempenham papel importante na redução de íons metálicos e subsequente formação de nanopartículas, além de implementar a estabilidade aderindo-se a superfície. (SHANKAR et al., 2003, 2004; SONG; KIM, 2009; SONG; KWON; KIM, 2010; VILCHIS-NESTOR et al., 2008).

Dessa forma, extratos vegetais têm sido considerados plataformas atrativas para a síntese de nanopartículas metálicas. O processo de produção de nanopartículas metálicas através de extratos vegetais aquosos – metodologia biotecnológica conhecida como *Green synthesis*, *Plant-mediated synthesis* ou *Botanical mediated synthesis* – ocorre de forma muito mais rápida que a síntese *in vivo*, a reação de redução acontece quase instantaneamente, além disso, essa abordagem provê um controle flexível sobre o tamanho e forma das nanopartículas através de mudanças de pH e temperatura do meio de reação (IRAVANI, 2011). Esta técnica também apresenta vantagens sobre métodos físicos e químicos por ser mais barata e rápida, além de não necessitar de alta pressão, temperatura ou o uso de agentes químicos tóxicos (KUMAR; LATHER; PANDITA, 2015). Esta metodologia tem sido efetiva na produção de nanopartículas a partir de diferentes espécies vegetais em combinação com uma variedade de ácidos e sais metálicos, tais como cobre, ouro, prata, platina, ferro e diversos outros (AZARUDEEN et al., 2017; BALASUBRAMANI et al., 2015; HUANG et al., 2014; NAIKA et al., 2015). Considerando a grande variedade de biomoléculas que podem atuar na formação de nanopartículas e os diversos compostos que se aderem à sua superfície, muitas técnicas são adotadas para caracterização das partículas recém-formadas: análise por espectrofotometria por UV-visível, Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIV), microscopia eletrônica, análise por espalhamento de luz dinâmico, entre outros.

Em resumo, o mecanismo de síntese de nanopartículas metálicas em extratos vegetais incluem três fases principais: 1) Fase de ativação, onde ocorre a redução de íons metálicos e posterior nucleação dos átomos metálicos; 2) Fase de crescimento, onde pequenas nanopartículas adjacentes espontaneamente coalescem formando partículas de tamanho maior, processo acompanhado pelo aumento da estabilidade termodinâmica das nanopartículas. Essa etapa está intimamente relacionada com a capacidade do extrato vegetal em estabilizar as nanopartículas; 3) Processo de terminação, determina a forma final das nanopartículas (IRAVANI, 2011).

Atualmente, um crescente número de extratos vegetais tem sido proposto para produção de nanopartículas de prata (AgNP) com excelentes propriedades larvicidas

contra o *A.aegypti*. Em 2013, Veerakumar e colaboradores demonstraram que AgNPs com tamanho médio de 25 nm obtidas através da redução em extratos da folha de *Sida acuta* apresentaram atividade larvicida aproximadamente 5 vezes mais potente que seu extrato bruto (VEERAKUMAR; GOVINDARAJAN; RAJESWARY, 2013). Notavelmente, a maioria dos estudos de toxicidade de AgNPs sobre larvas de *A.aegypti*, apresentam valores de LC50 e LC90 muito baixos, usualmente concentrações inferiores a 50 ppm (tabela 1).

Tabela 1 Atividade larvicida de nanopartículas de prata sobre *Aedes aegypti*.

| Espécie utilizada | LC₅₀ (ppm) | LC₉₀ (ppm) | E/AgNp | Referência |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------|---|
| <i>Sida acuta</i> | 23,96 | 44,05 | 4,85 | (VEERAKUMAR; GOVINDARAJAN; RAJESWARY, 2013) |
| <i>Rhizophora mucronata</i> | 0,891 | 6.291 | - | (BALAKRISHNAN; SRINIVASAN; MOHANRAJ, 2016) |
| <i>Achyranthes aspera</i> | 3680 | 8920 | 22,23 | (ELUMALAI et al., 2016) |
| <i>Belosynapsis kewensis</i> | 84,2 | 117,3 | - | (BHUVANESWARI; XAVIER; ARUMUGAM, 2016) |
| <i>Leucas aspera</i> | 4,02 | 11,22 | 9,04 | (ELUMALAI et al., 2017) |
| <i>Rubus ellipticus</i> | 13,83 | 26,58 | 13,32 | (ALQAHTANI et al., 2017) |
| <i>Merremia emarginata</i> | 9,2 | 17,86 | 16,89 | (AZARUDEEN et al., 2017) |

LC₅₀ e LC₉₀ de nanopartículas de prata sobre larvas de *A. aegypti*.

E/AgNp = Aumento de toxicidade de nanopartículas em relação ao extrato aquoso da espécie utilizada. Relação foi feita utilizando valores de LC₉₀ do extrato da planta/LC₉₀ da nanopartícula de prata sintetizada.

Segundo alguns autores, o efeito larvicida de AgNps pode ser atribuída a sua capacidade de penetrar o exoesqueleto das larvas permitindo que as nanopartículas possam interagir com a matriz lipoprotéica extracelular e espaço intracelular. No citoplasma as nanopartículas ligam-se a proteínas que contêm enxofre ou componentes biológicos que contenham fósforo, como DNA e RNA, levando a desnaturação de organelas e enzimas. Ocorre então a indução de mudanças na permeabilidade da membrana celular e distúrbios na força próton motriz, necessária para síntese de ATP, causando a perda de função celular e finalmente morte (AZARUDEEN et al., 2017; ELUMALAI et al., 2016; RAJ; VISWANATHAN, 2009; SAP-IAM et al., 2010). Por outro lado, é possível que moléculas bioativas presentes nos extratos se liguem à superfície das nanopartículas de prata por adsorção, melhorando sua dispersão no meio e consequente apresentação às larvas, essa interação pode ser também responsável por melhorar a estabilidade dos componentes bioativos e aumentar a efetividade larvicida.

Concomitantemente, AgNPs apresentam características físico-químicas desejáveis, em geral, tamanhos abaixo de 50 nm e alta estabilidade mesmo após períodos de 1 ano em soluções aquosas (PINTO et al., 2010; SAWARE; VENKATARAMAN, 2014), embora tais fatores sejam completamente alterados em função dos agentes redutores e das biomoléculas aderidas à superfície das nanopartículas (MACCUSPIE, 2011).

Diversos estudos avaliando larvicidas baseados em AgNPs foram publicados alcançando abordagens extremamente efetivas e alta estabilidade. Por outro lado, Giovanni Benelli ressalta que, limitadas investigações têm sido conduzidas para esclarecer a toxicidade de nanopartículas metálicas biosintetizadas sobre organismos não alvo (BENELLI, 2016). As informações acerca da toxicidade associados a utilização de nanopartículas de prata é escassa e por vezes, conflitante. Por um lado, alguns estudos de toxicidade aguda demonstraram que AgNPs biosintetizadas não induzem efeitos tóxicos em peixes da espécie *Poecilia reticulata* quando submetidos a concentrações de LC₅₀ para larvas (HALDAR; HALDAR; CHANDRA, 2013; PATIL et al., 2012; SUBARANI; SABHANAYAKAM; KAMARAJ, 2013), outras pesquisas utilizando peixe zebra (*Danio rerio*), truta marron (*Salmo trutta*) e poleiro (*Perca fluviatilis*) indicaram que nanopartículas de prata induzem alterações genéticas do gene p53, correlacionado a regulação do crescimento celular, penetração e acúmulo no sistema circulatório, guelras, cérebro, sistema nervoso, núcleo celular e indução de aberrações morfológicas, revisado em (FABREGA et al., 2011).

Da mesma forma, existe certa preocupação no potencial efeito toxicológico de AgNPs em mamíferos. Em 2013, De-Jong WH et al realizaram estudos sobre a toxicidade sistêmica de AgNPs de 2-100 nm em ratos durante 28 dias, usando administrações intravenosas. Ratos tratados com AgNPs demonstraram aumento severo no tamanho do baço com crescimento das populações de linfócitos B e T. Em estudos histopatológicos de tecidos afetados demonstrou-se acumulação de AgNPs no baço, fígado, linfonodos e outros órgãos, além de significativo dano a fígado (DE JONG et al., 2013). Xia e colaboradores investigaram o efeito tóxico sobre células do fígado de camundongos, eles observaram mitocôndrias com tamanhos anormais, deformação e ruptura celular (XIA et al., 2006). Outros estudos confirmam que AgNPs diminuem a viabilidade celular através de indução de genes relacionados a apoptose (CHA et al., 2008; LEE et al., 2011). Outras investigações concluem que AgNPs causa danos ao DNA (WANG; KIRSCH, 2006) e acumulação de espécies reativas de oxigênio (RAHMAN et al., 2009).

Além de nanoemulsões e nanopartículas metálicas biosintetizadas, outros nanosistemas com propriedades larvicidas contra *A. aegypti* foram desenvolvidos, mas pouco estudados: nanopartículas de sílica (BARIK; KAMARAJU; GOWSWAMI, 2012) e nanogéis (ABREU et al., 2012). Diante das limitações apresentadas nas atuais abordagens nanotecnológicas para o desenvolvimento de larvicidas estáveis e seguros, este trabalho propõe a associação de produtos naturais à nanopartículas poliméricas (NPs).

2.5.3 Nanopartículas poliméricas como sistemas potenciais

O termo “nanopartículas poliméricas” engloba nanocápsulas (NC) e nanoesferas. (Figura 2). Nanocápsulas são sistemas vesiculares onde o composto ativo se localiza no interior da partícula, geralmente dissolvido em um veículo de núcleo oleoso. Nanoesferas, entretanto, são sistemas de tipo matricial onde o ativo geralmente se encontra disperso no interior da matriz polimérica (DE JONG; BORM, 2008; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

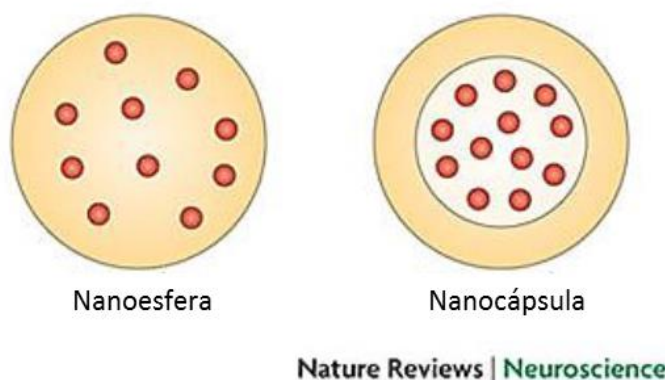


Figura 4. Representação ilustrativa de nanoesferas e nanocápsulas. O princípio ativo está representado em vermelho, na nanoesfera disperso na matriz polimérica, na nanocápsula no interior oleoso (ORIVE et al., 2009).

NPs têm sido aplicadas em diversas áreas de pesquisa pela capacidade de absorver e transportar compostos bioativos (DE JONG; BORM, 2008) e sua aplicação como sistemas de liberação têm sido estudada como uma alternativa eficiente para incrementar a solubilidade aquosa de compostos apolares (KALEPU; NEKKANTI, 2015; PARK, 2007), modulando a cinética de liberação do composto associado (BANIK; FATTAHI; BROWN, 2015). Devido a sua natureza matricial ou capsular NPs podem aumentar a estabilidade físico-química de substâncias ativas, protegendo-as da interação com o ambiente (CHRISTOFOLI et al., 2015; F. ROCHA FORMIGA, E. ANSORENA, 2009)

ou diminuir a evasão de compostos voláteis, aumentando sua bioatividade (BILIA et al., 2014).

Compostos de natureza biocompatível e biodegradável podem ser empregados como matriz constitucional, causando menor impacto ao meio ambiente e espécies não alvo, diversos polímeros sintéticos biodegradáveis podem ser utilizados para obtenção de NPs: ácido poliláctico (PLA), poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico (PLGA), poli(ϵ -Caprolactona) (PCL), poli(aminoácidos), além de polímeros naturais como quitosana, alginato, gelatina e albumina (ZHANG et al., 2013). Os métodos de produção são versáteis, sendo possível projetar NPs que variam em composição, tamanho, forma e propriedades de superfície (COUVREUR; VAUTHIER, 2006). A superfície de partículas nanométricas podem ser funcionalizadas, resultando em novas propriedades (TANAKA; CHUJO, 2014), tais como, ligação à substratos específicos, direcionamento, polaridade e redução de imunogenicidade (PETROS; DESIMONE, 2010).

Até o presente momento não foram publicados estudos envolvendo nanopartículas poliméricas associadas à produtos naturais objetivando o desenvolvimento de larvicidas contra o *A. aegypti*. Por outro lado, muitos artigos relatam o encapsulamento de diferentes óleos essenciais e extratos vegetais em nanopartículas poliméricas de diversas composições (tabela 2). Em comparação com outros métodos de preparação e polímeros utilizados, nanopartículas de PCL e seus copolímeros, produzidas por nanoprecipitação apresentaram melhores resultados de caracterização física e altos valores de eficiência de encapsulação. Em geral, os estudos alcançam resultados promissores: partículas abaixo de 300 nm, baixa dispersão de tamanho, potencial zeta próximos de 30 mV e eficiência de encapsulação acima de 80%.

Tabela 2 Resumo de estudos de desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo produtos naturais.

| Produto natural | Método de preparação | D.m. | PDI | Potencial Zeta (mV) | EE% | Método de quantificação | Referência |
|--|------------------------|-----------------------|------|---------------------|--------------|---|-----------------------------------|
| <i>Cymbopogon citratus</i> | Nanoprecipitação | 300 ± 110 | 0,27 | -6 ± 5,8 | NI | Espetrometria UV-visível (NIR) | (LIAKOS et al., 2016) |
| <i>Lippia sidoides</i> | Emulsão e Spray drying | 288 ± 40 | NI | -36,2 ± 2,6 | 48 ± 3 | Espetrometria UV-visível | (DE OLIVEIRA; PAULA; PAULA, 2014) |
| <i>Syzygium aromaticum</i> | Nanoprecipitação | 189 ± 4,6 | 0,24 | -30,3 ± 3,1 | 72,0 ± 3,6 | Cromatografia líquida de alta performace | (THONGGOOM et al., 2016) |
| <i>Garcinia mangostana</i> Linn ^a | Nanoprecipitação | 253,3 ± 8,6 | 0,05 | -30,9 ± 0,4 | 86,2 ± 3,9 | Espetrometria UV-visível | (PAN-IN et al., 2014) |
| <i>Garcinia mangostana</i> Linn ^a | Nanoprecipitação | 249,2 ± 13,1 | 0,07 | -11,7 ± 0,5 | 87,5 ± 4,1 | Espetrometria UV-visível | (PAN-IN et al., 2014) |
| <i>Própolis vermelho</i> ^a | Nanoprecipitação | 280,2 ± 8,7 | 0,09 | -26,8 ± 4,6 | 85,15 | Cromatografia líquida de ultra performace | (DO NASCIMENTO et al., 2016) |
| <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> | Nanoprecipitação | 457,6 ± 0,58 | NI | -26,12 ± 0,1 | 97,8 ± 0,10 | Espetrometria UV-visível | (CHRISTOFOLI et al., 2015) |
| <i>Nigella Sativa</i> | Nanoprecipitação | 230 – 260 | NI | -28 ± 4,1 | 83,33 | Cromatografia Gasosa | (BADRI et al., 2018) |
| <i>Lippia sidoides</i> | Emulsão-Difusão | 191,5 ± 19,8 | 0,17 | -42 | 52,1 ± 1,3 | Cromatografia líquida de alta performace | (PINTO et al., 2016) |
| <i>Geranium maculatum</i> | Dispersão de Fusão | 253 ± 22 ^b | 0,27 | NI | 77 ± 7 | Espetrometria UV-visível | (WERDIN GONZÁLEZ et al., 2017) |
| <i>Citrus bergamia</i> | Dispersão de Fusão | 239 ± 29 ^b | 0,2 | NI | 68 ± 5 | Espetrometria UV-visível | (WERDIN GONZÁLEZ et al., 2017) |
| <i>Mentha x piperita</i> | Dispersão de Fusão | 331 ± 12,84 | 0,55 | -4,58 ± 18,7 | 83,41 ± 4,31 | Pesagem | (KUMAR et al., 2014) |
| <i>Geranium maculatum</i> | Gelificação iônica | 439 ± 35 ^b | 0,36 | NI | 38 ± 4 | Espetrometria UV-visível | (WERDIN GONZÁLEZ et al., 2017) |
| <i>Citrus bergamia</i> | Gelificação iônica | 535 ± 42 ^b | 0,38 | NI | 22 ± 3 | Espetrometria UV-visível | (WERDIN GONZÁLEZ et al., 2017) |
| <i>Canela</i> | Gelificação iônica | 215 | 0,26 | NI | 19,93 | NI | (HU et al., 2015) |
| <i>Origanum vulgare</i> | Emulsão difusão | 40-80 | NI | NI | 47,69 | Espetrometria UV-visível | (HOSSEINI et al., 2013) |

D.m. = Diâmetro médio

EE% = Eficiência de encapsulação

NI = Não informado

^a = Extrato Vegetal

^b = Valores de Z-average

A nanoprecipitação é baseada na deposição interfacial de polímeros após o deslocamento de um solvente semi-polar miscível a água, da fase orgânica para fase aquosa (FESSI et al., 1989). Em resumo, o processo inclui quatro passos: (I) supersaturação, (II) nucleação, (III) crescimento e (IV) agregação (BARERAS-URBINA et al., 2016; MARTÍNEZ RIVAS et al., 2017; MILADI et al., 2016).

- (I) A supersaturação ocorre quando a solução contém mais soluto dissolvido que o valor de equilíbrio de saturação. De fato, a adição da fase aquosa na fase orgânica, diminui o potencial do solvente orgânico de dissolver o soluto, o que coloca o sistema em um estado de supersaturação.
- (II) Após a supersaturação, a etapa de nucleação ocorre afim de ganhar estabilidade termodinâmica. Flutuações locais na concentração causadas pela supersaturação levam à associação de moléculas do soluto formando núcleos primários, que por sua vez,
- (III) Aumentam em tamanho pela associação de moléculas de soluto até alcançar um tamanho crítico que é estável contra dissolução. (A etapa de nucleação continuará até que o crescimento dos núcleos anteriores esgote a supersaturação da solução, quando a concentração de soluto é reduzida abaixo da concentração de supersaturação crítica). Os núcleos crescem por condensação ou coagulação. Condensação é a adição de moléculas individuais à superfície da partícula.
- (IV) Por fim ocorre a coagulação ou agregação, onde partículas se aderem umas às outras, isso ocorre quando forças atrativas (Van Der Waals, interações hidrofóbicas) são mais fortes que interações repulsivas (repulsão estérica ou eletrostática) (MARTÍNEZ RIVAS et al., 2017)

Esta metodologia de produção de nanopartículas poliméricas tem muitas vantagens sobre outros métodos de encapsulação: simplicidade, é um processo rápido com boa reprodutibilidade e obtenção de partículas submicrômicas de dispersão estreita. Não é necessário usar grandes quantidades de solventes tóxicos, nem aplicação de alta energia, revisado em (MILADI et al., 2016). O processo pode ser alcançado com ou sem trabalho mecânico. Além disso, a preparação de nanopartículas por nanoprecipitação, diferentemente dos métodos emulsificação-difusão, emulsão-evaporação e precipitação por *salting-out*, não passa por uma etapa de emulsão precursora a formação de nanopartículas. (BARERAS-URBINA et al., 2016; GALINDO-RODRIGUEZ et al., 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar e avaliar o potencial larvicida de nanocápsulas poliméricas contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição química do óleo de *M. alternifolia* por cromatografia gasosa
- Produzir nanocápsulas poliméricas contendo o óleo essencial de *M. alternifolia* pelo método de nanoprecipitação
- Caracterizar as nanocápsulas quanto aos parâmetros físico-químicos estabelecidos na literatura para caracterização de nanomateriais
- Determinar o teor de óleo nas formulações e a eficiência de encapsulação
- Investigar a estabilidade físico-química das nanoformulações
- Realizar ensaios de citotoxicidade do óleo essencial de *M. alternifolia* em cultivos celulares
- Executar bioensaios para a determinação do LC₅₀ e LC₉₀ do óleo essencial de *M. alternifolia* livre (emulsionado) e nanoestruturado sobre larvas de *Aedes aegypti*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *M. alternifolia*

4.1.1 Análise por Cromatografia Gasosa

Para identificação de compostos voláteis, 1 microlitro de óleo foi diluído em 1 mL de metanol e a mistura foi agitada. Em seguida, 1 μL desta mistura foi injetado no sistema de cromatografia gasosa - espectrometria de massa (GC-MS) (Shimadzu GCMS-QP2010 Plus, quadrupolo único de alto desempenho, Kyoto, Japão) equipado com um injetor *split/splitless* no modo dividido (proporção dividida de 25,0) e à 250 °C durante a corrida cromatográfica. Os compostos orgânicos voláteis (COVs) foram separados numa coluna capilar (Rxi-1 MS 100% de dimetilpolisiloxano, 30 m \times 0,25 mm ID \times 0,25 μm , Restek, Bellefonte, EUA) usando hélio (99,99%) como gás transportador em um fluxo de 0,80 mL.min⁻¹. A temperatura foi variada da seguinte forma: 40 °C, depois aquecida a 80 °C, 2° C.min⁻¹ (3 min de espera), depois 0,5 °C min⁻¹ até 100 °C (3 minutos de espera), depois 5 °C min⁻¹ até alcançar 150 °C, depois 10 °C min⁻¹ até alcançar a temperatura de 300° C (tempo total 94,0 min). As condições do detector de massa foram: a temperatura da linha de transferência foi 250 °C, temperatura da fonte de íons, 250 °C e o modo de ionização com impacto de elétrons em 70 eV.

