



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PROPESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA
(PPGIF)

NANOEMULSÕES CARREADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Piper*
***alatipetiolatum* E *Piper purusatum* (PIPERACEAE): EFICIENTES**
BIODEFENSIVOS NO CONTROLE DOS VETORES DA DENGUE E
MALÁRIA

ANDRÉ CORREA DE OLIVEIRA

MANAUS

2020

ANDRÉ CORREA DE OLIVEIRA

**NANOEMULSÕES CARREADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Piper
alatipetiolatum* E *Piper purusanum* (PIPERACEAE): EFICIENTES
BIODEFENSIVOS NO CONTROLE DOS VETORES DA DENGUE E
MALÁRIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas (PPGIF-UFAM) como requisito para obtenção do título de doutor.

Área de atuação: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura - UFAM

Coorientadora: Profa. Dra. Rosemary Aparecida Roque - INPA

MANAUS

2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo autor.

Oliveira, André Correa de

O48p Nanoemulsões carregadas com óleos essenciais de *Piper alatipetiolatum* e *Piper purusanum* (Piperaceae): eficientes biodefensivos no controle dos vetores da dengue e da malária / André Correa de Oliveira. 2020

142 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Rita de Cássia Saraiva

Nunomura Coorientadora: Rosemary

Aparecida Roque

Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. *Aedes*. 2. *Anopheles*. 3. *Piper*. 4. óleo
essencial. 5. nanosistemas. I. Nunomura, Rita de
Cássia Saraiva. II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

André Correa de Oliveira

Nanoemulsões carregadas com óleos essenciais de *Piper alatipetiolatum* e *Piper purusanum* (Piperaceae) como bioinseticidas no controle dos vetores da dengue e malária.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas (PPGIF-UFAM) como requisito para obtenção do título de doutor.

Área de atuação: Fármacos e Medicamentos.

Aprovado em: 31/08/2020

Banca Examinadora

Titular: Profa. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura
(Orientadora)

Instituição: UFAM

Assinatura:



Titular: Profa. Dra. Antônia Queiroz de Souza

Instituição: UFAM

Assinatura:



Titular: Profa. Dra. Eunice da Silva Medeiros do Vale

Instituição: INPA

Assinatura:



Titular: Prof. Dr. Edgar Aparecido Sanches

Instituição: UFAM

Assinatura:



Titular: Profa. Dra. Tatiane Pereira Souza

Instituição: UFAM

Assinatura:



Dedico esta tese a minha mãe Denise, por sempre me apoiar nesta longa e árdua jornada na busca de um futuro melhor. E acima de tudo, pela incrível mulher que ela é. Também dedico ao meu irmão Jack, irmã Aline e pai João.

Este estudo também é dedicado à memória de Susan Helena, que Deus a tenha!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo!

A minha co-orientadora, Dra. Rosemary A. Roque, a quem chamo carinhosamente de segunda mãe, por ter-me apresentado a este magnífico universo da pesquisa, e até hoje, você faz parte da minha vida academia e profissional. Agradeço a você por todos os ensinamentos a mim repassados, os quais não consigo mensurar o quão valiosos são para mim. Ao Dr. Tadei por me aceitar na imensa família que é o laboratório de Malária e Dengue (LMD), e pelos valiosos ensinamentos.

Aos amigos do LMD Hergen e Cláudia, por sempre me ajudarem nos intensos experimentos, pela incrível amizade, pelo apoio mútuo, pela zoeira nos momentos em que eu estava quase pirando ou me fazerem torrar os miolos com dúvidas de estatística ou bioensaios. Aos amigos Rejane e Augusto, pela incrível troca de experiência.

A minha orientadora e terceira mãe, Dra. Rita Nunomura. A quem me apresentou o mundo da fitoquímica. Sua orientação foi imprescindível para tornar minha dificuldade em fitoquímica em paixão! Agradeço pela confiança a mim depositada ao abrir as portas do LAEQ. Também não consigo mensurar o quão importante você foi para mim. Aos amigos do LAEQ: Ingridy, Rochelly ao me ajudarem na fitoquímica e incrível amizade.