A identificação dos COVs foi alcançada (1) comparando os tempos de retenção de GC e os espectros de massa com os dos compostos padrão puros, quando disponíveis, (2) todos os espectros de massa também foram comparados com a biblioteca do sistema de dados (banco de dados NIST 147) e (3) Os valores do índice de retenção de Kovats (KI) foram determinados usando uma série homóloga de n-alcenos C8-C40 e estes valores foram comparados com valores relatados na literatura para colunas cromatográficas semelhantes. A porcentagem de picos individuais foi alcançada pela normalização da área de pico medida sem fatores de correção.

4.2 PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

De acordo com a composição das fases (Tabela 3), lotes de nanocápsulas vazias (NC-PCL-BLANK) e carregadas com óleo de *M. alternifolia* (NC-PCL-TTO) foram produzidas pelo método adaptado de nanoprecipitação (FESSI et al., 1989) a partir do polímero pré-formado.

Tabela 3 Composição das fases orgânica e aquosa utilizadas para produzir nanopartículas poliméricas através de nanoprecipitação

| | Fase Orgânica | Fase Aquosa |
|--------------------------------------|---------------|-------------|
| Poli(ϵ -Caprolactona) | 250 mg | |
| Span 60 (monoestearato de sorbitano) | 165 mg | |
| Óleo ^{1,2} | 75 mg | |
| Acetona | 67,5 ml | |
| Tween 80 (Polissorbato 80) | | 190 mg |
| Água bidestilada | | 132,5 ml |

¹ Triglicerídeo de cadeia média (MCT).

² Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*

Razão mássica: óleo/span 60 = 1:2,2. óleo/polímero = 1:3,3

A fase orgânica é previamente preparada, o monoestereato de sorbitano é solubilizado em acetona sob agitação magnética de 300 rpm, essa solução é purificada com o auxílio do filtro de seringa (porosidade, 0,22 μ m). Em seguida, o polímero é adicionado à solução filtrada e solubilizado sob agitação magnética em 40 °C. A solução orgânica é adicionada a um béquer contendo o óleo *M. alternifolia* (Sigma-Aldrich) e então a fase orgânica é solubilizada. Nesta primeira fase do projeto, para produção de nanocapsulas carregadas, foi utilizado o óleo essencial. A fase aquosa é solubilizada com o auxílio de agitadores magnéticos à 300 rpm, após isso, a fase orgânica é vertida levemente na fase aquosa sob agitação de 230 rpm, a solução final permanece sob esta agitação por 20 minutos. Em seguida, a solução final é mantida sob agitação magnética de 400 rpm overnight para eliminação completa da acetona.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

4.3.1 Tamanho, Índice de polidispersão (PDI), potencial zeta

As nanopartículas foram purificadas por ultracentrifugação (Beckman Coulter®, Avanti® J-26 XPI, EUA) a 20.000 g (rotor JA-12) em 60 minutos. O pellet formado foi ressuspendido em 15 ml de água destilada e a suspensão foi armazenada à temperatura ambiente para posterior caracterização.

As análises de tamanho e PDI foram realizadas por espalhamento de luz dinâmico à 25° C sob ângulo de espalhamento de luz de 90° no *Zetasizer Nano ZS90* (Malvern, Reino Unido). Este aparelho também foi utilizado para a determinação do potencial zeta por microeletroforese Doppler a laser. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e os gráficos plotados pelo Software 7.11 (Malvern, Reino Unido).

4.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão – MET

O contraste uranila aquosa foi centrifugado à 10.000 rpm por 10 minutos. 20 μL da amostra contendo dispersão coloidal foi adicionado sobre a grade de Formvar. Após 20 minutos o contraste de uranila foi adicionado, 1 minuto depois, o excesso foi retirado. Amostra foi analisada no microscópio eletrônico de transmissão JEM 1230 (Jeol LTD, Japão).

4.3.3 Microscopia de Força Atômica – MFA

A superfície morfológica das nanopartículas e seu perfil topográfico foram analisados utilizando um microscópio de força atômica (Shimadzu SPM-9700) no modo dinâmico, com velocidade de varredura de 1 Hz. As análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização Estrutural de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÓLEO NANOENCAPSULADO

O teor de óleo nanoencapsulado em amostras frescas foi obtido através do método analítico por espectrofotometria de UV-Vis desenvolvido e validado por Daiana Mirante (MIRANTE et al., 2018).

4.4.1 Determinação do comprimento de onda de maior absorção do óleo essencial de *M. alternifolia*

Inicialmente, uma solução etanólica do óleo essencial na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1 foi produzido e submetida a uma varredura no espectrofotômetro GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Scientific™) no intervalo de leitura de 200 a 1000 nm, para determinar o comprimento de onda de máxima absorção. Em paralelo, sob os mesmos parâmetros, foi realizado a varredura do álcool etílico absoluto e de nanoesferas de PCL vazias (NE- \emptyset) rompidas. Inicialmente, a dispersão de nanoesferas foi diluída (1:10) em álcool etílico, vortexada por aproximadamente 3 minutos e logo após submetida a centrifugação (MIKRO 22R, Hettich Zentrifugen®, Alemanha), 7980 G por 15 minutos, o sobrenadante foi coletado e submetido à varredura.

4.4.2 Desenvolvimento de curva analítica

Uma curva padrão relacionando absorvância x concentração foi construída a partir de soluções etanólicas do óleo em diferentes concentrações analisadas em triplicatas, 15; 20; 25; 30; 50; 100; 150 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. A linearidade foi determinada com base no cálculo de regressão

linear empregando mínimos quadrados, desta forma a equação da reta e o coeficiente de correlação foram obtidos. Posteriormente foi realizada uma simples validação da curva, soluções etanólicas do óleo essencial de *M. alternifolia* foram preparadas nas concentrações de 20, 30 e 50 µg/mL. A absorção de luz das amostras no comprimento de onda de 204 nm foi obtida, os valores foram plotados na regressão linear obtida, todas as análises foram realizadas em triplicata. A exatidão da medida foi calculada em erro relativo percentual (ER%) - Equação 1.

$$ER\% = \frac{\text{valor aferido} - \text{valor referência}}{\text{valor referência}} \times 100$$

4.4.3 Determinação da eficiência de encapsulação do óleo essencial de *M. alternifolia* em nanocápsulas de PCL

A quantificação de óleo essencial de *M. alternifolia* associado às nanocápsulas foi realizada pelo método indireto. Para quantificação do teor total de óleo na dispersão, uma alíquota da suspensão de nanocápsulas recém produzida foi diluída em etanol 1:10 v/v. A amostra foi vortexada por 3 minutos para rompimento das partículas e submetida à centrifugação (MIKRO 22R, Hettich Zentrifugen®, Alemanha), 7980g por 15 minutos, o sobrenadante foi coletado. Para quantificação de óleo livre, não encapsulado, as suspensões foram submetidas à ultrafiltração utilizando microtubos centrifugado sistema de filtração Amicon® Y10, 10.000 Mw (Milipore) à 14.000 rpm por 30 minutos para separação da fração livre dos constituintes do óleo. A alíquota ultrafiltrada foi diluída em etanol 1:2 v/v. Posteriormente, as amostras diluídas foram submetidas à análise de absorbância em 204 nm no espectrofotômetro GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Scientific™). A absorbância das amostras foi plotada na equação de linearidade. O valor obtido foi multiplicado pelo fator de diluição para obtenção da concentração de óleo total e livre. A eficiência de encapsulação (EE%) (n=3) foi determinada a partir da Equação 2.

$$EE\% = \frac{[\text{total}] - [\text{óleo livre}]}{[\text{total}]} \times 100$$

4.4.3.1 Estimativa de perda de óleo no processo de nanoprecipitação

Tendo em vista a alta volatilidade do óleo de *M. alternifolia*, a perda de óleo durante o processo de produção das nanocápsulas foi calculada a partir da Equação 3

$$\% \text{Óleo perdido} = \frac{[\]total\ teórico - [\]total\ observado}{[\]total\ teórico} \times 100$$

Sendo “[]total teórico” a razão entre a massa de óleo utilizada na formulação pelo volume final da solução após todo o processo de nanoprecipitação e extração de solvente. A “[]total observado” foi determinada por espectrofotometria UV-VIS do lote recém formulado e mantido em refrigeração 4°C.

4.4.3.2 Teor de óleo na formulação durante o período de armazenamento

Alíquotas de 12 mL (n=3) das soluções coloidais foram armazenadas em tubos falcon de mantidas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e fotoperíodo de 12 horas. Nos intervalos de 15, 30, 60 após a formulação, amostras foram coletadas e preparadas para análise do teor de óleo presente na formulação associado à nanocápsulas (segundo item 4.4.3) e %óleo perdido durante armazenamento a partir da Equação 4:

$$\% \text{Óleo armazenado} = \frac{[\]total\ obs(d0) - [\]total\ obs}{[\]total\ obs(d0)} \times 100$$

Onde “[]total obs(d0)” é a concentração total de óleo determinada por espectrofotometria de UV-vis em formulações recém sintetizadas e “[]total obs” os valores determinados nos intervalos de armazenamento

4.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS DE PCL EM FUNÇÃO DO TEMPO

O comportamento físico-químico das suspensões nanoparticuladas foi avaliado a 25 ± 1°C em intervalos regulares durante 60 dias. Neste período, o aspecto visual foi monitorado e os valores de turbidez, pH, condutividade elétrica nos dias 0, 7, 14, 21 e 28, 60 após a fabricação dos lotes e o diâmetro médio das nanocápsulas carregadas nos intervalos 0, 7, 30 e 180.

4.5.1 pH e condutividade elétrica

Um equipamento multiparâmetro (Edge™, Hanna Inst.) foi utilizado para determinar o pH e a condutividade elétrica das suspensões de nanocápsulas. Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente (25 ± 1 °C) e em triplicata.

4.6 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia*

Macrófagos da linhagem J774 e Queratinócitos da linhagem HaCAT foram cultivados em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco®, Life Technologies™, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e 50 µg/ml de gentamicina (Novafarma, Anápolis, Goiás, Brasil). As células foram mantidas em cultivo na estufa a 37°C e 5% de CO₂, com troca do meio DMEM em intervalos médios de 5 dias. Quando o crescimento celular alcançou confluência celular de 80-90%, o ensaio foi realizado. Em microplacas de 96 poços, para ambas as linhagens, a densidade celular de 1x10⁴ foi plaqueada em cada poço. Posteriormente, as microplacas foram incubadas durante 24 horas na mesma condição de cultivo. Após o período de incubação,

Uma dispersão do óleo de *Melaleuca alternifolia* (25 mg/mL, Tween 80 5%) foi preparada e a partir de diluições seriadas, as seguintes concentrações foram administradas: 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm; 31,25 ppm; 15,625 ppm; 7,8125 ppm. Como controle positivo, foi utilizado o violeta de genciana (pararosanilina), os controles negativo foram o meio DMEM suplementado e uma solução de Tween 80 de 0,05%. Após a aplicação dos tratamentos e controles em triplicata, as microplacas foram incubadas por 72 horas a 37° C e 5% de CO₂. Para avaliar a citotoxicidade, foram adicionados 20 µl de Alamar Blue® (Invitrogen™) em cada poço, e a placa foi mantida novamente nas mesmas condições durante 4 horas. A leitura da placa foi realizada no espectrofotômetro (SpectraMax® 190, Molecular Devices, USA), nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. A média foi obtida a partir de três ensaios independentes.

4.7 CULTIVO DE LARVAS DE *Aedes aegypti*

Ovos de *A. aegypti* provenientes de uma colônia de culicídeos estabelecida no município de Santo Estevão/BA foram utilizados nesta etapa, realizada no insetário do IGM. O cultivo das larvas foi realizado segundo o protocolo modificado sugerido pela OMS (WHO, 2005). Previamente, bandejas rasas de polietileno foram preenchidas com água bidestilada à profundidade entre 5 à 8 cm. Pequenas porções (cerca de 0,5 g) de ração são maceradas e adicionadas à água; essa solução é mantida inerte e coberta por 24 horas. Esta etapa foi realizada para sincronizar e promover a eclosão dos ovos de *A. aegypti*, pois o crescimento bacteriano induz a desoxigenação da água e isso desencadeia a eclosão dos ovos. Depois deste período, papéis filtros contendo os ovos de *A. aegypti* sobre sua superfície foram submersos na água

com baixas concentrações de carga orgânica. 24 horas depois, com o auxílio de pipetas *Pasteur*, as larvas que eclodiram foram transferidas para outra bandeja rasa de polietileno contendo água bidestilada pura. As larvas são alimentadas com baixas concentrações de ração de gato macerada em intervalos de dois dias. As larvas foram mantidas sob condições adequadas de temperatura ($26 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade relativa ($60 \pm 10\%$) e fotoperíodo de 12 horas. Em geral, no período de 3 a 4 dias após a eclosão, populações homogêneas de larvas em estágio L3 tardio e L4 recente são obtidas.

4.8 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* LIVRE (EMULSIONADO) E NANOESTRUTURADO

4.8.1 Preparo de emulsão estoque

Inicialmente, 750 mg do óleo (Sigma-aldrich®, extraído de folhas da *Melaleuca alternifolia*) foram pesados em um tubo falcon de 50 mL, logo depois 750 μL de Tween 80® (Sigma-aldrich®, EHL=15) foram adicionados e a solução foi vortexada, finalmente 15 mL de água bidestilada foi adicionada e a solução foi vortexada para obtenção de uma emulsão grosseira de 50 mg de óleo/mL.

4.8.2 Preparação de solução coloidal estoque

Para preparação de uma dispersão estoque de nanocápsulas contendo uma concentração conhecida de óleo essencial de *M. alternifolia*, a solução nanoparticulada recém produzida foi superconcentrada e depois quantificada diretamente pelo método analítico por espectrofotometria UV-Vis. Em resumo, 10 mL da suspensão nanoparticulada carregada, bruta e recém-sintetizada foi depositado na região superior da membrana do concentrador centrífugo Vivaspin (Cut off de peso molecular: 10,000 Daltons) que foi centrifugado (Heraeus®, Megafuge 16R) à 5.000 rpm por 30 minutos, à 4°C . A amostra foi superconcentrada em 500 μL , posteriormente, uma alíquota foi diluída em etanol 1:100 (v/v) e vortexada. A absorbância da amostra no comprimento de onda de 204 nm foi determinada através do espectrofotômetro GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Scientific™). A partir da plotagem dos valores alcançados na função de linearidade (1.1.2), foi possível alcançar o teor de óleo essencial na amostra superconcentrada.

4.8.3 Seleção de Larvas

Para avaliação da atividade larvicida do óleo, 10 larvas no estágio L3 tardio ou L4 recente, foram transferidas cuidadosamente para copos plásticos (capacidade 50 mL) contendo

volumes específicos de água mineral, de acordo com as concentrações requeridas. Logo depois da transferência, as larvas são mantidas sob observação por 30 minutos para avaliar se houve alguma injúria. Larvas pequenas, com comportamento letárgico ou mortas são substituídas.

4.8.4 Bioensaio larvicida

A atividade larvicida do óleo e das nanocápsulas carregadas foi avaliada através de um bioensaio toxicológico, de acordo com adaptações da metodologia preconizada pela OMS (WHO, 2005). Os ensaios consistiram na adição de diferentes volumes da emulsão e dispersão coloidal estoque nos copos descartáveis contendo 10 larvas de *A. aegypti* imersas em volumes específicos de água mineral. Os primeiros ensaios foram realizados utilizando a emulsão estoque. Inicialmente foram avaliadas as seguintes concentrações: 10, 100, 500, 1000 e 10000 ppm (Anexo I – tabela 9). Como controles negativos, foram utilizados 20 mL de água mineral e uma solução de 0,375 mg/mL de Tween® 80. O composto organofosforado temefós (nome comercial: Abate) foi utilizado como controle positivo na concentração utilizada pela Vigilância Sanitária, 100 mg/L (100 ppm). Cada teste foi realizado em triplicata. Os testes são realizados sob condições adequadas de temperatura ($26 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade relativa ($60 \pm 10\%$) e fotoperíodo de 12 horas.

As larvas foram mantidas expostas às soluções por 48 horas, sem adição de suplementação nutricional. Após 24 e 48 horas, a mortalidade larval é registrada. Larvas mortas são aquelas que não podem ser induzidas ao movimento quando são sondadas. Larvas moribundas, ou seja, larvas incapazes de emergir à superfície da água ou que não demonstram reação características de submergir quando a água sofre distúrbio são contadas e adicionadas às larvas mortas para o cálculo de mortalidade.

Após testes preliminares, foram estabelecidas as concentrações: 10, 25, 50, 75, 100 e 250 ppm, para avaliar a atividade tóxica do óleo de *Melaleuca alternifolia* livre. Para bioensaios com nanocápsulas, foram utilizadas as concentrações de 50, 100, 250, 500 e 1000 ppm, os controles negativos foram nanoesferas de PCL e água destilada. Todos os experimentos foram repetidos em dias diferentes pelo menos duas vezes para cada material testado.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o software Graphpad Prism 5.0 (San Diego, EUA) com os resultados expressos como média \pm desvio padrão. Os dados de tamanho de partícula, PDI, potencial zeta e dos parâmetros de estabilidade entre dois tipos lotes (nanocápsulas vazias e carregadas) foram avaliados por comparação de médias através do teste *t student* para

amostras independentes, com $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo. Para o bioensaio de atividade larvicida, foi realizada análise de Probit (concentrações em log) dos dados de mortalidade para a determinação da concentração letal LC_{50} , LC_{90} e o intervalo de confiança de 95% [IC 95%] com o auxílio do software IBM SPSS Statistics Versão 23 (IBM Corp. ©, EUA) ou Excel versão 2010 (Microsoft ©, EUA) baseado no método D.J.Finney (1952) Probit Analysis (FINNEY, 1952).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE *Melaleuca alternifolia*

Os COVs de *M. alternifolia* foram determinados pela técnica GC-SM, que permitiu a identificação de 20 compostos (Tabela 4). Dentre eles o Terpinen-4-ol foi identificado como composto majoritário.

Tabela 4 Dados de CG-SM (composição) para o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.

| No. | Composto | KI ^b _{Exp} | KI ^c _{Lit} | Conteúdo (%) |
|-----|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------|
| 1 | α -thujeno | 922 | 922 | 0.44 |
| 2 | α -pineno ^a | 928 | 928 | 1.92 |
| 3 | Sabineno | 964 | 965 | 0.05 |
| 4 | β -pineno | 966 | 966 | 0.57 |
| 5 | β -mircênia ^a | 983 | 983 | 0.21 |
| 6 | 1,4-cineol | 1000 | 1001 | 0.06 |
| 7 | o-cymeno | 1011 | 1009 | 19.82 |
| 8 | 1,8-cineol | 1015 | 1016 | 6.07 |
| 9 | Limoneno ^a | 1018 | 1018 | 0.98 |
| 10 | Óxido de α -pineno | 1074 | 1075 | 0.22 |
| 11 | linalol ^a | 1083 | 1085 | 0.07 |
| 12 | terpinen-4-ol | 1156 | 1156 | 26.05 |
| 13 | α -terpineol | 1165 | 1165 | 2.92 |
| 14 | Piperitol | 1183 | 1188 | 0.08 |
| 15 | β -cariofileno ^a | 1420 | 1420 | 1.37 |
| 16 | β -selineno | 1470 | 1470 | 0.11 |
| 17 | α -muuroleno | 1485 | 1484 | 0.10 |
| 18 | Óxido de cariofileno | 1551 | 1557 | 0.42 |
| 19 | Globulol | 1558 | 1559 | 0.34 |
| 20 | Viridiflorol | 1564 | 1568 | 0.21 |

^a Identificação confirmada pela comparação de espectros de massa e o tempo de retenção com aqueles apresentados por padrões autênticos.