Ao Dr. Edgar Sanches por ter aberto as portas do NANOPOL, permitindo aprimorar meus conhecimentos no magnífico mundo da nanotecnologia. Agradeço sua ajuda, orientação e apoio. Aos amigos Max e Sidney pela essencial ajuda na formulação dos nanosistemas. E também ao Matheus, Laiane e Josi pela troca de experiência.

A Dra. Tatiane Souza por ter aberto as portas do LIDETEF, permitindo a realização da análise do potencial zeta dos nanosistemas. Do contrário, eu teria que ir para outro estado para realizar tal análise. Sou grato pela orientação.

Ao Dr. Leandro Pocrifka por também abrir as portas do LEEN e ao Brener pela realização das análises morfológicas dos nanosistemas.

Ao Dr. Carlos Cleomir por ser um grande amigo.

Ao Dr. Sergio Nunomura pela imensurável ajuda em resolver o quebra-cabeça chamado *P. alatipetiolatum*, me salvou aos 45 minutos do 2º tempo.

A cada um de vocês, eu tenho eterno respeito, admiração e gratidão.

Ah, também agradeço aos meus animais Fuk, Silent Hill, Mingau, Nicko, Pitoco, Nana, Poseidon e Tomy.

Ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica e a FAPEAM pela concessão da bolsa

*A compaixão para com os animais é das mais
nobres virtudes da natureza humana.*

Charles Darwin, 1809 – 1882.

RESUMO

Os mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Anopheles* são os principais transmissores da dengue, chikungunya, zika e malária, respectivamente em todo o mundo. O controle desses vetores é um problema de saúde pública devido à resistência aos inseticidas sintéticos. Contudo, nanoemulsões carregadas com óleos essenciais apresentam uma ferramenta alternativa e segura no controle desses mosquitos. O objetivo deste estudo foi identificar a eficiência das nanoemulsões carregadas com os óleos essenciais de *Piper alatipetiolatum* e *Piper purusanum* no controle dos vetores de arboviroses e malária. O óleo essencial de *P. alatipetiolatum* com rendimento de $7,6 \pm 0,3\%$ foi caracterizado majoritariamente com sesquiterpeno (63%) e sesquiterpenos oxigenados (33%). As principais substâncias foram ishwarone (78,58%), β -elemeno (6,87%), ishwarane (2,36%) e selin-11-en-4 α -ol (2,88%) e ishwarol B (8,2%). Enquanto o óleo essencial de *P. purusanum* extraído com rendimento de $4,2 \pm 0,7\%$ foi constituído majoritariamente de sesquiterpenos (53,8%), sesquiterpenos oxigenados (30,7%) e monoterpenos oxigenados (15,3). As principais substâncias identificadas no óleo essencial de *P. purusanum* foram β -cariofileno (57,05%), α -humuleno (14,50%), germacreno D (8,20%), β -selineno (2,10%), α -selineno (4,42%), δ -cadineno (2,04%), *E*-nerolidol (4,23%) e óxido de cariofileno (3,46%). Os óleos essenciais de *P. purusanum* e *P. alatipetiolatum* na concentração de 31,25 ppm inibiram a eclosão de 100% dos ovos de *Aedes aegypti* e *A. albopictus*, enquanto na concentração de 200 ppm causaram a morte de 100% de larvas (CL_{50} de 33,74 a 62,33 ppm) e de 89 e 94% de pupas (CL_{50} de 66,17 a 91,39 ppm) de *A. aegypti* e *A. albopictus*, respectivamente, ao mesmo tempo em que na concentração de 125 ppm mataram 100% das larvas de *Anopheles darlingi*, *An. triannulatus*, *An. nuneztovari* e *An. albitarsis* (CL_{50} de 48,60 a 52,60 ppm). Essas atividades foram correlacionadas à inibição da AChE com percentuais de inibição de 83 e 88% (IC_{50} de 2,14 e 1,94 $\mu\text{g/mL}$). Além disso, os óleos essenciais também demonstraram atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* com CIM de 0,5 a 125 $\mu\text{g/mL}$. A segurança dos óleos essenciais foi avaliada contra organismo aquático não-alvo, *Artemia salina* com CL_{50} de 2.122,07 a 2.231,95 $\mu\text{g/mL}$. As nanoemulsões carregadas com os óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* (NEPa) e *P. purusanum* (NEPp) foram constituídas com nanopartículas de morfologia aproximadamente esférica com tamanhos médios de 135 e 315,6 nm, PDI de 0,044 a 0,092, pH entre 4,9 a 5,7 e potencial zeta de -14,40 a -8,51 mV. NEPa e NEPp nas concentrações de 31,25 ppm inibiram 100% dos ovos, enquanto que na de 25 ppm mataram 100% das larvas (CL_{50} de 4,01 a 5,40 ppm) e 83 a 100% das pupas (CL_{50} de 5,34 a 7,69 ppm) de *A. aegypti* e *A. albopictus*, respectivamente. Em sequência, de 94 a 100% das larvas de *Anopheles* morreram na concentração de 25 ppm (CL_{50} de 3,87 a 9,81 ppm). O efeito residual das nanoemulsões foi superior aos óleos essenciais, com percentual 100 a 2% de larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* mortas entre o 1º a 10º dia, respectivamente. Esses resultados demonstram que as nanoemulsões carregadas com os óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* são uma ferramenta segura no controle das populações de *Aedes* e *Anopheles*.