^b KI_{EXP} = índice de retenção n-alcanos relativos (C8 a C40) em uma coluna capilar Rxi-1MS.

^c KI_{LIT} = índice de retenção publicado na literatura.

5.2 PREPARAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE PCL

As nanocapsulas vazias (NC-PCL-BLANK) e carregadas com o óleo essencial de *M. alternifolia* (NC-PCL-TTO) foram preparadas através do método de nanoprecipitação. Com relação ao aspecto visual, todas as formulações apresentaram-se homogêneas de aspecto

branco-fluido. Macroscopicamente, formulações recém-sintetizadas não apresentaram sinais de instabilidade física, tais como, sedimentos ou formação de precipitados.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS

As nanopartículas produzidas foram caracterizadas quanto ao tamanho, polidispersão e o potencial zeta. A tabela 5 resume os resultados de caracterização. Estatisticamente não houve diferença entre nanocápsulas vazias e carregadas quanto tamanho e polidispersão, ou seja, a mudança do óleo sintético pelo óleo essencial não provocou diferenças estatísticas dimensionais entre as nanopartículas. As dimensões foram reprodutíveis entre os lotes produzidos (figura 5) todas as nanoformulações apresentaram distribuição de tamanho monomodal, com baixa polidispersão. Por outro lado, houve diferença estatística o potencial zeta entre partículas carregadas e vazias.

Tabela 5 Parâmetros de caracterização das nanopartículas de ϵ -poli(caprolactona) recém produzidas

| | Z-Average (nm) | PDI | Diâmetro médio (nm) | Potencial Zeta (mV) |
|--------------|-----------------------|------------|----------------------------|----------------------------|
| NC-PCL-TTO | 155,1 \pm 4,4 | 0,1 | 172,41 \pm 59,1 | -26,3 \pm 4,0 |
| NC-PCL-BLANK | 166,2 \pm 3,4 | 0,1 | 184,7 \pm 63,6 | -32,8 \pm 0,1 |

PDI= polydispersity index (índice de polidispersão)

Diâmetro médio do pico de distribuição de tamanho.

NC-PCL-TTO (n=4) e NC-PCL-BLANK (n=3)

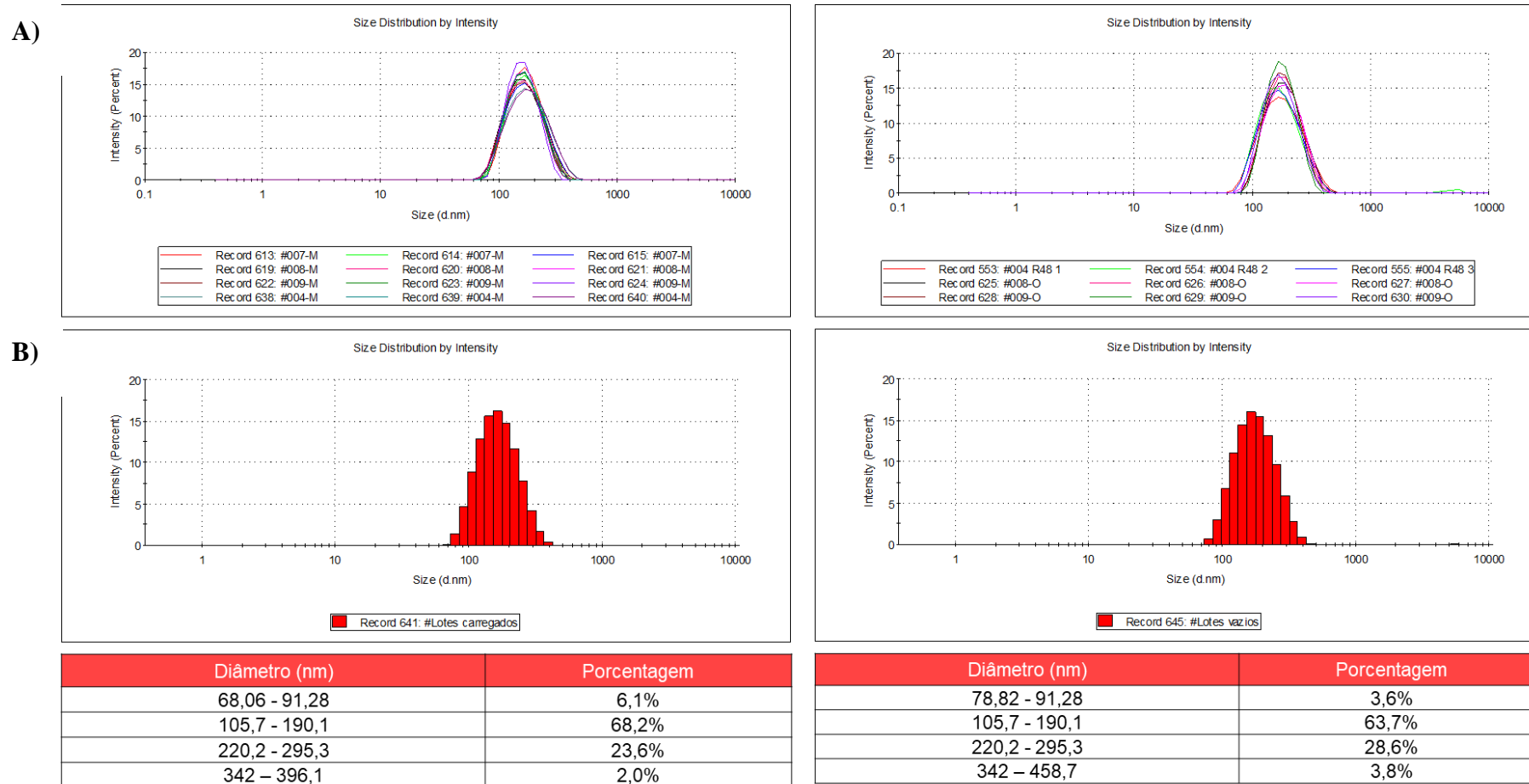


Figura 5. Gráficos de distribuição de tamanho das nanoformulações. A - Resultados sobrepostos das análises de diâmetro médio por intensidade nos lotes de nanocápsulas contendo óleo de *M. alternifolia* (direita) e de nanocápsulas contendo MCT (esquerda). B – Porcentagem de subpopulações separadas por variação de tamanho, nanocápsulas com óleo de *M. alternifolia* (direita) e nanocápsulas contendo MCT (esquerda).

5.3.1 Análise morfológica

5.3.1.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As imagens de MET confirmaram a produção de nanocápsulas esféricas delimitadas por uma parede polimérica mais escura e com um contraste de fundo na região central, indicando um núcleo de natureza lipídica, neste caso, óleo de *Melaleuca alternifolia*. Não foram observados agregados ou partículas coalescentes. As análises por MET também confirmaram os resultados de tamanhos das nanopartículas, foi possível observar nanopartículas variando entre 100-300 nm (Figura 6).

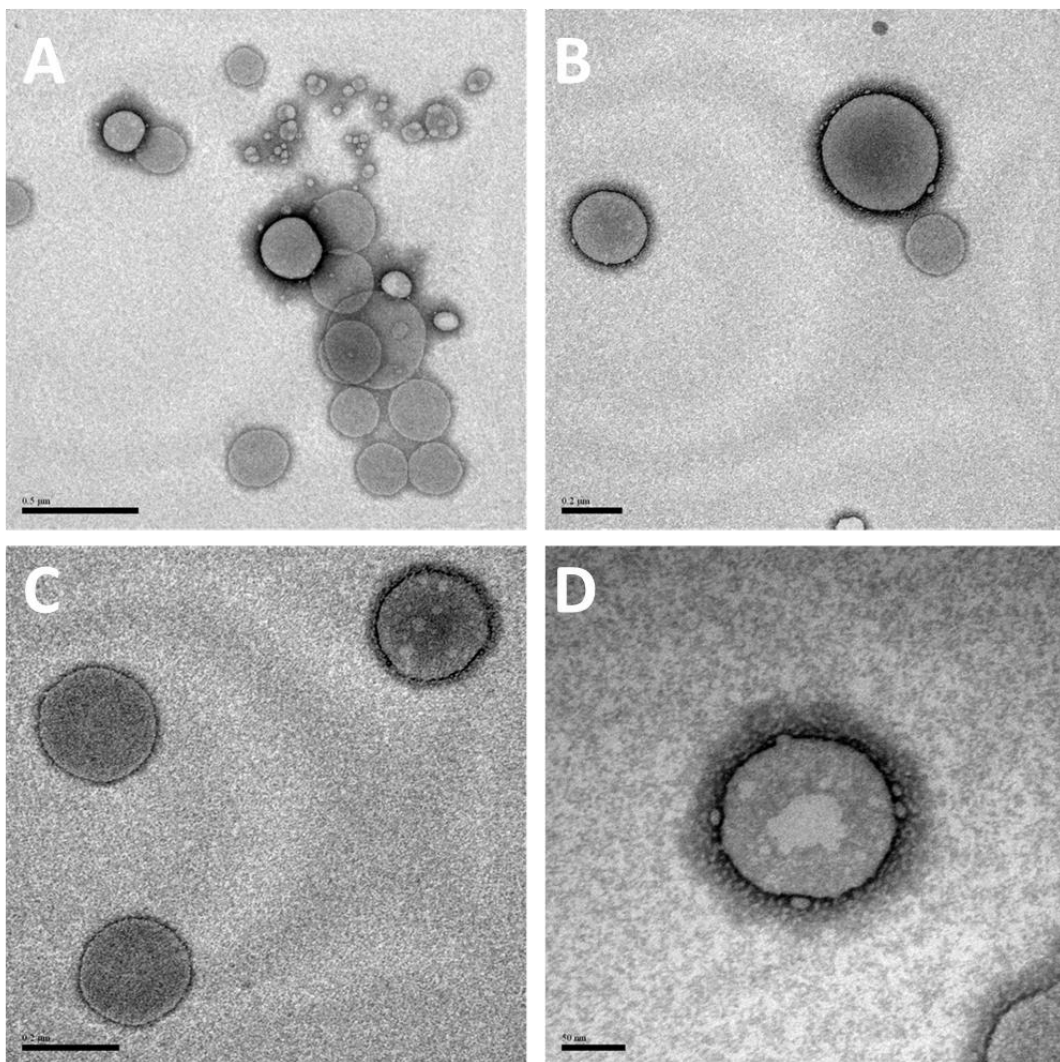


Figura 6. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo o óleo de *Melaleuca alternifolia*. A) Campo amplo indicando dispersão de nanopartículas. Escala: 0,5µm; B) e C) Dimensão e forma das nanocápsulas. Escala: 0,5 µm e 0,2 µm. D) Detalhe da

nanocápsula esférica delimitada por uma parede polimérica e com um contraste de fundo na região central, indicando um núcleo de natureza lipídica. Escala: 50 nm.

5.3.1.2 Microscopia de Força atômica

Os dados gerados por MFA corroboram a análise morfológica de observada em MET, além de elucidar a superfície topográfica das nanocápsulas contendo o óleo de *Melaleuca alternifolia*. A imagem 3D permite visualizar o relevo esférico da superfície da amostra.

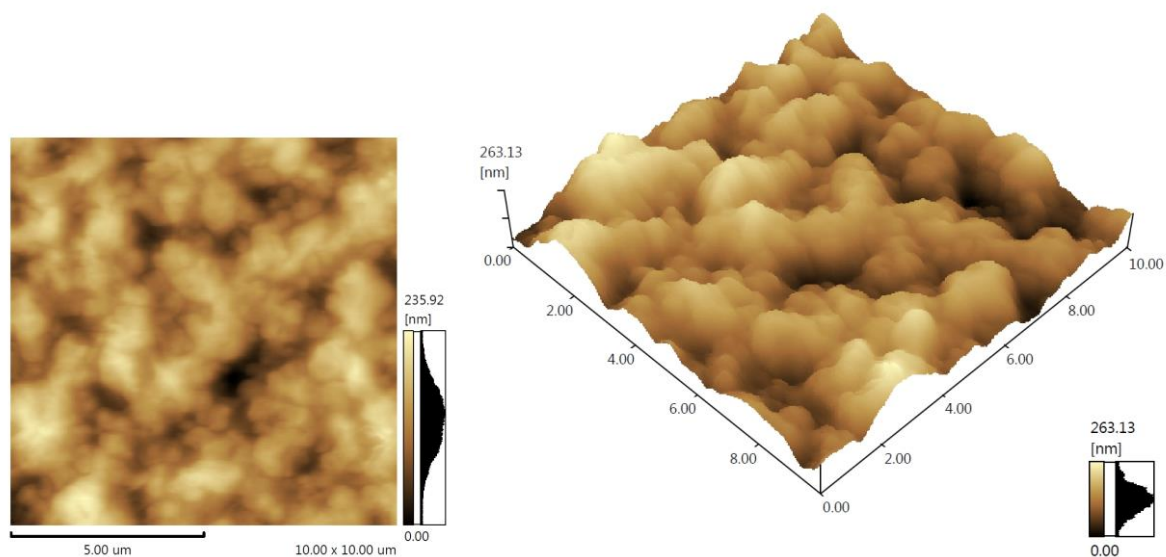


Figura 7. Imagens topográficas de microscopia de força atômica (AFM), em exibição 2D (esquerda) e 3D (direita). Superfície de nanopartículas poliméricas de PCL contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.

5.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÓLEO NANOENCAPSULADO (EE%)

5.4.1 Comprimento de onda de maior absorbância

Para determinar o comprimento de onda de maior absorbância uma solução etanólica do óleo essencial de *M. alternifolia* foi submetida a varredura de espectro entre os intervalos de 190 a 1000 nm, o óleo apresentou maior absorbância em 204 nm. A varredura no álcool etílico absoluto puro, solvente utilizado para solubilizar o óleo e romper nanocápsulas de PCL, não apresentou absorbância nos comprimentos analisados. Com o intuito de prevenir viés quantitativos, outra curva de absorção espectral foi realizada após análise de uma solução etanólica contendo fragmentos de PCL provenientes de nanoesferas vazias rompidas, não houve absorção de luz em 204 nm, PCL apresentou maior absorbância em 231 nm.

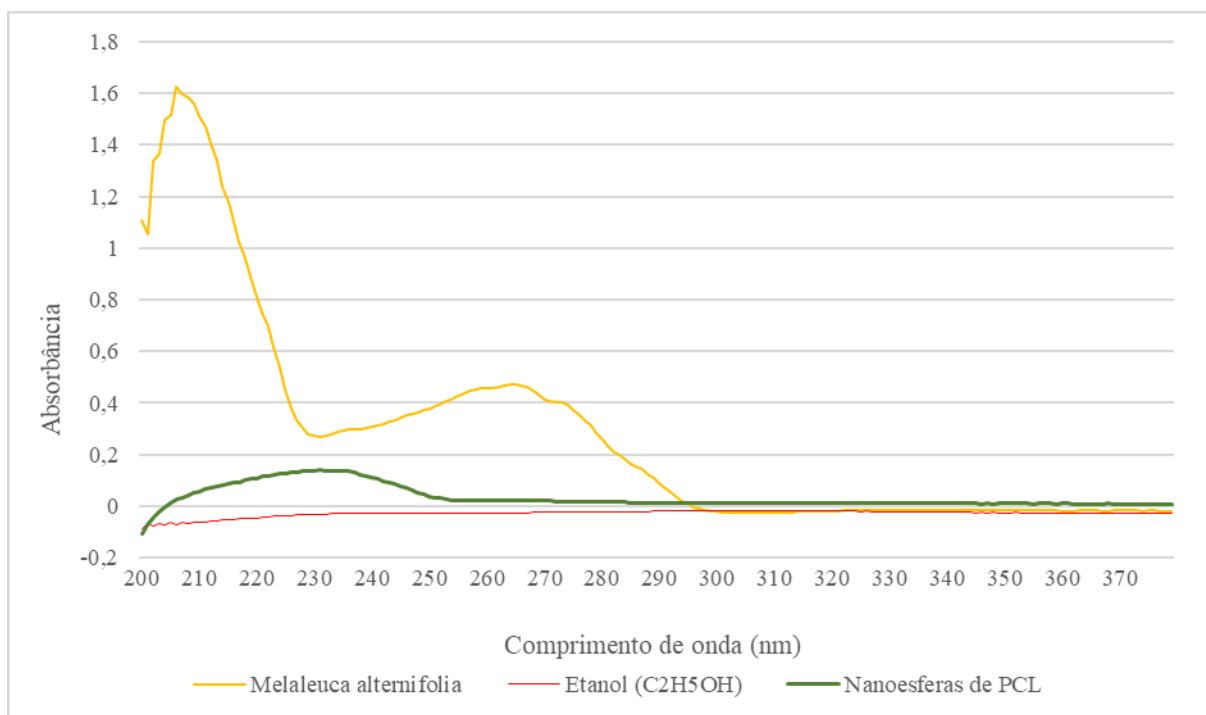


Figura 8. Espectro de absorvância UV-Vis do óleo essencial de *M. alternifolia* e NE- \emptyset

5.4.2 Desenvolvimento de curva analítica

Diferentes concentrações do óleo em solução etanólica foram submetidas a espectrometria nos comprimentos de onda de 206, 205 e 204 nm, onde observou-se que o melhor comprimento para construção da curva padrão foi de 204 nm. A linearidade dos resultados relacionando absorvância em 204 nm x concentração foi calculada, desta forma foi obtido a função linear (Figura 9). Para validação da curva, concentrações de 20, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ do óleo de *M. alternifolia* em etanol foram preparadas e analisadas quanto a absorvância de luz no comprimento de onda de 204 nm. As concentrações de óleo foram calculadas a partir dos valores de absorvância das amostras, resultados sumarizados na tabela 6, os resultados de concentração preditos pelo método foram condizentes com concentrações de referência, erro relativo percentual abaixo de 9%.

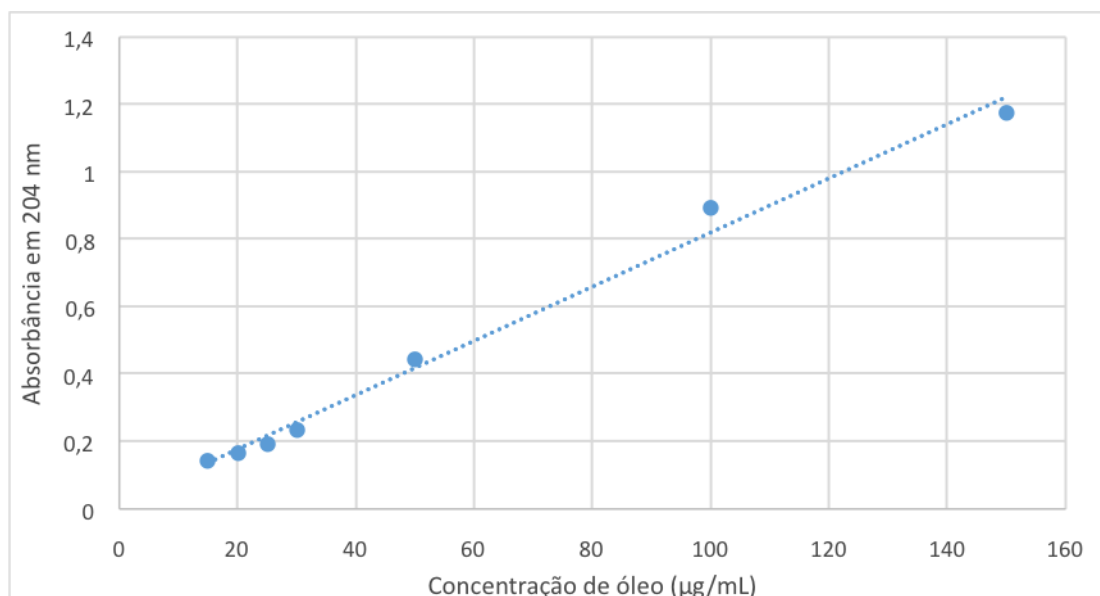


Figura 9. Curva analítica do óleo essencial de *M. alternifolia* em etanol (204 nm)

Tabela 6 Comparação entre resultados da concentração de óleo obtidos por espectrometria UV-Vis e valores reais.

| Solução padrão | Absorção em 204 nm | Absorção média \pm DP | Concentração média | ER |
|----------------|--------------------|-------------------------|--------------------|-------|
| 20 ug.ml | 0,176 | 0,173 \pm 0,00264 | 19,55 | 2,25% |
| | 0,172 | | | |
| | 0,171 | | | |
| 30ug.ml | 0,2786 | 0,2779 \pm 0,00061 | 32,66 | 8,86% |
| | 0,2778 | | | |
| | 0,2774 | | | |
| 50ug.ml | 0,3962 | 0,3966 \pm 0,00037 | 47,55 | 4,90% |
| | 0,3969 | | | |
| | 0,3968 | | | |

5.4.3 Eficiência de Encapsulação e perda de óleo no processo de nanoprecipitação e durante armazenamento

A eficiência de encapsulação do óleo de *M. alternifolia* em nanocápsulas poliméricas de PCL foi alcançada através do método indireto de quantificação. A fração de óleo associado as nanopartículas foi alta, apresentando valores de EE% média de 90,3% \pm 2,1% (n=3). Por outro lado, o teor médio de óleo perdido durante o processo foi de 29% \pm 18 % (n=3), apresentando alta variação entre os lotes produzidos (figura 10). Durante o período de armazenagem (d15 à d60), o teor de óleo diminui gradativamente, em média, após 15 dias 18.01% do óleo encapsulado é perdido, em 60 dias de armazenamento quase todo o óleo encapsulado não está mais presente, perda de 85,7%. Ainda assim, a EE% de encapsulamento continua alta, oscilando entre 98-97%, indicando que, majoritariamente, o óleo remanescente

presente na formulação está associado às nanopartículas enquanto o óleo perdido está evaporando ou sendo degradado.

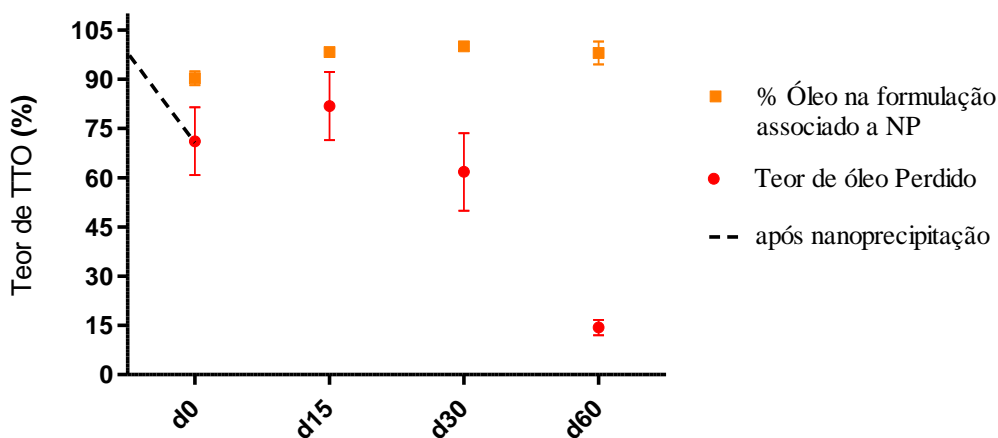


Figura 5. Acompanhamento do teor de óleo na formulação por 60 dias.

5.5 ESTUDOS DE ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA EM 90 DIAS

A estabilidade das suspensões em temperatura ambiente foi avaliada em termos de pH, condutividade elétrica, turbidez e diâmetro médio das nanopartículas nos intervalos de 0, 7, 14, 21, 28, 60 e 90 dias (figura 11). As suspensões nanoparticuladas mantiveram seu aspecto visual branco-fluido, sem evidências macroscópicas de fenômenos de instabilidade durante 60 dias. Nos intervalos de 0 a 21 dias foi observado uma alteração na estabilidade química caracterizada por acidificação e concomitante aumento na condutividade elétrica das soluções, após esse período a redução de pH e aumento nos valores CE ocorrem de forma mais sutil, não houve diferença estatística entre nanocápsulas vazias e carregadas. Em d60, a condutividade elétrica em nanopartículas vazias apresenta aumento intensificado, acompanhado de fenômenos macroscópicos de instabilidade e odor fermentativo, em NP-carregadas, os fenômenos macroscópicos são menos observados. Formulações vazias e carregadas diferem estatisticamente quanto turbidez ($p=0,0016$), não houve variações na estabilidade física dentro de cada grupo durante o período de 90 dias e conjuntamente, o acompanhamento do diâmetro médio das nanopartículas carregadas não indicou mudanças estatisticamente significativas entre os intervalos de d0, d7, d30 e d180.

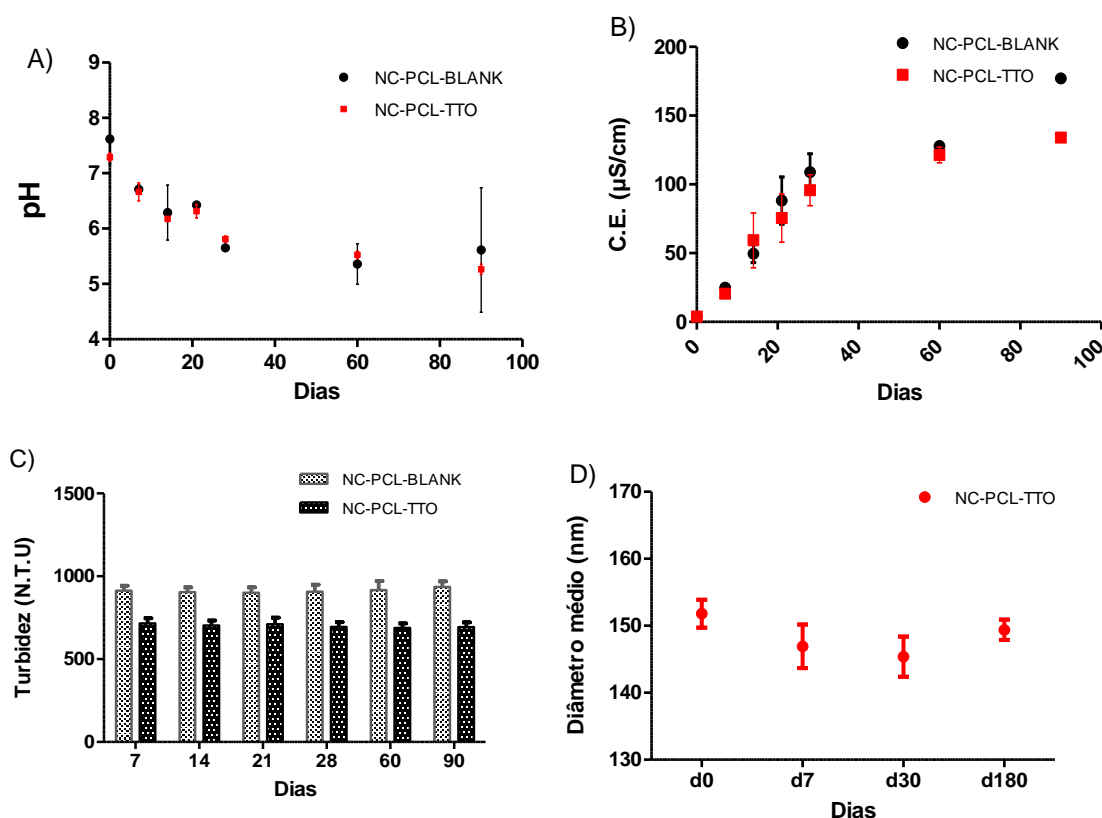


Figura 11. Monitoramento da estabilidade das suspensões de nanopartículas poliméricas de PCL durante 90 dias armazenadas à $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A) pH B) Condutividade elétrica C) Turbidez D) Diâmetro médio de nanocápsulas carregadas.

5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO DE *Melaleuca alternifolia* livre E NANOENCAPSULADO

Após alguns testes iniciais, constatou-se que todas as larvas morreram a partir de 100 ppm do óleo essencial de *M. alternifolia* em emulsões. Não houve mortes nos controles positivos e nos grupos expostos à 10 ppm do óleo essencial (Anexo I – tabela 10). Observou-se também, que o resfriamento/aquecimento da solução estoque ou demora de aplicação horas após preparação reduziam expressivamente a atividade larvicida. A partir destes dados, as concentrações foram ajustadas em intervalos menores: 10, 25, 50, 75, 100, 250 ppm (Anexo I – tabela 11), não foram observados eventos de mortalidade nos controles negativos e nas concentrações de 10 e 25 ppm (Anexo I – tabela 11). Concentrações letais (LC_{50} e LC_{90}) sobre larvas de *A. aegypti* foram obtidas pela análise log-probit dos dados de mortalidade. O LC_{50} foi de 69,374 ppm e o LC_{90} de 101,56 ppm em 24 horas. Houve um leve aumento de mortalidade entre os intervalos de 24 e 48 horas para concentração de 75 ppm, causando a diferença

observada nos valores de LC₅₀₋₉₀. Notou-se que as larvas mortas apresentavam escurecimento da região torácica (Anexo V –figura 14).

Em experimentos posteriores, nanocápsulas de PCL contendo o óleo preparadas pelo método de nanoprecipitação segundo as condições apresentadas na tabela 3, foram concentradas e administradas nas concentrações de óleo de 10, 25, 50, 75, 100, 250 ppm. Não houve eventos de morte em tais concentrações, todas as larvas continuaram ativas e responsivas. Com o objetivo de determinar o LC₅₀ e LC₉₀ de NC-PCL-MELA sobre as larvas, intervalos em concentrações maiores foram estabelecidos (250, 500, 700, 900, 1000 ppm), para alcançar tais concentrações NC-PCL foram preparadas segundo as condições apresentadas na tabela 3, diferindo a massa de óleo para 500 mg de óleo.

O efeito larvicida do óleo nanoencapsulado iniciou-se em 500 ppm, duas vezes a concentração letal para todas as larvas expostas ao óleo disperso em emulsão. Em 24 horas, o LC₅₀ e LC₉₀ apresentaram valores de 670,8 e 1056,836 ppm, respectivamente. Em 48 horas, um número maior de larvas morreu em todas as concentrações, diminuindo o valor de LC₅₀ para 564,9 ppm e LC₉₀ para 1019,263 ppm, caracterizando NC-PCL-MELA como um inseticida de ação moderadamente lenta. Foi observado que, 2-3 dias após a preparação, mesmo com mudanças de temperatura, o sistema nanoencapsulado manteve a atividade larvicida sem diferenças significativas quando comparadas a soluções coloidais recém produzidas, períodos mais longos não puderam ser estudados. Somente em 1 mg/mL (1000 ppm) após o período de 48 horas, todas as larvas morreram. Não foram observados eventos de mortalidade nos controles negativos de água mineral e Nanoesferas de PCL, demonstrando a ausência de toxicidade do polímero sobre as larvas (Anexo I – tabela 12). As larvas mortas pelo nanocápsulas apresentaram escurecimento de diferentes seguimentos abdominais (Anexo V – figura 15). Todos os dados de larvicidade alcançados foram resumidos na tabela 7.

Tabela 7 Atividade larvicida do óleo de *Melaleuca alternifolia* contra larvas cultivadas de *Aedes aegypti*.

| | Concentração (ppm) | Mortalidade (%) ± DP | LC 50 (ppm) (IC 95%) | LC 90 (ppm) (IC 95%) | Equação de regressão | Slope | x ² | |
|--|--------------------|----------------------|----------------------|------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|----------------|-------|
| Óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> | 24 horas | 10 | 0 | 69,374 (59,83 - 80,43) | 101,56 (87,59 - 117,75) | y = 8,4228x - 10,494 | 7,742 | 0,066 |
| | | 25 | 0 | | | | | |
| | | 50 | 20% ± 3,46 | | | | | |
| | | 75 | 30% ± 1 | | | | | |
| | | 100 | 96,67% ± 0,57 | | | | | |
| | | 250 | 100% 0 | | | | | |
| | 48 horas | 10 | 0 | 68,325 (58,948 - 79,193) | 98,908 (85,334 - 114,641) | y = 8,4913x - 10,56 | 7,977 | 0,128 |
| | | 25 | 0 | | | | | |
| | | 50 | 20% ± 3,46 | | | | | |
| | | 75 | 36,7% ± 1,527 | | | | | |
| 100 | | 96,67% ± 0,57 | | | | | | |
| 250 | | 100% 0 | | | | | | |
| NC-PCL-MELA | 24 horas | 250 | 0 | 681,595 (582,42 - 784,085) | 1056,836 (918,694 - 1215,75) | y = 7,3833x - 15,882 | 7,383 | 0,572 |
| | | 500 | 23% ± 1,55 | | | | | |
| | | 700 | 43,3% ± 1,56 | | | | | |
| | | 900 | 66,7% ± 3,06 | | | | | |
| | | 10000 | 96,7% ± 0,57 | | | | | |
| | 48 horas | 250 | 0 | 564,884 (471,384 - 676,931) | 1019,263 (850,553 - 1221,436) | y = 5,5114x - 10,163 | 5,511 | 0,619 |
| | | 500 | 43,3% ± 1,15 | | | | | |
| | | 700 | 66,7% ± 3,06 | | | | | |
| | | 900 | 73,3% ± 2,32 | | | | | |
| | | 10000 | 100,00% ± 0,57 | | | | | |

Nenhuma mortalidade foi observada nos controles negativos

DP= desvio padrão

LC50 = concentração letal que leva a morte de 50% dos organismos expostos

LC90 = concentração letal que leva a morte de 90% dos organismos expostos

IC 95% = Intervalo de confiança

X²= Qui quadrado

5.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

Em todos os ensaios, não houve diferença estatística na viabilidade celular nos grupos expostos ao controle positivo e tween 80 0,05%, indicando que o tensoativo não apresenta toxicidade nesta concentração em ambos os tipos celulares.

As linhagens de macrófagos murinos (J774) e queratinócitos humanos (HaCat) apresentaram diferentes perfis de citotoxicidade quando expostos ao óleo essencial de *M. alternifolia*. Em macrófagos (figura 12 A), não houve redução da viabilidade celular nos grupos expostos as concentrações de 7,8 a 62,5 ppm. Em 125 ppm houve uma redução estatisticamente significativa de 10% em relação ao controle negativo. O óleo apresentou alta toxicidade na concentração de 250 ppm, reduzindo a viabilidade celular em 99% em relação ao controle negativo. A linhagem de queratinócitos não apresentou redução de viabilidade celular mesmo em grupos expostos ao óleo em concentrações mais altas, 125 a 250 ppm. Não houve diferença estatística entre a taxa de viabilidade entre os grupos expostos ao óleo e os controles negativos (figura 12 B).

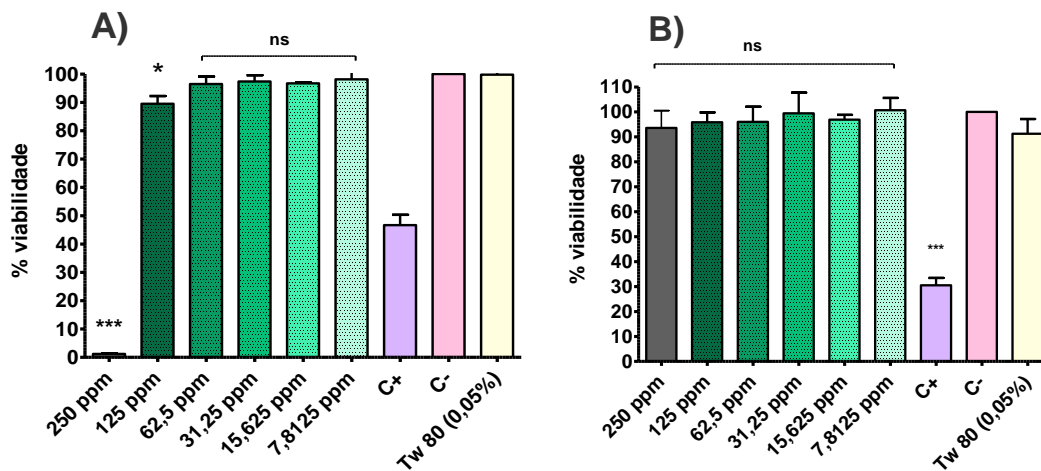


Figura 12. Ensaio de citotoxicidade em células J774 (A) e HaCaT (B). Percentual de viabilidade celular em diferentes concentrações do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. A viabilidade do grupo controle negativo (C-) representa 100%. Estão apresentados resultados médios (n=3) em três ensaios independentes.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, a análise química do óleo de *M. alternifolia* por cromatografia gasosa e espectrometria de massa de alta resolução permitiu identificar 20 compostos voláteis (62,01%). Grando et al e Madalosso et al identificaram 15 componentes voláteis, representando 95,86% da composição total (GRANDO et al., 2016; MADALOSSO et al., 2017). Pereira e colaboradores identificaram 27 componentes voláteis (98,9% dos constituintes) (PEREIRA et al., 2014). 70% dos compostos voláteis identificados foram observados em outros estudos. Os componentes em maior concentração em ordem decrescente foram: terpinen-4-ol, o-cymeno, 1,8-cineol e α -terpineol. Terpinen-4-ol tem sido extensivamente caracterizado como composto majoritário do óleo essencial de *M. alternifolia* (BENELLI et al., 2013; BUSTOS-SEGURA; KÜLHEIM; FOLEY, 2015; GRANDO et al., 2016; MADALOSSO et al., 2017; PEREIRA et al., 2014; SOUTHWELL; RUSSELL, 2002), enquanto, 1,8-cineole e α -terpineol são comumente identificados como compostos majoritários secundários do óleo de *M. alternifolia* (BUSTOS-SEGURA; KÜLHEIM; FOLEY, 2015; CARSON; HAMMER; RILEY, 2006b; GRANDO et al., 2016; PEREIRA et al., 2014; SOUTHWELL; RUSSELL, 2002). γ -terpineno e terpinoleno, compostos usualmente descritos como majoritários secundários, não foram detectados. Em função de diversos fatores (condições climáticas e pedológicas, genética, idade e parte da planta utilizada), a composição de um óleo essencial da mesma espécie pode variar quanto aos tipos de componentes e suas respectivas percentagens no óleo, o que poderia explicar a diferença na composição do óleo em comparação com outros estudos (DIAS; MORAES, 2014; NASCIMENTO, 2014; PAVELA, 2015).

Segundo a literatura, os compostos detectados em *M. alternifolia* exibem ampla bioatividade, das 20 espécies químicas identificadas, 12 têm sido estudadas isoladamente e apresentam alguma propriedade biológica (Anexo III – tabela 12), dentre os quais 8 foram caracterizadas como potenciais larvicidas contra o *Aedes aegypti* (tabela 8).

Tabela 8 Estudos do efeito larvicida de compostos isolados presentes no óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.

| Componente | LC 50 (95% IC) (ppm) | Referência |
|------------------------|----------------------------|----------------------|
| α -pineno | 15,4 (14.0–16.8) | (LUCIA et al., 2007) |
| | 49.5 (43.5–56.1) | (ALI et al., 2014) |
| p-Cymeno | 69,4 (NI) | (CHENG et al., 2013) |
| | 33.46 (29.27–37.78) | (LEE; AHN, 2013) |
| β -pineno | 12,1 (11.2–13.2) | (LUCIA et al., 2007) |
| | 35,9 (31.8–40.4) | (ALI et al., 2014) |
| o-cymeno | 39.60 (33.25–46.71) | (LEE; AHN, 2013) |
| 1,8-cineol | 57,2 (40.6–86.9) | (LUCIA et al., 2007) |
| | 73.30 (68.56–77.97) | (LEE; AHN, 2013) |
| Limoneno | 15.31 (12.69–18.51) | (LEE; AHN, 2013) |
| | 74,1 (NI) | (CHENG et al., 2013) |
| Terpinen-4-ol | 78.73 (71.24–85.73) | (LEE; AHN, 2013) |
| β -caryophylleno | 38.58 (36.17–41.09) | (LEE; AHN, 2013) |
| | 26.0 (22.5–30.3) | (ALI et al., 2014) |

NI, Não Informado

No presente momento, pela primeira vez foi descrito a toxicidade do óleo de *M. alternifolia* sobre o estágio larval do *Aedes aegypti*. Os indicativos da Tabela 9 corroboram o efeito larvicida do óleo essencial de *M. alternifolia*, os valor de $LC_{50} = 69,8$ determinado neste trabalho situa-se muito próximo aos valores de LC_{50} dos compostos majoritários (LEE; AHN, 2013; LUCIA et al., 2007). A atividade larvicida contra *A. egypti* tem sido estudada em outras espécies do gênero *Melaleuca*. Em 2011, Park e colaboradores estudaram a atividade larvicida dos óleos essenciais de quatro espécies, com alta mortalidade em 100 ppm para *M. dissitiflora* ($95 \pm 2,8\%$), *M. quinquenervia* ($90 \pm 4\%$), *M. linariifolia* (100%), e baixa letalidade em *M. uncinata* ($27,5 \pm 7,5\%$) (PARK et al., 2011). Amer e Mehlhorn identificaram o efeito larvicida do óleo essencial de *M. leucadendron*, em 50 ppm após 24 horas, com 30% de mortalidade (AMER; MEHLHORN, 2006). O óleo essencial de *M. alternifolia* tem efeito semelhante a *M. linariifolia*,a.