PALAVRAS-CHAVE: *Aedes*, *Anopheles*, *Piper*, óleo essencial, nanosistemas, controle biológico.

ABSTRACT

Mosquitoes of the genera *Aedes* and *Anopheles* are the main transmitters of chikungunya, zika and malaria, respectively worldwide. The control of these vectors is a public health problem due to resistance to synthetic insecticides. However, nanoemulsions carried with essential oils present an alternative and safe tool in the control of these mosquitoes. The objective of this study was to identify the efficiency of nanoemulsions carried with the essential oils of *Piper alatipetiolatum* and *Piper purusum* in the control of arboviruses and malaria vectors. The essential oil of *P. alatipetiolatum* with yield of $7.6 \pm 0.3\%$ was characterized mainly with sesquiterpene (67%) and oxygenated sesquiterpenes (33%). The main substances were isowarone (78.58%), β -elemene (6.87%), isowarane (2.36%) e selin-11-en-4 α -ol (2.88%) e isowarol (8.2%). While the essential oil of *P. purusum* extracted with a yield of $4.2 \pm 0.7\%$ consisted mostly of sesquiterpenes (53.8%), oxygenated sesquiterpenes (30.7%) and oxygenated monoterpenes (15.3). The main substances identified in the essential oil of *P. purusum* were β -caryophyllene (57.05%), α -humulene (14.50%), germacrene D (8.20%), β -selinene (2.10%), α -selinene (4.42%), δ -cadinene (2.04%), *E*-nerolidol (4.23%) and caryophyllene oxide (3.46%). The essential oils of *P. purusum* and *P. alatipetiolatum* at a concentration of 31.25 ppm inhibited the hatching of 100% of the eggs of *Aedes aegypti* and *A. albopictus*, while at the concentration of 200 ppm caused the death of 100% of larvae (LC_{50} from 33.74 to 62.33 ppm) and 89 and 94% of pupae (LC_{50} from 66.17 to 91.39 ppm) of *A. aegypti* and *A. albopictus*, respectively, at the same time that at the concentration of 125 ppm killed 100% of the larvae of *Anopheles darlingi*, *An. triannulatus*, *An. nuneztovari* e *An. albitarsis* (LC_{50} from 48.60 to 52.60 ppm). These activities were correlated with inhibition of AChE with inhibition percentages of 83 and 88% (IC of 2.14 and 1.94 $\mu\text{g/mL}$). In addition, essential oils also demonstrated antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* with ICM from 0.5 to 125 $\mu\text{g/mL}$. The safety of essential oils was evaluated against non-target aquatic organism, *Artemia salina* with LC_{50} from 2,122.07 to 2,231.95 $\mu\text{g/mL}$. The nanoemulsions carried with the essential oils of *P. alatipetiolatum* (NEPa) and *P. purusum* (NEPp) were constituted with nanoparticles of approximately spherical morphology with average sizes of 135 and 315.6 nm, PDI from 0.044 to 0.092, pH between 4.9 to 5.7 and zeta potential from -14.40 to -8.51 mV. NEPa and NEPp at concentrations of 31.25 ppm inhibited 100% of eggs, while in the 25 ppm they killed 100% of the larvae (LC_{50} from 4.01 to 5.40 ppm) and 83 to 100% of the pupae (LC_{50} from 5.34 to 7.69 ppm) of *A. aegypti* and *A. albopictus*, respectively. Subsequently, 94 to 100% of *Anopheles* larvae died at a concentration of 25 ppm (LC_{50} from 3.87 to 9.81 ppm). The residual effect of the nanoemulsions was higher than the essential oils, with a percentage of 100 to 2% of larvae of *A. aegypti* and *A. albopictus* killed between the 1st and 10th day, respectively. These results demonstrate that the nanoemulsions carried with the essential oils of *P. alatipetiolatum* and *P. purusum* are a safe tool in the control of the populations of *Aedes* and *Anopheles*.

KEYWORDS: *Aedes*, *Anopheles*, *Piper*, essential oil, nanosystems, biological control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da dengue no mundo.	2
Figura 2. Distribuição global da febre chikungunya.	4
Figura 3. Distribuição do zika vírus nas Américas.....	5
Figura 4. Ciclo de transmissão da febre amarela silvestre e urbana.....	6
Figura 5. Distribuição da malária no mundo.	7
Figura 6. Ciclo de vida dos mosquitos da família Culicidae.	8
Figura 7. Ovos de mosquitos <i>Aedes</i>	9
Figura 8. Ovos de mosquitos <i>Anopheles</i>	9
Figura 9. Larva de <i>Aedes</i>	10
Figura 10. Larva de <i>Anopheles</i>	10
Figura 11. Anatomia da pupa de culicídeo.	11
Figura 12. Mosquitos <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	12
Figura 13. Fêmea de <i>Anopheles</i> (A) e morfologia das asas (B).	12
Figura 14. Inseticida usado no controle de insetos pragas.	14
Figura 15. Ilustração dos mecanismos envolvidos na resistência dos insetos a substâncias tóxicas. Resistência comportamental (1). Resistência da cutícula para dificultar a penetração da substância tóxica (2). Modificação do local alvo da substância tóxica (3). Resistência metabólica (4).	16
Figura 16. Frascos com óleos essenciais.	17
Figura 17. Gêneros de Piperaceae: <i>Verhuellia</i> (A). <i>Zippelia</i> (B). <i>Manekia</i> (C). <i>Piper</i> (D) e <i>Peperomia</i> (E,F).....	19
Figura 18. <i>Piper alatipetiolatum</i>	22
Figura 19. <i>Piper purusenum</i>	23
Figura 20. Sistemas biológicos em escala nanométrica.	24
Figura 21. Exemplos de nanoemulsão O/A e A/O.	24
Figura 22. Fatores indicativos de instabilidade.	25
Figura 23. Horto da Universidade Nilton Lins.	27
Figura 24. Igarapé do Tarumã-açu.	27
Figura 25. Amostras vegetais moídas.....	28
Figura 26. Extrações dos óleos essenciais.	29
Figura 27. Armazenamento dos óleos essenciais de <i>Piper alatipetiolatum</i> (OEPa) e <i>Piper purusenum</i> (OEPp).	29
Figura 28. Ilustração da determinação da escolha do melhor sistema de eluição.	30