Em paralelo aos estudos de atividade larvicida, ensaios de citotoxicidade foram realizados. Macrófagos murinos da linhagem J774 e queratinócitos humanos da linhagem HaCAT foram expostos ao óleo essencial de *M. alternifolia* no mesmo intervalo de

concentração utilizado nos testes larvicidas (6 – 250 ppm). Nos macrófagos, a viabilidade foi reduzida significativamente a partir de 125 ppm. Contudo, não houve redução significativa de viabilidade em concentrações próximas ao LC₉₀ do óleo contra larvas de *A. aegypti* (~ 100 ppm). Por outro lado, a viabilidade dos queratinócitos HaCAT não foi afetada pela exposição ao óleo de *M. alternifolia*, mesmo em concentração > 100 ppm.

No estudo realizado por Homeyer et al, 90% da viabilidade celular foi mantida em fibroblastos expostos a concentrações de 0,1% a 1%. Para queratinócitos (HEK001), osteoblastos e células endoteliais (HUVECs), a mesma viabilidade foi mantida com 0,1% do óleo (HOMEYER et al., 2015). Em comparação, no presente estudo, queratinócitos HaCat expostos a concentrações mais altas e mantiverem 93% de viabilidade.

Pereira et al demonstraram que o óleo de *M. alternifolia* não apresentou genotoxicidade em células de mamíferos no intervalo de concentração 1-548 ppm. (PEREIRA et al., 2014). Por outro lado, foi demonstrado que o óleo de *M. alternifolia* apresentou efeito imobilizador em *Daphnia magna* em concentrações baixas (EC₅₀=18,614 ppm) após 48 horas de exposição (ÇAKAL ARSLAN et al., 2014). Ainda assim, a aplicação do óleo como larvicida é significativamente mais segura que agentes químicos. *Temephos* apresenta efeito mutagênico em células de camundongos (MÉLO et al., 2008), causa potencial desregulação endócrina (MILLÁN-MEJÍA; GARCÍA-ZEPEDA; HERNÁNDEZ-OCHOA, 2016) e possível indução à danos genéticos em humanos (ZEPEDA-ARCE et al., 2017). Este agente químico organofosforado é cerca de 100 vezes mais tóxico para *Daphnia magna* (EC₅₀=0,15 ug/L) comparado ao óleo de *M. alternifolia* (ABE et al., 2014). Mesmo em concentrações diminutas (1-25 ppm), *Temephos* causa destruição de cartilagem e morte celular em peixes da espécie *Aphanius díspar* (BA-OMAR; AL-JARDANI; VICTOR, 2011). Com relação a outros larvicidas químicos, o diflubenzuron – indicado pelo Ministério da Saúde para substituir o *temefós* em 2013 – apresenta toxicidade aproximadamente 10000 vezes maior que o óleo de *M. alternifolia* (EC₅₀=0,06 ug/L) (ABE et al., 2014; BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE 2014).

Apesar do promissor efeito larvicida e baixa toxicidade, a maioria dos componentes ativos do óleo de *M. alternifolia* são praticamente insolúveis em água (< 9 ppm), com poucas exceções como 1,8-Cineole (907 ppm) (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006b), limitando a utilização deste óleo. Adicionalmente, muitos compostos são instáveis, sendo necessário o desenvolvimento de sistemas capazes proteger o óleo da luz, calor, exposição ao ar e umidade, para uma aplicação larvicida viável.

Nesse contexto, o encapsulamento do óleo de *M. alternifolia* em nanocápsulas poliméricas tem sido abordado como uma estratégia promissora para superar tais limitações (FLORES et al., 2011, 2013; MIRANTE et al., 2018). No presente estudo, suspensões nanoparticuladas contendo o óleo de *M. alternifolia* recém-produzidas apresentaram-se homogêneas, sem sedimentos ou agregados à inspeção visual do seu aspecto macroscópico. Galindo-Rodriguez, S. e colaboradores relatam que a ausência de sinais de instabilidade na suspensão recém-formada está correlacionada com proporções ideais entre a concentração de solvente e concentração de polímero. Em concentrações críticas ocorre formação de agregados poliméricos amorfos, fenômeno explicado por dois fatores: (i) por causa da grande quantidade de cadeias poliméricas por unidade de volume do solvente, a difusão do solvente na fase aquosa carrega mais cadeias de polímeros que, por sua vez agregam e então formam nanopartículas maiores ou agregados amorfos e (ii) pela influência da concentração de polímeros na viscosidade, que provisiona um maior resistência de transferência de massa, então a difusão da fase polímero-solvente na fase externa é reduzida e nanopartículas maiores ou agregados amorfos são formados (GALINDO-RODRIGUEZ et al., 2004).

As cápsulas de PCL produzidas neste trabalho apresentam aspecto esférico em dimensões nanométricas e baixa polidispersão. O encapsulamento do óleo de *M. alternifolia* não alterou, de forma significativa, o tamanho, PDI ou potencial zeta das nanocápsulas, embora haja uma leve redução do diâmetro médio de NC-PCL-TTO em comparação à NC-PCL-BLANK recém-sintetizada. Resultados semelhantes foram observados por Mirante e Flores, possivelmente devido à volatilização e perda do óleo durante o processo de encapsulamento (FLORES et al., 2011; MIRANTE, 2015). No presente estudo, cerca de 30% do óleo foi perdido durante a nanoprecipitação. NC-PCL carregadas apresentaram características físicas semelhantes a outros estudos, o diâmetro médio das nanocápsulas de PCL carregadas foi de $172,41 \pm 59,1$ nm, enquanto Flores e Mirante, produziram nanocápsulas de PCL contendo TTO pelo mesmo método com diâmetros médios entre 166,9 à 211 nm (FLORES et al., 2011; MIRANTE, 2015). Possivelmente, o tamanho reduzido influencia na reatividade do óleo sobre as larvas, visto que, além da maior dispersão e biodisponibilidade, é possível que as nanocápsulas sejam facilmente ingeridas ou até mesmo apresentem penetração tecidual sobre as larvas, indicativos ainda não estudados.

Os sistemas coloidais desenvolvidos exibem PDI de 0,1, similar as características vistas nos estudos de Flores e Mirante (0,17 à 0,28), entretanto, segundo Bhattacharjee, sistemas

apresentando $PDI \leq 0,1$ são considerados altamente monodispersos, enquanto valores de PDI entre 0,1-0,4 e $> 0,4$ são considerados moderadamente e altamente polidispersos, respectivamente (SHANG et al., 2014).

Nanopartículas carregadas apresentaram potencial -26,35 mV. Neste trabalho, houve diferenças significativas no potencial zeta entre nanocápsulas vazias e carregadas. Alguns autores atribuem esse fenômeno à adsorção do princípio ativo à superfície das nanopartículas, alterando seu valor (MOSQUEIRA et al., 2000; SENTHILKUMAR; MISHRA; JAIN, 2008). Potencial zeta (PZ) reflete diferença de potencial entre a dupla camada elétrica (*electric double layer*) de uma partícula eletroforicamente móvel e a camada de dispersante ao redor. Uma das utilizações mais populares dos dados de potencial zeta é relacioná-lo com a estabilidade coloidal, em geral dispersões nanoparticuladas com valores de potencial de ± 20 à 30 mV são considerados moderadamente estáveis e $> \pm 30$ mV, altamente estáveis (PATEL; AGRAWAL, 2011). Entretanto, embora o potencial zeta forneça indicações sobre a estabilidade coloidal, segundo a teoria de DLVO a estabilidade coloidal depende da soma das forças atrativas de Van der Waals e as forças elétricas repulsivas que, por sua vez são indicadas pelo PZ (BHATTACHARJEE, 2016). A formação de agregados ocorre quando as forças de Van der Waals são dominantes, resultado da redução dos valores de PZ e a perda da estabilidade do sistema (ATTWOOD; FLORENCE; ROTHSCILD, 2003), por outro lado, no caso de forças de Van der Waals fracas, valores baixos de repulsão, por exemplo, PZ de 10-15 mV, podem ser o bastante para garantir a estabilidade coloidal (BHATTACHARJEE, 2016). No presente estudo, foi observado nos ensaios de estabilidade físico-química que, embora tenha ocorrido a manutenção do diâmetro médio das nanopartículas carregadas e turbidez das suspensões durante 180 dias, sinais de instabilidade química (agregação de partículas, presença de agregados amorfos e precipitados) começaram a aparecer a partir de 60 dias período no qual as soluções alcançaram valores de pH mais baixos, comportamento atribuído à degradação natural ou microbiana da poli(caprolactona) por hidrólise e a ionização dos grupos carboxílicos presentes (FERNÁNDEZ-URRUSUNO et al., 1999; LACOULONCHE et al., 1999; SCHAFFAZICK; POHLMANN, 2002). O fato é que pH e força iônica influenciam os valores de PZ (BHATTACHARJEE, 2016), o aumento de pH reduziu as forças de repulsão (Anexo IV – figura 14) e embora as forças de Van der Waals não tenham sido investigadas, infere-se que as forças de atrativas não foram fracas o bastante para permitir a manutenção da estabilidade coloidal por maiores períodos. Nanocápsulas de policaprolactona apresentaram valores

negativos de PZ, embora PZ não estime a carga ou densidade da carga de superfície, o valor negativo é condizente com a presença de grupos carboxílicos nas extremidades do polímero, uma vez que PCL é um poliéster. O potencial zeta negativo foi observada em nanopartículas de PCL de diversos estudos (BADRI et al., 2018; BORDES et al., 2010; DO NASCIMENTO et al., 2016; HOMBREIRO PÉREZ et al., 2000; MOLPECERES et al., 1997; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Por outro lado, principal componente químico na estrutura da cutícula externa das larvas de *A. aegypti* é a quitina (FARNESI et al., 2012). Quitina, é um polissacarídeo natural caracterizado por cargas elétrica positiva (CROISIER; JÉRÔME, 2013; KUMAR DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004; PARK; KIM, 2010). Dessa forma, essas condições podem favorecer a interação das nanocápsulas com a cutícula externa das larvas aumentando a eficiência de captação.

A eficiência de encapsulamento foi medida de forma indireta, em comparação com estudos de nanoencapsulamento de produtos naturais (tabela 2), os valores de EE% alcançados foram considerados elevados, do total de óleo disperso nas soluções finais 90,3% está associado a nanocápsulas. Devido à natureza hidrofóbica e praticamente insolúvel do óleo de *Melaleuca* em água (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006a) o teor de óleo livre pode ser explicado pela associação de TTO à tensoativos residuais da formulação. O encapsulamento do *óleo essencial de M. alternifolia* em nanopartículas de PCL por nanoprecipitação foi caracterizado em poucos estudos, nanosistemas desenvolvidos por Flores et al apresentaram EE% de 95,7% e Mirante et al conseguiu EE% de 99,86% (FLORES et al., 2011; MIRANTE, 2015). O encapsulamento do óleo em nanopartículas poliméricas de PCL possibilitou uma a volatilização gradual, durante 30 dias de armazenamento em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sem proteção contra a luz o teor de óleo foi reduzido em apenas 38%, em dois meses a formulação mantém 14% do teor de óleo encapsulado. Avaliando a proteção do óleo contra volatilização, Flores et al demonstrou que após 1 mês de armazenamento das nanocápsulas carregadas em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ protegido contra a luz 91% do óleo encapsulado foi mantido na suspensão, por outro lado em 2 meses o teor de óleo não pôde mais ser determinado Em emulsões, após 60 minutos sob 37°C , 60% do óleo volatiliza ou degrada (FLORES et al., 2011, 2013), em intervalos semelhantes Lins et al demonstraram redução de tamanho em nanoemulsões contendo TTO (FERREIRA LINS et al., 2016).

Apesar das boas características físicas e de estabilidade, nanocápsulas de PCL contendo o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* apresentaram toxicidade muito reduzida comparada

a atividade larvicida do óleo emulsionado. Em 48 horas, o LC₅₀ das nanocápsulas teve um valor 8 vezes maior que o LC₅₀ do óleo em emulsões. Nanopartículas vazias (NE) não apresentaram toxicidade sobre larvas. Diferente das emulsões, NC-PCL-MELA apresentou efeito tóxico de ação lenta. Na ausência de estudos avaliando a atividade de larvicidas de nanopartículas de PCL contendo óleos essenciais sobre o *Aedes aegypti*, esses resultados foram comparados com os poucos estudos existentes avaliando a atividade larvicida de nanopartículas poliméricas contendo diferentes óleos sobre espécies da ordem *Diptera*.

Werdin et al avaliaram a toxicidade de nanopartículas sobre larvas da espécie *Culex pipien pipiens*. quatro tipos de nanopartículas foram produzidas alternando o óleo essencial entre duas espécies, *Geranium maculatum* e *Citrus bergamia* e utilizando dois polímeros diferentes quitosana e polietilenoglicol 600 (PEG). Nanopartículas de PEG foram preparadas pelo método de dispersão de fusão (*metl dispertion method*) processo no qual os óleos (10 g) foram expostos mudanças de temperaturas de 65°C à -4 °C. Nanopartículas de quitosana foram preparadas por gelificação iônica, onde os óleos foram adicionados a solução de ácido acético 0,5% e tripolifosfato pentassódico. Em geral, as nanopartículas testadas apresentaram tamanhos entre 240 a 535 nm, polidispersão moderada e diferentes eficiências de encapsulamentos de acordo com o polímero (PEG-68-77% e quitosana 38-22%). Os resultados de larvicidade apresentados pelos autores foram mais animadores, indicando aumento da toxicidade quando os óleos foram associados a nanopartículas, OE de *Geranium maculatum* e *Citrus bergamia* apresentaram valores de LC₅₀ em 24 horas de 57,28 ppm e 81,45 ppm, respectivamente, enquanto nanopartículas de PEG contendo *Geranium maculatum* 35,64 ppm e *Citrus bergamia* 72,24 ppm. Os resultados com nanopartículas de quitina foram ainda melhores: *Geranium maculatum* 22,63 ppm e *Citrus bergamia* 38,52 ppm. Segundo os autores esse efeito melhorado foi alcançado por uma penetração mais rápida graças ao contato direto das NPs com a cutícula das larvas ou por ingestão e penetração no trato digestivo. Mas os resultados não podem ser bem comparados devido à ausência de informações sobre a toxicidade das nanopartículas vazias, visto o uso de compostos tóxicos nas formulações ou mesmo a probabilidade de toxicidade do próprio polímero (WERDIN GONZÁLEZ et al., 2017).

No presente estudo, as nanocápsulas apresentaram tamanhos menores, maior uniformidade e maior eficiência de encapsulamento, o que, segundo a explicação dos autores, deveria facilitar mais ainda a penetração e exposição às larvas, então porque uma diminuição tão expressiva na toxicidade? Diferentemente do presente estudo, Omar e colaboradores não

expuseram o óleo longas etapas de remoção de solvente e conseqüentemente volatilização do óleo o que de certa maneira foi evidenciado nos estudos de teor de óleo perdido no processo. Uma hipótese levantada foi que esse longo período de remoção de solvente (*overnight* sobre temperatura ambiente) poderia causar uma mudança na estequiometria dos compostos presentes no óleo, em outras palavras, compostos mais voláteis e efetivos poderiam estar sendo perdidos em taxas mais rápidas enquanto compostos menos efetivos e menos voláteis continuariam presentes, tendo em vista que a quantificação do óleo essencial de *M. alternifolia* após o processo de nanoprecipitação foi feita por espectrometria e não cromatografia gasosa, mesmo que valores de concentração de óleo sejam confirmados a proporção dos compostos pode não ter sido mantido, necessitando de mais massa de óleo para alcançar as mesmas concentrações de compostos efetivos presentes em emulsões recém sintetizadas. A característica de alta volatilidade de alguns compostos efetivos também explicaria porque o óleo perde eficiência tão rapidamente se a emulsão de tween 80 não for rapidamente sintetizada e aplicada.

Paula et al, em 2011, associaram o extrato vegetal da semente de *Moringa oleífera* à nanopartículas de *Cashew Gum*, goma do cajueiro e avaliaram a atividade larvicidas em *Aedes aegypti*. Diferentes proporções de biopolímero e extrato vegetal foram avaliadas para produção, NPs produzidas na proporção 1:1 (66 ppm do extrato ativo) foram caracterizadas indicando diâmetro médio de 357 nm, moderadamente polidisperso, PZ positivo (+9,7 mV), eficiência de encapsulamento de 58% e apresentaram as melhores propriedades larvicidas: em 48 horas 78 % das larvas morreram. Infelizmente valores de LC_{50-90} não foram estudados, dificultando a comparação, mas segundo os autores a associação do óleo com o polímero diminuiu a toxicidade do extrato bruto sobre as larvas que em 29 ppm induziu 100% de mortalidade após 15 horas. Por outro lado, a eficiência larvicida das nanopartículas foi mantida mesmo 55 dias após a produção, indicando preservação dos compostos ativos (PAULA et al., 2011) . No estudo de Paula et al, o extrato vegetal de *M. oleífera*, é menos suscetível à volatilização e o processo de formulação não incluiu etapas de degradação por temperaturas ou oxidação. Indicando que a própria associação ao polímero pode ter reduzido atividade larvicida. O que levanta uma segunda hipótese, o encapsulamento em alguns polímeros pode dificultar a interação do composto encapsulado com as larvas. PCL é amplamente caracterizado como um biopolímero de degradação lenta em sistemas biológicos, estrategicamente utilizado como um insumo para sistemas de liberação prolongada que, em alguns caso podem manter um perfil de liberação por meses (CHENG; LEI; GUO, 2010; DASH; KONKIMALLA, 2012; IQBAL;

VALOUR; FESSI, 2014; WEI et al., 2009), por outro lado Balaji et al, estudando o efeito larvicidas de nanoformulações de dietilfenilacetamida em *Culex quinquefasciatus*, propôs que o carreador polimérico desempenha um papel importante na proteção do composto ativo em encontrar enzimas detoxificadoras na região do intestino larval (BALAJI et al., 2017). Se a camada polimérica das nanocápsulas pode impedir a interação do óleo com certas enzimas, é razoável propor que de alguma forma primeiro a matriz polimérica precisa ser degradada para que depois haja o contato direto do óleo com as larvas.

Embora estudos de mecanismo de ação em conjunto com análises refinadas de microscopia necessitem ser realizadas, as imagens das larvas mortas indicaram uma característica interessante, assim como outros trabalhos estudando o efeito tóxico de óleos essenciais sobre larvas da família *Diptera* (CHANTAWEE; SOONWERA, 2018; HUSSEINY; KHOLY; OTHMAN, 2014; OLIVEIRA et al., 2013; PROCÓPIO et al., 2015; YU et al., 2015) as larvas tratadas apresentaram acúmulo de pigmentos escuros em diferentes áreas (Anexo V), o evento pertinente é que a localizações das regiões escurecidas divergiram de acordo com o tipo de tratamento, nas emulsões de tween 80 as larvas apresentaram escurecimento da região torácica enquanto as larvas expostas a nanopartículas de PCL apresentaram regiões escurecidas em diferentes segmentos do abdômen (regiões e respectivos órgão indicados na figura 13). Não houve escurecimento do sifão ou alterações estruturais aparentes dos troncos traqueais, indicando ser menos provável o efeito toxico por via respiratória.

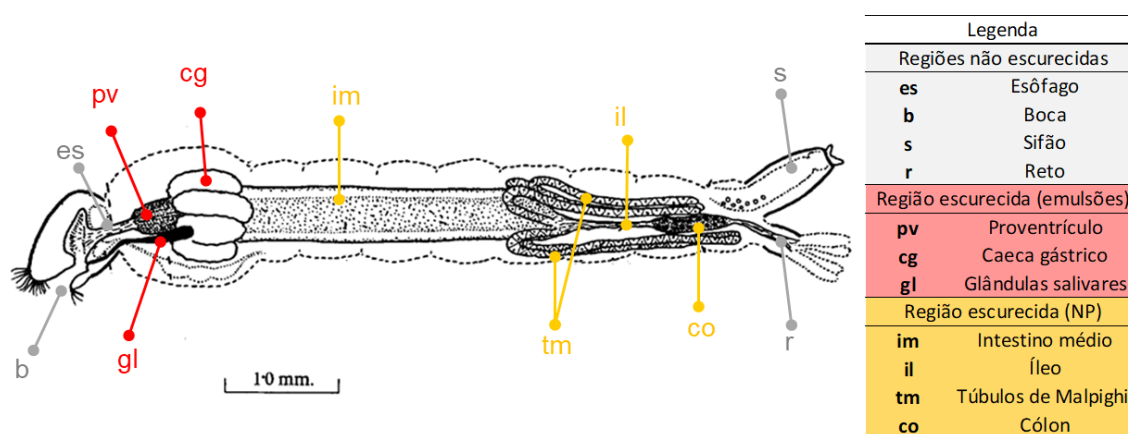


Figura 6. Secção longitudinal da larva de *Aedes aegypti* adaptada de (CHRISTOPHERS, 1961). Ilustração indica as áreas escurecidas em indivíduos expostos aos tratamentos (emulsões e nanocápsulas de PCL contendo óleo essencial de *M. alternifólia*) e órgãos do sistema digestivo presentes nas regiões.

Alguns autores descreveram que o escurecimento possivelmente ocorre devido a sobreposição da cutícula dos segmentos abdominais, também pode estar relacionado com a

degradação de fibras musculares e lesões severas no tecido intestinal e epitelial (HUSSEINY; KHOLY; OTHMAN, 2014; OLIVEIRA et al., 2013). Essas diferentes regiões de escurecimento, ainda que necessitem maiores investigações, podem indicar que as nanocápsulas de PCL impedem o contato rápido e direto entre o óleo e a às estruturas iniciais do sistema digestivo da larva, o que também pode ter causado redução de toxicidade e ação moderadamente mais lenta.

7 CONCLUSÃO

Esse trabalho foi idealizado como uma prova de conceito e investigação sobre o potencial de nanopartículas poliméricas contendo óleos essenciais como uma nova estratégia para o combate ao *Aedes aegypti*. O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* apresentou atividade larvicida satisfatória sobre *Aedes aegypti*, sendo muitos dos seus compostos classificados como inseticidas alternativos promissores. As concentrações letais deste óleo para as larvas não apresentaram toxicidade em células de mamíferos. Por outro lado, o óleo é facilmente susceptível à muitos fenômenos de instabilidade, dificultando sua manipulação durante o processo de nanoformulação e manutenção da atividade biológica. Mesmo evitando a exposição do óleo a mudanças de temperatura e luz, a etapa de remoção de solvente por agitação magnética *overnight* causa perdas de óleo e possivelmente a redução da toxicidade sobre as larvas. Sugere-se também que polímeros de degradação mais rápida em sistemas biológicos sejam utilizados. A redução da atividade larvicida do óleo quando encapsulado em nanocápsulas de poli(caprolactona) também pode estar relacionada a dificuldade das larvas em degradarem o polímero, o que reduz a interação dos compostos ativos com os sítios efetores. Embora a atividade larvicida do sistema seja muito reduzida em comparação com o óleo em emulsões, foi possível observar que as nanocápsulas poliméricas aumentaram a estabilidade do óleo permitindo a manutenção da atividade biológica após alguns dias de formulação. Isto demonstra a importância do desenvolvimento das nanocápsulas, as quais podem oferecer vantagem sobre a atividade larvicida de médio e longo prazo, já que estes nanocarreadores controlam a liberação dos compostos bioativos. Ensaio de atividade residual sobre larvas de *Aedes aegypti* poderão elucidar estas propriedades e estabelecer o potencial das nanocápsulas com maior robustez. Por fim, a nanoformulação polimérica proposta neste trabalho pode ser otimizada visando um refinamento da sua atividade larvicida através de um desenvolvimento farmacotécnico mais amplo ou de técnicas de bioconjugação de superfície, permitindo um direcionamento da nanopartícula a um alvo específico na estrutura larvária.

REFERÊNCIAS

- ABE, F. R. *et al.* Ecotoxicity and environmental risk assessment of larvicides used in the control of *Aedes aegypti* to *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 77, n. 1–3, p. 37–45, 20 fev. 2014.
- ABREU, F. O. M. S. M. S. *et al.* Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1277–1282, ago. 2012.
- ADLARD, E. R. **K. Hüsnü can başer and gerhard buchbauer (eds.): handbook of essential oils. science, technology and applications.** 2nd ed. [s.l.] CRC Press, 2016. v. 79
- ALI, A. *et al.* Chemical composition, larvicidal, and biting deterrent activity of essential oils of two subspecies of *Tanacetum argenteum* (Asterales: Asteraceae) and individual constituents against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 4, p. 824–830, 1 jul. 2014.
- ALQAHTANI, F. S. *et al.* Green and facile biosynthesis of silver nanocomposites using the aqueous extract of *Rubus ellipticus* leaves: Toxicity and oviposition deterrent activity against Zika virus, malaria and filariasis mosquito vectors. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 20, n. 1, p. 157–164, mar. 2017.
- AMER, A.; MEHLHORN, H. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). **Parasitology Research**, v. 99, n. 4, p. 466–472, 27 set. 2006.
- ARTSOB, H.; LINDSAY, R.; DREBOT, M. Arboviruses. In: **International Encyclopedia of Public Health**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 154–160.
- ATTWOOD, D.; FLORENCE, A. T.; ROTHSCHILD, Z. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. v. 4. [s.l.: s.n.].
- AZARUDEEN, R. M. S. T. *et al.* Size-controlled biofabrication of silver nanoparticles using the *Merremia emarginata* leaf extract: Toxicity on *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and non-target mosquito predators. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 20 no 2 p. 359-366 2017.
- BA-OMAR, T. A.; AL-JARDANI, S.; VICTOR, R. Effects of pesticide temephos on the gills of *Aphanius dispar* (Pisces: Cyprinodontidae). **Tissue and Cell**, v. 43, n. 1, p. 29–38, 2011.
- BADRI, W. *et al.* Poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles loaded with indomethacin and *Nigella Sativa* L. essential oil for the topical treatment of inflammation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 46, p. 234–242, ago. 2018.
- BALA MURUGAN, S.; SATHISHKUMAR, R. Chikungunya infection: A potential re-emerging global threat. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 933–937, 2016.
- BALAJI, A. P. B. *et al.* Polymeric nanoencapsulation of insect repellent: Evaluation of its bioefficacy on *Culex quinquefasciatus* mosquito population and effective impregnation onto cotton fabrics for insect repellent clothing. **Journal of King Saud University - Science**, v. 29, n. 4, p. 517–527, out. 2017.

- BALAKRISHNAN, S.; SRINIVASAN, M.; MOHANRAJ, J. Biosynthesis of silver nanoparticles from mangrove plant (*Avicennia marina*) extract and their potential mosquito larvicidal property. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, n. 3, p. 991–996, 30 set. 2016.
- BALASUBRAMANI, G. *et al.* GC-MS analysis of bioactive components and synthesis of gold nanoparticle using *Chloroxylon swietenia* DC leaf extract and its larvicidal activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 148, p. 1–8, 2015.
- BALDACCHINO, F. F. *et al.* Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: A review. **Pest Management Science**, v. 71, n. 11, p. 1471–1485, nov. 2015.
- BANIK, B. L.; FATTAHI, P.; BROWN, J. L. Polymeric nanoparticles: The future of nanomedicine. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 8, n. April, 2015.
- BARERAS-URBINA, C. G. *et al.* Nano- and micro-particles by nanoprecipitation: possible application in the food and agricultural industries. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 9, p. 1912–1923, 2016.
- BARGIELOWSKI, I. E.; LOUNIBOS, L. P.; CARRASQUILLA, M. C. Evolution of resistance to satyriization through reproductive character displacement in populations of invasive dengue vectors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 8, p. 2888–2892, 19 fev. 2013.
- BAKIK, T. K.; KAMARAJU, R.; GOWSWAMI, A. Silica nanoparticle: a potential new insecticide for mosquito vector control. **Parasitology Research**, v. 111, n. 3, p. 1075–1083, 8 set. 2012.
- BELLINATO, D. F. *et al.* Resistance status to the insecticides temephos, deltamethrin, and diflubenzuron in Brazilian *aedes aegypti* populations. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.
- BENELLI, G. *et al.* Biototoxicity of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) essential oil against the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), and its parasitoid *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae). **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 596–603, 2013.
- BENELLI, G. Plant-mediated biosynthesis of nanoparticles as an emerging tool against mosquitoes of medical and veterinary importance: a review. **Parasitology Research**, v. 115, n. 1, p. 23–34, 5 jan. 2016.
- BENELLI, G.; CASELLI, A.; CANALE, A. Nanoparticles for mosquito control: Challenges and constraints. **Journal of King Saud University - Science**, 2016.
- BESNARD, M. *et al.* . Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 19, n. 13, 3 abr. 2014.
- BHATT, S. *et al.* . The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 7 abr. 2013.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.

BHUVANESWARI, R.; XAVIER, R. J.; ARUMUGAM, M. Larvicidal property of green synthesized silver nanoparticles against vector mosquitoes (*Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*). **Journal of King Saud University - Science**, v. 28, n. 4, p. 318–323, 2016.

BILAL, H.; HASSAN, S. A. Plants secondary metabolites for mosquito control. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, n. 2, p. 168, abr. 2012.

BILIA, A. R. *et al.* Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

BISHOP, C. D. Antiviral activity of the essential oil of melaleuca alternifolia (maiden amp; betche) cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, n. 6, p. 641–644, nov. 1995.

BORDES, C. *et al.* Determination of poly(ϵ -caprolactone) solubility parameters: Application to solvent substitution in a microencapsulation process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, n. 1–2, p. 236–243, jan. 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Larvicidas**. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/control-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas/larvicidas>. Acesso em: 22 nov. 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a semana epidemiológica 7, 2017**. Ministério da Saúde.

BROPHY, J. J.; CRAVEN, L. A.; DORAN, J. C. Melaleucas: their botany, essential oils and uses. **ACIAR Monograph**, v. 156, p. 415 pp., 2013.

BROWN, J. E. *et al.* Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. **Evolution**, v. 68, n. 2, p. 514–525, 2014.

BUSTOS-SEGURA, C.; KÜLHEIM, C.; FOLEY, W. Effects of terpene chemotypes of melaleuca alternifolia on two specialist leaf beetles and susceptibility to myrtle rust. **Journal of Chemical Ecology**, v. 41, n. 10, p. 937–947, 2015.

ÇAKAL ARSLAN, Ö. *et al.* Acute toxicity of several essential oils on *Daphnia magna* (Straus, 1816). **Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 31, n. 3, p. 137–143, 20 jul. 2014.

CALDEFIE-CHÉZET, F. *et al.* Potential anti-inflammatory effects of Melaleuca alternifolia essential oil on human peripheral blood leukocytes. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 5, p. 364–370, 2006.

CALVET, G. *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 653–660, jun. 2016.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885–1886, out. 2015.

- CAPEDING, M. R. *et al.* Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 384, n. 9951, p. 1358–1365, out. 2014.
- CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 50, 2006a.
- CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 50–62, 1 jan. 2006b.
- CARVALHO, F. D.; MOREIRA, L. A. Why is Aedes aegypti Linnaeus so Successful as a Species? **Neotropical Entomology**, v. 46, n. 3, p. 243-255, jun. 2017.
- CASSADOU, S. *et al.* Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 13, p. 20752, 3 abr. 2014.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **First case of Zika virus reported in Puerto Rico** | CDC Online Newsroom | CDC. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/media/releases/2015/s1231-zika.html>>. Acesso em: 3 maio. 2017.
- CHA, K. *et al.* Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 11, p. 1893–1899, 5 nov. 2008.
- CHANTAWEE, A.; SOONWERA, M. Efficacies of four plant essential oils as larvicide , pupicide and oviposition deterrent agents against dengue fever mosquito , Aedes aegypti Linn. (Diptera : Culicidae). v. 8, n. 4, p. 217–225, 2018.
- CHEN, R.; VASILAKIS, N. Dengue — Quo tu et quo vadis? **Viruses**, v. 3, n. 12, p. 1562–1608, 1 set. 2011.
- CHENG, L.; LEI, L.; GUO, S. In vitro and in vivo evaluation of praziquantel loaded implants based on PEG/PCL blends. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 387, n. 1–2, p. 129–138, mar. 2010.
- CHENG, S.-S. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito Aedes aegypti larvae. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 99–102, ago. 2003.
- CHENG, S. S. *et al.* Larvicidal activities of wood and leaf essential oils and ethanolic extracts from Cunninghamia konishii Hayata against the dengue mosquitoes. **Industrial Crops and Products**, v. 47, p. 310–315, 1 maio 2013.
- CHRISTOFOLI, M. *et al.* Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from Zanthoxylum rhoifolium (Rutaceae) in Bemisia tabaci populations. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 301–308, 2015.
- CHRISTOPHERS, S. R. Aedes Aegypti (L.), the yellow fever mosquito. its life history, bionomics, and structure. Sir S. Rickard Christophers. **Science**, v. 133, n. 3463, p. 1473–1474, 12 maio 1961.

- CLETON, N. *et al.* Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 3, p. 191–203, 2012.
- CONTI, B. *et al.* Mosquitocidal essential oils: are they safe against non-target aquatic organisms? **Parasitology Research**, v. 113, n. 1, p. 251–259, 22 jan. 2014.
- COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 7, p. 1417–1450, 21 jul. 2006.
- CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 4, p. 780–792, 1 abr. 2013.
- D. J. GUBLER, G. KUNO, AND L. M. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M. *et al.* (Eds.). **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia, Pa, USA: Lippincott-Raven Publishers, 2007. p. 1497–1526.
- DASH, T. K.; KONKIMALLA, V. B. Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 1, p. 15–33, 2012.
- DAVID, M. R.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FREITAS, R. M. DE. Container productivity, daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* mosquitoes in a high income dengue epidemic neighbourhood of Rio de Janeiro: presumed influence of differential urban structure on mosquito biology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, p. 927–932, set. 2009.
- DE JONG, W. H. *et al.* Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study in rats. **Biomaterials**, v. 34, n. 33, p. 8333–8343, nov. 2013.
- DE JONG, W. H.; BORM, P. J. A. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. **International journal of nanomedicine**, v. 3, n. 2, p. 133–149, 2008.
- DE OLIVEIRA, E. F.; PAULA, H. C. B.; PAULA, R. C. M. DE. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 146–151, jan. 2014.
- DEL CARPIO-ORANTES, L. Zika, a neurotropic virus? **Revista Medica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v. 54, n. 4, p. 540–3, 2016.
- DIALLO, M. *et al.* Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 60, n. 2, p. 281–6, fev. 1999.
- DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. **Parasitology Research**, v. 113, n. 2, p. 565–592, 22 fev. 2014.
- DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–20, set. 1952.
- DO NASCIMENTO, T. G. *et al.* Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nanoscale Research**

Letters, v. 11, n. 1, 2016.

DOS SANTOS, C. A. *et al.*. Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity, and safety issues. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 103, n. 7, p. 1931–44, jul. 2014.

DOS SANTOS DIAS, L. *et al.* Toxicity of spinosad to temephos-resistant *Aedes aegypti* populations in Brazil. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0173689, 16 mar. 2017.

DOS SANTOS, T. *et al.* Zika Virus and the Guillain-Barre Syndrome - Case Series from Seven Countries. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 16, p. 1598–1601, 20 out. 2016.

DUARTE, J. L. *et al.* Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of rosmarinus officinalis essential oil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 2, p. 189–192, 2015.

DUFFY, M. R. *et al.* Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 11 jun. 2009.

DUPUIS-MAGUIRAGA, L. *et al.* Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 3, p. e1446, 27 mar. 2012.

DURINGER, J. M. *et al.* Acute aquatic toxicity of western juniper (*Juniperus occidentalis*) foliage and Port Orford cedar (*Chamaecyparis lawsoniana*) heartwood oils. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 170, n. 1–4, p. 585–598, 22 nov. 2010.

ELUMALAI, D. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticle using *Achyranthes aspera* and its larvicidal activity against three major mosquito vectors. **Engineering in Agriculture, Environment and Food**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2016.

ELUMALAI, D. *et al.* Evaluation of phytosynthesised silver nanoparticles from leaf extracts of *Leucas aspera* and *Hyptis suaveolens* and their larvicidal activity against malaria, dengue and filariasis vectors. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 2, n. 4, p. 15–26, 2017.

F. ROCHA FORMIGA, E. ANSORENA, A. E.-H. DE M. Y OTROS. 2. Nanosistemas a base de poliésteres. **Nanotecnología farmacéutica: realidades y posibilidades farmacoterapéuticas.**, p. 41–101, 2009.

FABREGA, J. *et al.* Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. **Environment International**, v. 37, n. 2, p. 517–531, 2011.

FARES, R. C. G. *et al.* Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–13, 2015.

FARIA, N. R. *et al.* Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. aaf5036, 2016.

FARNESI, L. C. *et al.* Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 124–126, fev. 2009.

FARNESI, L. C. *et al.* Physiological and morphological aspects of *Aedes aegypti* developing larvae: effects of the chitin synthesis inhibitor novaluron. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30363, 24 jan. 2012.

- FARNESI, L. C. *et al.* Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 10, p. 1–20, 2017.
- FAULL, K. J.; WILLIAMS, C. R. Intraspecific variation in desiccation survival time of *Aedes aegypti* (L.) mosquito eggs of Australian origin. **Journal of Vector Ecology**, v. 40, n. 2, p. 292–300, dez. 2015.
- FAULL, K. J.; WILLIAMS, C. R. Differentiation of *Aedes aegypti* and *Aedes notoscriptus* (Diptera: Culicidae) eggs using scanning electron microscopy. **Arthropod Structure & Development**, v. 45, n. 3, p. 273–280, 2016.
- FELLNER, C. Zika in America : The Year in Review Zika in America : The Year in Review. v. 41, n. 12, p. 778–791, 2016.
- FERNÁNDEZ-URRUSUNO, R. *et al.* Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. **Pharmaceutical research**, v. 16, n. 10, p. 1576–81, out. 1999.
- FERREIRA LINS, R. *et al.* On the formation, physicochemical properties and antibacterial activity of colloidal systems containing tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 497, p. 271–279, maio 2016.
- FESSI, H. *et al.* Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1–R4, out. 1989.
- FILLINGER, U.; LINDSAY, S. W. Larval source management for malaria control in Africa: myths and reality. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 353, 2011.
- FINNEY, D. J. Probit Analysis. 2nd ed. By D. J. Finney. Cambridge University Press, New York, 1952. 22.5 × 14 cm. xiv + 318 pp. **Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)**, v. 41, n. 11, p. 627, 1 nov. 1952.
- FLORES, F. C. *et al.* Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 968–972, 2011.
- FLORES, F. C. *et al.* Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, v. 175, n. 3–4, p. 281–286, 8 abr. 2013.
- FREIRE, C. C. DE M. *et al.* . Spread of the pandemic Zika virus lineage is associated with NS1 codon usage adaptation in humans. **bioRxiv**, 25 nov. 2015.
- GALINDO-RODRIGUEZ, S. *et al.* Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 8, p. 1428–1439, ago. 2004.
- GARDEA-TORRESDEY, J. L. *et al.* Formation and growth of Au nanoparticles inside live alfalfa plants. **Nano Letters**, v. 2, n. 4, p. 397–401, 2002.
- GAROZZO, A. *et al.* In vitro antiviral activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 806–808, 2009.
- GAROZZO, A. *et al.* Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on Influenza virus A/PR/8: Study on the mechanism of action. **Antiviral Research**, v. 89, n. 1, p. 83–88, 2011.

GATHERER, D.; KOHL, A. Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 2, p. 269–273, 1 fev. 2016.

GEORGE, L. *et al.* Community-effectiveness of temephos for Dengue vector control: a systematic literature review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, 2015.

GOINDIN, D. *et al.* Levels of insecticide resistance to deltamethrin, malathion, and temephos, and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from the Guadeloupe and Saint Martin islands (French West Indies). **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, p. 38, 2017.

GOMES, P. R. B. *et al.* Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial do *Zingiber officinale* Roscoe (gengibre) frente ao mosquito *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2 suppl 1, p. 597–604, 2016.