Figura 29. Ilustração da análise por CCD dos óleos essenciais.	30
Figura 30. Visualização das placas cromatográficas (CCD) contendo os óleos essenciais.	31
Figura 31. Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas.	32
Figura 32. Phmetro (A) e refratômetro (B) utilizados nas análises.	33
Figura 33. Ovitrampra e palhetas usados nas capturas dos ovos de <i>Aedes albopictus</i> ..	33
Figura 34. Ciclo de criação e manutenção das colônias de <i>Aedes</i> spp. (A) Palhetas de Eucatex presas às armadilhas ovitampas contendo ovos de <i>Aedes</i> spp. (B) Cubas contendo larvas. (C) Recipiente contendo pupas. (D) Repasto sanguíneo.	35
Figura 35. Local das coletas de larvas e adultos de <i>Anopheles</i>	35
Figura 36. (A) Copos contendo <i>Anopheles</i> spp. realizando repasto em hamster. (B) ovos de <i>Anopheles</i> sp. (C) Cubas de criação das larvas. (D) copos de oviposição acondicionados em caixa de isopor.	36
Figura 37. Soluções estoques usados nos bioensaios seletivos.	37
Figura 38. Bioensaio seletivo contra ovos de <i>Aedes</i>	38
Figura 39. Bioensaio seletivo dos OEPa e OEPp contra imaturos de <i>Aedes</i> e <i>Anopheles</i>	39
Figura 40. Bioensaio dose-resposta dos OEPa, OEPp e β -cariofileno contra ovos de <i>Aedes</i>	40
Figura 41. Bioensaio dose-resposta dos OEPa, OEPp e β -cariofileno contra imaturos de <i>Aedes</i> e <i>Anopheles</i>	41
Figura 42. Recipiente para desenvolvimento de larvas de <i>A. salina</i>	44
Figura 43. Ilustração da síntese das nanoemulsões carregadas com óleos essenciais.	45
Figura 44. Ilustração do bioensaio ovicida das nanoemulsões contra ovos de <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i>	46
Figura 45. Ilustração dos bioensaios de dose-resposta contra larvas e pupas de <i>Aedes</i> e <i>Anopheles</i>	47
Figura 46. Certidão do cadastro no SisGen.	49
Figura 47. Comparação entre os teores de umidade de <i>P. alatipetiolatum</i> e <i>P. purusanum</i> desidratadas em temperatura ambiente de $25 \pm 2^\circ\text{C}$	49
Figura 48. Relação entre o tempo de extração e volumes dos óleos essenciais.	50
Figura 49. Comparação entre os rendimentos obtidos dos óleos essenciais extraídos das folhas de <i>P. alatipetiolatum</i> e <i>P. purusanum</i>	51

Figura 50. Placas de CCD com amostras dos óleos essenciais de <i>Piper alatifetiolatum</i> e <i>Piper purusanum</i> reveladas com diferentes reveladores: (A) vanilina sulfúrica, (B) vanilina sulfúrica, (C) Dragendorff e (D) cloreto férrico (FeCl ₃).	52
Figura 51. Cromatograma do óleo essencial de <i>Piper alatifetiolatum</i>	53
Figura 52. Cromatograma do óleo essencial de <i>Piper purusanum</i>	55
Figura 53. Atividade dos OEPA e OEPp e β -cariofileno contra ovos de <i>A. aegypti</i>	59
Figura 54. Atividade dos OEPA e OEPp e β -cariofileno contra ovos de <i>A. albopictus</i>	59
Figura 55. Ovos de <i>Aedes</i> tratados com os óleos essenciais de <i>P. alatifetiolatum</i> (A), <i>P. purusanum</i> (B), β -cariofileno (C) e DMSO (D). Círculos aos redores dos opérculos. ..	60
Figura 56. Ovos de <i>Aedes</i> recobertos com córion (A). Micrópila (MIC), duto usado pelos espermatozoides para fecundação (B).	61
Figura 57. Percentuais de larvas de <i>A. aegypti</i> mortas após tratamento com os óleos essenciais de <i>P. alatifetiolatum</i> e <i>P. purusanum</i> e β -cariofileno.	62
Figura 58. Percentuais de larvas de <i>A. albopictus</i> mortas após tratamento com os óleos essenciais de <i>P. alatifetiolatum</i> e <i>P. purusanum</i> e β -cariofileno.	62
Figura 59. Alterações observadas nas larvas após exposição aos óleos essenciais das piperáceas (A) e β -cariofileno (B). Escurecimento da cabeça (1), tórax (2), abdômen (3), cerdas (4), escurecimento e ondulação do sifão respiratório (5), Escurecimento do seguimento (6) e papilas anais (7). Larvas (C e D) tratadas com DMSO.	65
Figura 60. Percentuais de pupas de <i>A. aegypti</i> mortas após tratamento com os óleos essenciais de <i>P. alatifetiolatum</i> e <i>P. purusanum</i> e β -cariofileno.	66
Figura 61. Percentuais de pupas de <i>A. albopictus</i> mortas após tratamento com os óleos essenciais de <i>P. alatifetiolatum</i> e <i>P. purusanum</i> e β -cariofileno.	67
Figura 62. Pupas de <i>Aedes</i> tratadas com o OE de <i>P. purusanum</i> (A), β -cariofileno (B), temefós (C) e DMSO (D). Tórax (1), cabeça (2), palpos, (5) asas, tarços (4) e abdômen ficaram presos na exúvia (6). A linha vermelha ilustra o limite entre os meios aquático e terrestre, pois as pupas permaneceram horizontalmente na linha da água para que os adultos possam deixar as exúvias para o meio terrestre.	68
Figura 63. Larvas do gênero <i>Anopheles</i> tratadas com os OEs de <i>P. alatifetiolatum</i> (A), <i>P. purusanum</i> (B) e β -cariofileno (C) comparadas ao DMSO (D, E, F).	72
Figura 64. Percentuais das atividades dos óleos essenciais de <i>P. alatifetiolatum</i> (OEPA) e <i>P. purusanum</i> (OEPp) na inibição da acetilcolinesterase.	73
Figura 65. Percentuais de toxicidades dos óleos essenciais de <i>P. alatifetiolatum</i> (OEPA) e <i>P. purusanum</i> (OEPp) contra <i>A. salina</i>	75