GÓMEZ-RINCÓN, C. *et al.* Activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil against L3 larvae of *Anisakis simplex*. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

GOVINDARAJAN, M.; BENELLI, G. Eco-friendly larvicides from Indian plants: Effectiveness of lavandulyl acetate and bicyclogermacrene on malaria, dengue and Japanese encephalitis mosquito vectors. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 133, p. 395–402, 2016.

GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M.; BENELLI, G. Chemical composition, toxicity and non-target effects of *Pinus kesiya* essential oil: An eco-friendly and novel larvicide against malaria, dengue and lymphatic filariasis mosquito vectors. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 129, p. 85–90, 2016.

GRANDADAM, M. *et al.* Chikungunya Virus, Southeastern France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 910–913, maio 2011.

GRANDO, T. H. *et al.* *Melaleuca alternifolia* anthelmintic activity in gerbils experimentally infected by *Haemonchus contortus*. **Experimental Parasitology**, v. 170, p. 177–183, 2016.

GRUBAUGH, N. D.; ANDERSEN, K. G. Navigating the Zika panic. **F1000Research**, v. 5, p. 1914, 2016.

GUZMAN, M. G. *et al.* Dengue. In: **International Encyclopedia of Public Health**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 233–257.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **The Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453–465, 2015.

HALDAR, K. M.; HALDAR, B.; CHANDRA, G. Fabrication, characterization and mosquito larvicidal bioassay of silver nanoparticles synthesized from aqueous fruit extract of putranjiva, *Drypetes roxburghii* (Wall.). **Parasitology Research**, v. 112, n. 4, p. 1451–1459, 22 abr. 2013.

HART, P. H. *et al.* Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflammation Research**, v. 49, n. 11, p. 619–626, 1 nov. 2000.

HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality**

Weekly Report, v. 65, n. 3, p. 55–58, 29 jan. 2016.

HER, Z. *et al.* Chikungunya: a bending reality. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 14–15, p. 1165–1176, dez. 2009.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological reviews**, v. 53, n. 2, p. 242–55, jun. 1989.

HOLLAND, J. *et al.* Rapid evolution of RNA genomes. **Science**, v. 215, n. 4540, p. 1577–85, 26 mar. 1982.

HOMBREIRO PÉREZ, M. vThe preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. **Journal of Controlled Release**, v. 65, n. 3, p. 429–438, abr. 2000.

HOMEYER, D. C. *et al.* In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on filamentous fungi and toxicity to human cells. **Medical Mycology**, v. 53, n. 3, p. 285–294, 2015.

HOSSEINI, S. F. *et al.* Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 50–56, 2013.

HU, J. *et al.* Effect of chitosan nanoparticles loaded with cinnamon essential oil on the quality of chilled pork. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 519–526, 2015.

HUANG, L. *et al.* Green synthesis of iron nanoparticles by various tea extracts: Comparative study of the reactivity. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 130, p. 295–301, 15 set. 2014.

HUSSEINY, I. M. EL; KHOLY, S. E. EL; OTHMAN, A. A. Laboratory testing of the toxicity of Jujube (*Zizyphus jujuba*) oil and leaf extracts against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **African Entomology**, v. 22, n. 4, p. 755–761, dez. 2014.

INSTITUT PASTEUR. **Neural stem cells infection by Zika virus in the mouse developing neocortex**. Disponível em: <<https://research.pasteur.fr/en/project/neural-stem-cells-infection-by-zika-virus-in-the-mouse-developing-neocortex/>>. Acesso em: 4 maio. 2017.

IOOS, S. *et al.* Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302–307, jul. 2014.

IQBAL, M.; VALOUR, J.; FESSI, H. Preparation of biodegradable PCL particles via double emulsion evaporation method using ultrasound technique. 2014.

IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 2638, 2011.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, n. 8, p. 603–608, 2000.

KALEPU, S.; NEKKANTI, V. Insoluble drug delivery strategies: Review of recent advances and business prospects. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 442–453, 2015.

KARIUKI NJENGA, M. *et al.* Tracking epidemic Chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 11, p. 2754–2760, 1 nov. 2008.

KEY Messages – ZIKA virus disease. 2017.

KINDHAUSER, M. K. *et al.* Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 9, p. 675–686C, 1 set. 2016.

KOMALAMISRA, N. *et al.* Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 36, n. 6, p. 1412–22, nov. 2005.

KRAEMER, M. U. G. *et al.* The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. **Scientific Data**, v. 2, p. 150035, 7 jul. 2015a.

KRAEMER, M. U. G. G. U. *et al.* The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. **eLife**, v. 4, n. JUNE2015, p. 1–18, 30 jun. 2015b.

KUMAR DUTTA, P.; DUTTA, J.; TRIPATHI, V. S. **Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications** **Journal of Scientific & Industrial Research**. [s.l: s.n.].

Disponível em:

<https://pdfs.semanticscholar.org/af57/fa5a2b237174301b9b2740adbb531a4a527.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2018.

KUMAR, P. v Preparation and characterization of PEG-Mentha oil nanoparticles for housefly control. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 707–713, 2014.

KUMAR, S.; LATHER, V.; PANDITA, D. Green synthesis of therapeutic nanoparticles: an expanding horizon. **Nanomedicine**, v. 10, n. 15, p. 2451–2471, ago. 2015.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 1 jan. 2010.

KUNO, G.; CHANG, G.-J. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Archives of Virology**, v. 152, n. 4, p. 687–696, 3 abr. 2007.

LACEY, L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, n. 2 Suppl, p. 133–63, jul. 2007.

LACOUILONCHE, F. *et al.* Stability and in vitro drug release of flurbiprofen-loaded poly-epsilon-caprolactone nanospheres. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 25, n. 9, p. 983–93, set. 1999.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, ago. 2008.

LEE, D. C.; AHN, Y.-J. Laboratory and simulated field bioassays to evaluate larvicidal activity of pinus densiflora hydrodistillate, its constituents and structurally related compounds against *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens* in relation to their inhibi. **Insects**, v. 4, n. 2, p. 217–29, 30 maio 2013.

- LEE, Y. S. *et al.* Silver nanoparticles induce apoptosis and G2/M arrest via PKC ζ -dependent signaling in A549 lung cells. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 12, p. 1529–1540, 25 dez. 2011.
- LEHANE, M. J.; LEHANE, M. J. **The biology of blood-sucking in insects**. [s.l.] Cambridge University Press, 2005.
- LEITMEYER, K. C. *et al.* Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 73, n. 6, p. 4738–47, jun. 1999.
- LEVI, T. *et al.* Growth and development of *Aedes aegypti* larvae at limiting food concentrations. **Acta Tropica**, v. 133, n. 1, p. 42–44, 2014.
- LIAKOS, I. L. *et al.* Polylactic acid-lemongrass essential oil nanocapsules with antimicrobial properties. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 3, 2016.
- LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, n. 0, p. 1–7, 2016.
- LIU, X. C. *et al.* Essential oil composition and larvicidal activity of *Toddalia asiatica* roots against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 3, p. 1197–1203, 28 mar. 2013.
- LUCIA, A. *et al.* Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, n. 3, p. 299–303, set. 2007.
- MACCUSPIE, R. I. Colloidal stability of silver nanoparticles in biologically relevant conditions. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 7, p. 2893–2908, 28 jul. 2011.
- MADALOSSO, R. G. *et al.* In vitro and in vivo effects of *Melaleuca alternifolia* nanoparticles in *Meloidogyne* sp. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 20, n. 4, p. 1344–1349, 2017.
- MAHESWARAN, R.; IGNACIMUTHU, S. A novel herbal formulation against dengue vector mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Parasitology Research**, v. 110, n. 5, p. 1801–1813, 1 maio 2012.
- MANCEAU, A. *et al.* Formation of metallic copper nanoparticles at the soil-root interface. **Environmental science & technology**, v. 42, n. 5, p. 1766–72, 1 mar. 2008.
- MARCHIOL, L. *et al.* In vivo synthesis of nanomaterials in plants: location of silver nanoparticles and plant metabolism. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 101, 2014.
- MARTINES, R. B. *et al.* *Notes from the Field*: Evidence of Zika Virus infection in brain and placental tissues from two congenitally infected newborns and two fetal losses — Brazil, 2015. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 06, p. 1–2, 10 fev. 2016.
- MARTÍNEZ RIVAS, C. J. *et al.* Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 532, n. 1, p. 66–81, out. 2017.
- MELO-SANTOS, M. A. V. *et al.* Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. **Acta Tropica**, v. 113, n. 2, p. 180–189, 2010.

- MÉLO, M. E. B. de *et al.* **Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos** *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)* scielosp , 2008.
- MILADI, K. *et al.* Nanoprecipitation process: from particle preparation to in vivo applications. In: VAUTHIER, C.; PONCHEL, G. (Eds.). **Polymer Nanoparticles for Nanomedicines**. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 39. p. 17–53.
- MILLÁN-MEJÍA, L.; GARCÍA-ZEPEDA, S. P.; HERNÁNDEZ-OCHOA, I. Temephos decreases ovarian antral follicle growth in an in vitro system. **Toxicology Letters**, v. 259, n. 2016, p. S236, out. 2016.
- MIRANTE, D. C. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antimicrobiana de micropartículas de polilisina e de nanocápsulas contendo óleo essencial de Melaleuca alternifolia cheel (myrtaceae)**. [s.l.] Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2015.
- MIRANTE, D. C. *et al.* Determination of melaleuca alternifolia cheel essential oil in polymeric nanocapsules suspensions. v. 37, n. 7, p. 1463–1467, 2018.
- MLAKAR, J. *et al.* Zika Virus associated with microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–958, 10 mar. 2016.
- MOLONEY, R. M. *et al.* Incubation periods of mosquito-borne viral infections: a systematic review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 5, p. 882–891, 7 maio 2014.
- MOLPECERES, J. *et al.* Stability of cyclosporine-loaded poly-sigma-caprolactone nanoparticles. **J Microencapsul.**, v. 14, n. 6, p. 777–87., 26 jan. 1997.
- MONDAL, N. K. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles and its application for mosquito control. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. S1, 2014.
- MONTENEGRO, L. H. M. *et al.* Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de Pouteria venosa (Sapotaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 611–617, dez. 2006.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1, p. 113–142, 2010.
- MOREIRA, M. F.; MANSUR, J. F.; FIGUEIRA-MANSUR, J. Resistência e inseticidas: estratégias , desafios e perspectivas no controle de insetos . **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**, p. 1–23, 2012.
- MOSQUEIRA, V. C. F. *et al.* Poly(D,L- Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 5, p. 614–626, maio 2000.
- MOTA, M. T. DE O. *et al.* Mosquito-transmitted viruses – the great Brazilian challenge. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 1–13, 2016.
- NAIKA, H. R. *et al.* Green synthesis of CuO nanoparticles using Gloriosa superba L. extract and their antibacterial activity. **Journal of Taibah University for Science**, v. 9, n. 1, p. 7–12, 1 jan. 2015.

- NAKAYAMA, K. *et al.* Terpinen-4-ol inhibits colorectal cancer growth via reactive oxygen species. **Oncology Letters**, v. 14, n. 2, p. 2015–2024, 2017.
- NASCIMENTO, A. M. D. **Atividade repelente e larvicida de *Xylopi* *laevigata*, *X. frutescens* (Annonaceae) e *Lippia pedunculosa* (Verbenaceae) sobre mosquitos *Aedes aegypti* (Diptera –Culicidae).** [s.l: s.n.].
- NENE, V. *et al.* Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. **Science (New York, N.Y.)**, v. 316, n. 5832, p. 1718–1723, 2007.
- OKUMU, F. O.; KNOLS, B. G.; FILLINGER, U. Larvicidal effects of a neem (*Azadirachta indica*) oil formulation on the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Malaria Journal**, v. 6, n. 1, p. 63, 2007.
- OLIVEIRA, G. L. *et al.* Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 4, p. 1227–1234, 10 nov. 2013.
- ORIVE, G. *et al.* Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 9, p. 682–692, set. 2009.
- PAN-IN, P. *et al.* Cellular trafficking and anticancer activity of *Garcinia mangostana* extract-encapsulated polymeric nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 3677–3686, 2014.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Number of Reported Cases of Dengue and Sever Dengue (SD) in the Americas.**
- PAPLOSKI, I. A. D. *et al.* . Storm drains as larval development and adult resting sites for *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Salvador, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 419, 2016.
- PARK, B. K.; KIM, M.-M. Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n. 12, p. 5152–64, 2010.
- PARK, H.-M. *et al.* Larvicidal activity of myrtaceae essential oils and their components against *aedes aegypti*, acute toxicity on *daphnia magna*, and aqueous residue. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 2, p. 405–410, 1 mar. 2011.
- PARK, K. Nanotechnology: What it can do for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 120, n. 1–2, p. 1–3, 16 jul. 2007.
- PATEL, V. R.; AGRAWAL, Y. K. Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 2, n. 2, p. 81–7, abr. 2011.
- PATIL, C. D. *et al.* Larvicidal activity of silver nanoparticles synthesized using *Plumeria rubra* plant latex against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Parasitology Research**, v. 110, n. 5, p. 1815–1822, 18 maio 2012.
- PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. **The Western Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 6, p. 671–679, 2016.

- PAULA, H. C. B. *et al.* Preparation and characterization of chitosan/cashew gum beads loaded with *Lippia sidoides* essential oil. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, n. 2, p. 173–178, 2011.
- PAVELA, R. Insecticidal properties of *Pimpinella anisum* essential oils against the *Culex quinquefasciatus* and the non-target organism *Daphnia magna*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 17, n. 3, p. 287–293, set. 2014.
- PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 174–187, dez. 2015.
- PAVELA, R.; GOVINDARAJAN, M. The essential oil from *Zanthoxylum monophyllum* a potential mosquito larvicide with low toxicity to the non-target fish *Gambusia affinis*. **Journal of Pest Science**, v. 90, n. 1, p. 369–378, 19 fev. 2017.
- PENFOLD, A. R.; GRANT, R. **The Germicidal Values of Some Australian Essential Oils and Their Pure Constituents: Together with Those for Some Essential Oil Components, and Synthetic Substances**. Royal Society of New South Wales, 1925
- PEREIRA, T. S. *et al.* . In vitro genotoxicity of *Melaleuca alternifolia* essential oil in human lymphocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 2, p. 852–857, 2014.
- PETROS, R. A; DESIMONE, J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 8, p. 615–627, 2010.
- PINTO, N. DE O. F. *et al.* Production and physico-chemical characterization of nanocapsules of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 279–288, 2016.
- PINTO, V. V. *et al.* Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: Effect of the synthesis and storage conditions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 364, n. 1–3, p. 19–25, jul. 2010.
- PLOURDE, A. R.; BLOCH, E. M. A Literature Review of Zika Virus. **Emerging Infectious Disease**, v. 22, n. 7, p. 1185–1192, jul. 2016.
- POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. DE O.; ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 813–816, dez. 2003.
- POSSAS, C. Zika: what we do and do not know based on the experiences of Brazil. **Epidemiology and Health**, v. 38, n. May 2015, p. e2016023, 2016.
- POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 9, p. 2363–2377, 1 set. 2007.
- PROCÓPIO, T. F. *et al.* *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* Larvae. **PLOS One**, v. 10, n. 5, p. e0126612, 14 maio 2015.
- PUNDIR, C. S. Introduction to Enzyme and Nanotechnology. In: **Enzyme Nanoparticles**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 1–7.

- RAHMAN, M. F. *et al.* Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. **Toxicology Letters**, v. 187, n. 1, p. 15–21, 22 maio 2009.
- RAJ, K. J. A.; VISWANATHAN, B. Single-step synthesis and structural study of mesoporous sulfated titania nanopowder by a controlled hydrolysis process. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 1, n. 11, p. 2462–2469, 25 nov. 2009.
- RAMACHANDRAN, V. *et al.* Impact of Chikungunya on health related quality of life Chennai, South India. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51519, 12 dez. 2012.
- RAMOS-CASTAÑEDA, J. *et al.* Dengue in Latin America: systematic review of molecular epidemiological trends. **PLoS neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005224, 9 jan. 2017.
- RAVI KIRAN, S. *et al.* Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 18, p. 2481–2484, dez. 2006.
- REZZA, G. *et al.* Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. **Lancet**, v. 370, n. 9602, p. 1840–6, 1 dez. 2007.
- ROBIN, S. *et al.* Severe bullous skin lesions associated with Chikungunya virus infection in small infants. **European Journal of Pediatrics**, v. 169, n. 1, p. 67–72, 29 jan. 2010.
- ROCHA, H. D. R. *et al.* Susceptibility profile of *Aedes aegypti* from Santiago Island, Cabo Verde, to insecticides. **Acta Tropica**, v. 152, p. 66–73, 2015.
- RODRIGUES, E. DA C. R. *et al.* Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (*Copaifera duckei*) oleoresin. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 6, p. 699–705, 30 nov. 2014.
- ROSS, R. W. A laboratory technique for studying the insect transmission of animal viruses, employing a bat-wing membrane, demonstrated with two African viruses. **The Journal of hygiene**, v. 54, n. 2, p. 192–200, jun. 1956.
- SAP-IAM, N. *et al.* UV Irradiation-induced Silver Nanoparticles as Mosquito Larvicides. **Journal of Applied Sciences**, v. 10, n. 23, p. 3132–3136, 1 dez. 2010.
- SAWARE, K.; VENKATARAMAN, A. Biosynthesis and Characterization of Stable Silver Nanoparticles Using *Ficus religiosa* Leaf Extract: A Mechanism Perspective. **Journal of Cluster Science**, v. 25, n. 4, p. 1157–1171, 15 jul. 2014.
- SCHAFFAZICK, S.; POHLMANN, A. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farm.** ..., 2002.
- SCHNITZLER, P.; SCHÖN, K.; REICHLING, J. Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. **Die Pharmazie**, v. 56, n. 4, p. 343–7, abr. 2001.
- SCHULER-FACCINI, L. *et al.* Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 59–62, 29 jan. 2016.

- SCOTT, T. W.; TAKKEN, W. Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 3, p. 114–121, mar. 2012.
- SELCK, F. W.; ADALJA, A. A.; BODDIE, C. R. An Estimate of the global health care and lost productivity costs of Dengue. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 11, p. 824–826, nov. 2014.
- SENTHILKUMAR, M.; MISHRA, P.; JAIN, N. K. Long circulating PEGylated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticulate delivery of Docetaxel to solid tumors. **Journal of Drug Targeting**, v. 16, n. 5, p. 424–35, 2008.
- SHANG, L. *et al.* Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, p. 5, 2014.
- SHANKAR, S. S. *et al.* Bioreduction of chloroaurate ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 1822, 19 jun. 2003.
- SHANKAR, S. S. *et al.* Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n. 2, p. 496–502, 15 jul. 2004.
- SHEPARD, D. S. *et al.* Economic Impact of Dengue Illness in the Americas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 200–207, 4 fev. 2011.
- SHEPARD, D. S.; UNDURRAGA, E. A.; HALASA, Y. A. Economic and disease burden of Dengue in Southeast Asia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 2, p. e2055, 21 fev. 2013.
- SILVA, L. L. *et al.* Effects of anesthesia with the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. in parameters of fish stress. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 2, p. 215–223, jun. 2015.
- SILVA, W. J. *et al.* Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3251–3255, 2008.
- SIMON, F. *et al.* Chikungunya Infection. **Medicine**, v. 86, n. 3, p. 123–137, maio 2007.
- SIMOY, M. I.; SIMOY, M. V.; CANZIANI, G. A. The effect of temperature on the population dynamics of *Aedes aegypti*. **Ecological Modelling**, v. 314, p. 100–110, out. 2015.
- SMITHBURN, K. C. Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 69, n. 2, p. 223–34, ago. 1952.
- SOLÈ, I. *et al.* Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 376, n. 1, p. 133–139, jun. 2012.
- SOLIGNAT, M. *et al.* Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 2, p. 183–197, out. 2009.
- SONG, J. Y.; KIM, B. S. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 1, p. 79–84, 26 jan. 2009.

- SONG, J. Y.; KWON, E.-Y.; KIM, B. S. Biological synthesis of platinum nanoparticles using *Diopyros kaki* leaf extract. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, n. 1, p. 159–164, 23 jan. 2010.
- SOUTHWELL, I. A.; RUSSELL, M. F. Volatile oil comparison of cotyledon leaves of chemotypes of *Melaleuca alternifolia*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 4, p. 391–3, fev. 2002.
- STANDISH, K. et al. High dengue case capture rate in four years of a cohort study in Nicaragua compared to national surveillance data. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. e633, 16 mar. 2010.
- STEINHAEUER, D. A.; DOMINGO, E.; HOLLAND, J. J. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. **Gene**, v. 122, n. 2, p. 281–8, 15 dez. 1992.
- SUBARANI, S.; SABHANAYAKAM, S.; KAMARAJ, C. Studies on the impact of biosynthesized silver nanoparticles (AgNPs) in relation to malaria and filariasis vector control against *Anopheles stephensi* Liston and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 487–499, 12 fev. 2013.
- SZTANKAY-GULYÁS, M.; LÁNG, F. Mosquito control with integrated method. **Wiadomości parazytologiczne**, v. 18, n. 4, p. 629–33, 1972.
- TADROS, T. *et al.* Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, maio 2004.
- TANAKA, K.; CHUJO, Y. Design of functionalized nanoparticles for the applications in nanobiotechnology. **Advanced Powder Technology**, v. 25, n. 1, p. 101–113, 2014.
- TANG, H. *et al.* Zika Virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, p. 587–590, maio 2016.
- THONGGOOM, O. *et al.* In vitro controlled release of clove essential oil in self-assembly of amphiphilic polyethylene glycol-block-polycaprolactone. **Journal of Microencapsulation**, v. 33, n. 3, p. 239–248, 2 abr. 2016.
- TSETSARKIN, K. A.; MCGEE, C. E.; HIGGS, S. Chikungunya virus adaptation to *Aedes albopictus* mosquitoes does not correlate with acquisition of cholesterol dependence or decreased pH threshold for fusion reaction. **Virology Journal**, v. 8, n. 1, p. 376, 2011.
- VALLE, D.; PIMENTA, DN; CUNHA, R. **Dengue : Teorias e Práticas**. 1° edition ed. [s.l.] Editora Fiocruz, 2015.
- VANNICE, K. S.; DURBIN, A.; HOMBACH, J. Status of vaccine research and development of vaccines for dengue. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2934–2938, jun. 2016.
- VASANTHA-SRINIVASAN, P. *et al.* Acute toxicity of chemical pesticides and plant-derived essential oil on the behavior and development of earthworms, *Eudrilus eugeniae* (Kinberg) and *Eisenia fetida* (Savigny). **Environmental Science and Pollution Research**, 17 jun. 2017.
- VEERAKUMAR, K.; GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M. Green synthesis of silver nanoparticles using *Sida acuta* (Malvaceae) leaf extract against *Culex quinquefasciatus*,

- anopheles stephensi, and Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 12, p. 4073–4085, 2013.
- VENTURA, C. V. *et al.* Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 79, n. 1, p. 1–3, 2016.
- VILCHIS-NESTOR, A. R. *et al.* Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using Camellia sinensis extract. **Materials Letters**, v. 62, n. 17–18, p. 3103–3105, 30 jun. 2008.
- VILLAR, L. *et al.* . Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 2, p. 113–123, 8 jan. 2015.
- VU, D. M.; JUNGKIND, D.; ANGELLE DESIREE LABEAUD. Chikungunya Virus. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 37, n. 2, p. 371–382, 2017.
- WAGNER, J. M. *et al.* Enhanced production of Chikungunya Virus-like particles using a high-ph adapted spodoptera frugiperda insect cell line. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e94401, 8 abr. 2014.
- WALIWIYIYA, R.; KENNEDY, C. J.; LOWENBERGER, C. A. Larvicidal and oviposition-altering activity of monoterpenoids, trans -anithole and rosemary oil to the yellow fever mosquito Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). **Pest Management Science**, v. 65, n. 3, p. 241–248, mar. 2009.
- WANG, W.; KIRSCH, T. Annexin V/ β 5 integrin interactions regulate apoptosis of growth plate chondrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 41, p. 30848–30856, 13 out. 2006.
- WARIKOO, R.; WAHAB, N.; KUMAR, S. Oviposition-altering and ovicidal potentials of five essential oils against female adults of the dengue vector, Aedes aegypti L. **Parasitology Research**, v. 109, n. 4, p. 1125–1131, 29 out. 2011.
- WEI, X. *et al.* Biodegradable poly(ϵ -caprolactone)–poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, n. 1, p. 1–18, out. 2009.
- WERDIN GONZÁLEZ, J. O. *et al.* Polymer nanoparticles containing essential oils: new options for mosquito control. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 20, p. 17006–17015, 3 jul. 2017.
- WHO. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**. [s.l.: s.n.].
- WHO. Global strategy for dengue prevention and control 2012–2020. **World Health Organization**, p. 43, 2012.
- WHO. Chikungunya. **WHO**, 2017.
- WHO. WHO Director-General addresses media after Zika Emergency Committee. **WHO**, 2016.
- WHO. Zika virus. **WHO**, 2017.
- WHO. Zika virus infection – El Salvador. **WHO**, 2015.

- WHO. Zika virus infection – France - French Guiana and Martinique. **WHO**, 2016.
- WHO. Zika virus infection – Honduras. **WHO**, 2015.
- WHO. Zika virus infection – Mexico. **WHO**, 2015.
- WHO. Zika virus infection – Panama. **WHO**, 2016.
- WHO. Zika virus infection – Paraguay. **WHO**, 2015.
- WHO. Zika virus infection – Venezuela. **WHO**, 2015.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance. **World Health Organization**, v. 1, n. 6, p. 1–104, 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. **Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases**, p. x, 147, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fact sheet n° 117**.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly Epidemiological Report. **World Health Organization**, v. 30, n. 30, p. 349–364, 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Number of reported cases of chikungunya fever in the Americas, by country or territory 2013-2016 (to week noted) Cumulative cases (Updated as of 5 maio 2017). **Pan American Health Organization**, v. 2017, p. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics, 2017.
- XIA, T. *et al.* Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. **Nano Letters**, v. 6, n. 8, p. 1794–1807, ago. 2006.
- YACTAYO, S. *et al.* Epidemiology of chikungunya in the Americas. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. Suppl 5, p. S441–S445, 2016.
- YIM, W. T. *et al.* Repellent effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against cattle tick larvae (*Rhipicephalus australis*) when formulated as emulsions and in β -cyclodextrin inclusion complexes. **Veterinary Parasitology**, v. 225, p. 99–103, 2016.
- YU, K.-X. *et al.* Mosquitocidal and oviposition repellent activities of the extracts of seaweed *Bryopsis pennata* on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 14082–14102, 4 ago. 2015.
- ZEPEDA-ARCE, R. *et al.* Oxidative stress and genetic damage among workers exposed primarily to organophosphate and pyrethroid pesticides. **Environmental Toxicology**, n. January, p. 1754–1764, 2017.
- ZHANG, Z. *et al.* Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 5, n. 3, p. 205–218, 1 maio 2013.

APÊNCIDE**ANEXO I – DADOS DE BIOENSAIOS ENSAIOS DO ÓLEO DE *MELALEUCA LIVRE E NANOENCAPSULADO***

Tabela 9 Tabela de mortalidade de ensaios iniciais. Número de larvas mortas após 24 e 48 horas de exposição ao óleo essencial de *M. alternifolia* nas concentrações de 10, 100, 1000 e 10000 ppm.

| | | Número de larvas mortas em várias concentrações | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----------|---|-----|----|-----|-----|------|-----------------|----|-----|-------|----|-----|-----|------|-----------------|----|
| | | 24 hr | | | | | | | | | 48 hr | | | | | | |
| | | CN1 | CN2 | 10 | 100 | 500 | 1000 | 10 ⁴ | CP | CN1 | CN2 | 10 | 100 | 500 | 1000 | 10 ⁴ | CP |
| Data | Replicate | 0 | 0 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 | 7 | 0 | 0 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 | 7 |
| 24/out | 1 | 0 | 0 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 | 7 | 0 | 0 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 | 7 |
| 25/out | 2 | 0 | 0 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 | 0 |
| 26/out | 3 | 0 | 0 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 | 9 | 0 | 0 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 | 9 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 30 | 30 | 30 | 30 | 16 | 0 | 0 | 0 | 30 | 30 | 30 | 30 | 16 |
| | % mortal | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 53 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 53 |

Tabela 10 Tabela de mortalidade em intervalos ajustados. Número de larvas mortas após 24 e 48 horas de exposição ao óleo essencial de *M. alternifolia* nas concentrações 10, 25, 75 e 100 e 250 ppm.

| | | Número de larvas mortas em várias concentrações | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|----------------|---|-----|----|----|-------|-------|-------|--------|--------|------------|-----|----|----|-------|-------|-------|--------|
| | | 24 hr | | | | | | | | | 48 hr | | | | | | | |
| Data | Replicate | CN1 | CN2 | 10 | 25 | 50 | 75 | 100 | 250 | CP | CN1 | CN2 | 10 | 25 | 50 | 75 | 100 | 250 |
| 31/out | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 10 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 10 | 10 |
| 01/nov | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 2 | 10 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 2 | 10 | 10 |
| 02/nov | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 9 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 9 | 10 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 9 | 29 | 30 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 11 | 29 | 30 |
| | Desvio padrão | | | | | 3,46 | 1,00 | 0,58 | 0,00 | 0,00 | | | | | 3,46 | 1,53 | 0,58 | 0,00 |
| | % mortal | | | | | 20,0% | 30,0% | 96,7% | 100,0% | 100,0% | | | | | 20,0% | 36,7% | 96,7% | 100,0% |
| | LC 50 (CL 95%) | 69,374 ppm | | | | | | | | | 68,325 ppm | | | | | | | |
| | LC 90 (CL 95%) | 101,56 ppm | | | | | | | | | 98,908 ppm | | | | | | | |

CN1 Solução de Twen 80/MilliQ

CN2 Água Mineral

CP Temephos 0,1%

Tabela 11 Tabela de mortalidade em intervalos ajustados. Número de larvas mortas após 24 e 48 horas de exposição a nanocápsulas de PCL contendo o óleo essencial de *M. alternifolia* nas concentrações 500, 700, 900 e 1000 ppm.

| | | No. De larvas mortas em várias concentrações (ppm) após exposição (hr) | | | | | | | | | | | | | |
|--------|---------------|--|------|-------|-------|-------|-------|--------|------|-------|-------|-------|-------|--------|--|
| | | 24 hr | | | | | | | | 48 hr | | | | | |
| Data | Replicate | CN1 | CN2 | 500 | 700 | 900 | 1000 | CP | CN1 | CN2 | 500 | 700 | 900 | 1000 | |
| 12/dez | 1 | 0 | 0 | 3 | 5 | 8 | 9 | 10 | 0 | 0 | 5 | 8 | 6 | 10 | |
| 12/dez | 2 | 0 | 0 | 1 | 5 | 6 | 10 | 10 | 0 | 0 | 5 | 8 | 6 | 10 | |
| 12/dez | 3 | 0 | 0 | 3 | 3 | 9 | 10 | 10 | 0 | 0 | 3 | 4 | 10 | 10 | |
| | Total | 0 | 0 | 7 | 13 | 23 | 29 | 30 | 0 | 0 | 13 | 20 | 22 | 30 | |
| | Desvio padrão | | | 1,15 | 1,15 | 1,53 | 0,58 | 0,00 | | | 1,15 | 2,31 | 2,31 | 0,00 | |
| | Média | 0 | 0 | 2,33 | 4,33 | 7,67 | 9,67 | 10,00 | 0,00 | 0,00 | 4,33 | 6,67 | 7,33 | 10,00 | |
| | % mortal | 0,0% | 0,0% | 23,3% | 43,3% | 76,7% | 96,7% | 100,0% | 0,0% | 0,0% | 43,3% | 66,7% | 73,3% | 100,0% | |

CN1 Nanoesferas de PCL

CN2 Água Mineral

CP Temephos 0,1%

ANEXO II- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE *Melaleuca alternifolia*

Tabela 12 Relação de estudos avaliando a atividade biológica de componentes isolados da *M. alternifolia*.

| Componente | Propriedade biológica | Espécie(s) | Referência |
|------------------|--|---|---|
| α -pineno | Tripanocida | <i>Trypanosoma evansi</i> | (Amaral et al., 2016) |
| | Larvicida | <i>Anopheles subpictus, Aedes albopictus e Culex tritaeniorhynchus</i> | (Govindarajan, Rajeswary, Hoti, Bhattacharyya, & Benelli, 2016) |
| | | <i>Aedes aegypti</i> | (Lucia et al., 2007) |
| | Repelente | <i>Musca domestica L.</i> | (Haselton et al., 2015) |
| | Repelente contra baratas | <i>Blattella germanica L. e Supella longipalpa Fabricius</i> | (Oz, Koc, Yanikoglu, & Cetin, 2013) |
| | Leishmanicida | <i>Leishmania amazonenses</i> | (Rodrigues et al., 2015) |
| β -pineno | Microbicida | <i>Candida albicans, Staphylococcus aureus,</i> | (A. C. R. da Silva et al., 2012; Uribe, Ramirez, & Peña, 1985) |
| | | <i>Cryptococcus neoformans</i> | |
| | Anti-viral | <i>Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)</i> | (Astani & Schnitzler, 2014) |
| | Larvicida | <i>Aedes aegypti</i> | (Ali et al., 2014; Lucia et al., 2007) |
| α -cymeno | Larvicida | <i>Aedes aegypti, A. albopictus, Culex pipens pallens</i> | (Lee & Ahn, 2013) |
| 1,8-cineol | Repelente | <i>Aedes aegypti</i> | (Klocke, Darlington, & Balandrin, 1987) |
| | Larvicida | <i>Aedes aegypti</i> | (Lucia et al., 2007) |
| | Repelente | <i>Musca domestica L.</i> | (Kumar, Mishra, Malik, & Satya, 2013) |
| | Microbicida | <i>Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Cryptococcus neoformans</i> | (Vuuren & Viljoen, 2007) |
| | Repelente e Cupinicida | <i>Coptotermes gestroi e Coptotermes curvignathus</i> | (Abdullah et al., 2015) |
| | Inseticida contra Gorgulhos e besouros | <i>Sitophilus granarius, S. zeamais, Tribolium castaneum e Prostephanus truncatus</i> | (Obeng-Ofori, Reichmuth, Bekele, & Hassanali, 1997) |

| | | | |
|---------------------|--|---|--|
| Limoneno | Larvicida | <i>Aedes aegypti</i> , <i>A. albopictus</i> , <i>Culex pipens pallens</i> | (Lee & Ahn, 2013) |
| | | <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> | (Cheng et al., 2013) |
| | Tripanocida | <i>Trypanosoma cruzi</i> | (Moreno, Leal, Stashenko, & García, 2018) |
| | Inibidor de ovoposição, larvicida e pupicida | <i>Culex quinquefasciatus</i> | (Andrade-Ochoa et al., 2018) |
| | Microbicida | <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , and <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Saccharomyces bayanus</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , e <i>Rhodotorula bacarum</i> | (Bevilacqua, Corbo, & Sinigaglia, 2010; Espina, Gelaw, de Lamo-Castellví, Pagán, & García-Gonzalo, 2013) |
| | Antiviral | <i>herpes simplex vírus tipo 1 (HSV 1)</i> | (Astani & Schnitzler, 2014) |
| Terpinen-4-ol | Inibidor de ovoposição, larvicida e pupicida | <i>Culex quinquefasciatus</i> | (Andrade-Ochoa et al., 2018) |
| | Larvicida | <i>Anopheles stephensi</i> , <i>Anopheles subpictus</i> , <i>Culex quinquefasciatus</i> e <i>Culex tritaeniorhynchus</i> | (Govindarajan, Rajeswary, Hoti, & Benelli, 2016) |
| | | <i>Aedes aegypti</i> | (Lee & Ahn, 2013) |
| | Repelente contra baratas | <i>Blattella germanica L. and Supella longipalpa Fabricius</i> | (Oz et al., 2013) |
| | Inseticida contra traças | <i>Mythimna separata</i> | (Ma & Zhang, 2004) |
| | Antiparasitário | <i>Anisakis simplex</i> | (Gómez-Rincón et al., 2014) |
| α -terpineol | Inseticida contra gorgulho | <i>Sitophilus zeamais</i> | (Yildirim, Emsen, & Kordali, 2013) |
| | Inseticida contra gorgulho | <i>Sitophilus zeamais</i> | (Yildirim et al., 2013) |
| | Microbicida | <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>methicillin-resistant S. aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Mycobacterium intracellulare</i> | (Özek, Tabanca, Demirci, Wedge, & Hüsni Can Başer, 2010) |
| | Antimalárico | <i>Plasmodium falciparum</i> | (Özek et al., 2010) |
| | Repelente contra traça | <i>Lycorma delicatula</i> | (Yoon et al., 2011) |

| | | | |
|---------------|---------------------------------|--|--|
| | Repelente contra mosquito | <i>Aedes aegypti</i> | (Müller et al., 2009) |
| | Inseticida contra barbeiro | <i>Rhodnius prolixus</i> | (Sfara, Zerba, & Alzogaray, 2009) |
| β-cariofileno | Larvicida | <i>Anopheles subpictus, Aedes albopictus e Culex tritaeniorhynchus</i> | (Govindarajan, Rajeswary, Hoti, Bhattacharyya, et al., 2016) |
| | | <i>Aedes aegypti, A. albopictus, Culex pipens pallens</i> | (Lee & Ahn, 2013) |
| | Tripanocida | <i>Trypanosoma evansi</i> | (Amaral et al., 2016) |
| | Microbicida | <i>Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Enterococcus faecalis, Aspergillus niger, A. fumigates, A. parasiticum e Fusarium solani</i> | (Dahham et al., 2015; Selestino Neta et al., 2017) |
| | Anticancer | | (Dahham et al., 2015; Selestino Neta et al., 2017) |
| β-selineno | Inseticida contra mosca | <i>Drosophila melanogaster L</i> | (Chu, Jiang, & Liu, 2011) |
| Globulol | Antimicrobiano | <i>Alternaria solani, Fusarium oxysporum f.sp. niverum, F. graminearum, Rhizoctonia solani and Venturia pirina Xanthomonas vesicatoria, Bacillus subtilis</i> | (Tan et al., 2008) |
| | Anestésico e Sedativo em Peixes | <i>Rhamdia quelen</i> | (L. L. Silva et al., 2013) |

ANEXO III – ESTABILIDADE COLOIDAL: Potencial Zeta

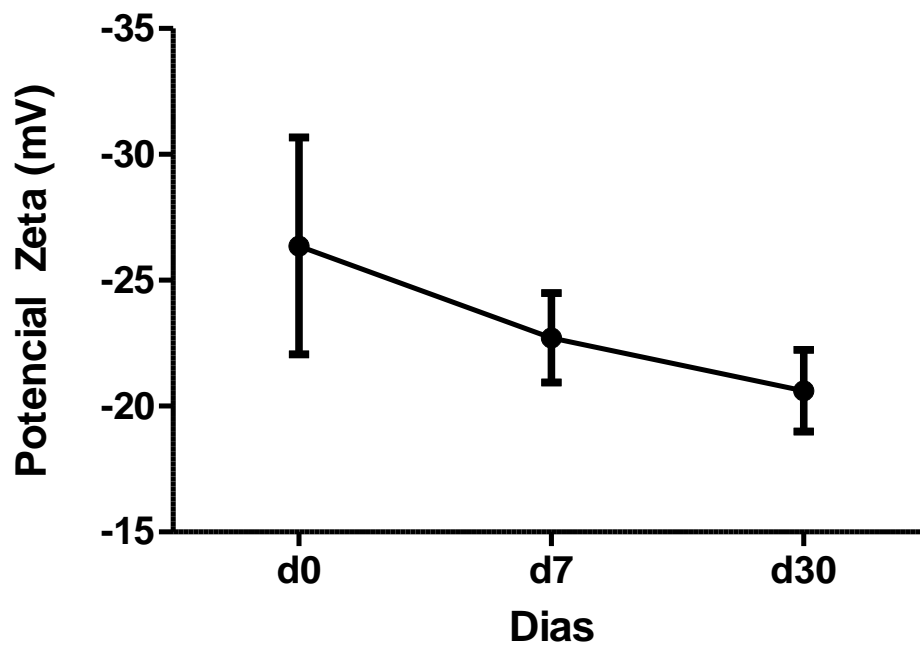


Figura 7 Monitoramento por 30 dias do Potencial Zeta de nanocápsulas de PCL contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*.

ANEXO IV– MORFOLOGIA DAS LARVAS



Figura 15. Aspecto morfológico de larvas de *Aedes aegypti* após exposição ao óleo de *Melaleuca alternifolia* por 24 horas. As larvas apresentaram escurecimento na região superior do tórax.



Figura 16 Aspecto morfológico de larvas de *Aedes aegypti* após exposição nanocápsulas poliméricas de PCL contendo óleo essencial de *M. alternifolia* por 24 horas. As larvas apresentaram escurecimento em diferentes segmentos do abdômen.