Figura 66. A - Placa da CIM; B - placa da contra-prova confirmando a ausência de crescimento bacteriano até a concentração 0,125 mg/mL de amostra do OEPp. 17a - poço A; 17b - poço B, 17c - poço C, 17d - poço D.....	77
Figura 67. Placa da CIM; B - placa da contra-prova confirmando a ausência de crescimento bacteriano; 17 - OEPp; 18- OEPa; a - poço A; b - poço B, c – poço.	78
Figura 68. Nanoemulsões desenvolvidas com Tween 20 (OEPa – 20 e OEPp – 20) e nanoemulsões desenvolvidas com Tween 80 (OEPa – 80 e OEPp – 80).....	79
Figura 69. Imagens dos tamanhos médios das partículas e potencial Zeta das nanoemulsões carregadas com OE de <i>P. purusanum</i> (A, B) e OE de <i>P. alatipetiolatum</i> (C, D) sintetizadas com Tween 80.....	80
Figura 70. Imagens dos tamanhos médios das partículas e potencial Zeta das nanoemulsões carregadas com OE de <i>P. alatipetiolatum</i> (A,B) e OE de <i>P. purusanum</i> (C,D) sintetizadas com Tween 20.....	81
Figura 71. Imagens das nanoemulsões carregadas com o OE de <i>P. alatipetiolatum</i> (A) e <i>P. purusanum</i> (B) obtidas pelo método de AFM.....	81
Figura 72. Percentuais das atividades ovicidas das nanoemulsões carregadas com óleos essenciais de <i>P. alatipetiolatum</i> (NEPa) e <i>P. purusanum</i> (NEPp) avaliadas contra ovos de <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i>	82
Figura 73. Ovos do gênero <i>Aedes</i> tratados com as NEPa (A), OEPp (B) e temefós (C). Os círculos aos redores dos opérculos indicando que houve eclosão dos ovos tratado com controle negativo: NEBr (D).	83
Figura 74. Percentuais da atividade larvicida das nanoemulsões carregadas com os OEs e <i>P. alatipetiolatum</i> (NEPa) e <i>P. purusanum</i> (NEPp) contra larvas de <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i>	84
Figura 75. Percentuais da atividade de NEPa e NEPp avaliadas contra pupas de <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i>	85
Figura 76. Resultado do efeito residual dos OEs e nanoemulsões avaliados contra larvas de <i>A. aegypti</i>	89
Figura 77. Resultado do efeito residual dos OEs e nanoemulsões avaliados contra larvas de <i>A. albopictus</i>	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Delineamento diluições das concentrações dos óleos essenciais.....	43
Tabela 2. Características físico-química dos óleos essenciais.....	51
Tabela 3. Substâncias identificadas no óleo essencial de <i>Piper alatipetiolatum</i>	54
Tabela 4. Substâncias identificadas no óleo essencial de <i>Piper purusanum</i>	56
Tabela 5. Percentuais das inibições dos ovos de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> tratados com óleos essenciais.....	57
Tabela 6. Percentuais de mortes das larvas de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> tratadas os OEPa e OEPp.	58
Tabela 7. Percentuais de mortes das pupas de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> tratadas os OEPa e OEPp.	58
Tabela 8. Comparação entre as concentrações letais (CL) dos óleos essenciais contra larvas de <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i>	63
Tabela 9. Comparações entre as concentrações letais dos óleos essenciais contra pupas de <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i>	67
Tabela 10. Resultados dos bioensaios de OEPa e OEPp contra larvas do gênero <i>Anopheles</i>	69
Tabela 11. Resultados da atividade de OEPa, OEPp e β -cariofileno contra larvas do gênero <i>Anopheles</i>	70
Tabela 12. Comparação entre as concentrações letais dos óleos essenciais e β -cariofileno contra larvas de 3º ínstar do gênero <i>Anopheles</i>	72
Tabela 13. Resultado da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de <i>P. alatipetiolatum</i> e <i>P. purusanum</i>	76
Tabela 14. Comparação das concentrações letais das nanoemulsões para matar 50 e 90% das larvas do gênero <i>Aedes</i>	84
Tabela 15. Comparação das concentrações letais das nanoemulsões para matar 50 e 90% das pupas do gênero <i>Aedes</i>	86
Tabela 16. Percentuais de atividade larvicida registra do bioensaios do NEPa, NEPp e temefós contra larvas do gênero <i>Anopheles</i>	87
Tabela 17. Comparação entre as concentrações letais do OEPa, OEPp e temefós contra larvas de 3º ínstar de <i>Anopheles</i>	88

LISTA DE SIGLAS

DENV	vírus da dengue
WHO	World Health Organization
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
ECDC	European Center for Disease Prevention and Control
ZIKV	Zika vírus
CPqAM	Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
L1 ao L4	Estágio de desenvolvimento da larva
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
BHC	Exaclorobenzeno
<i>Kd</i>	Knockdown
<i>Kdr</i>	Resistência ao Knockdown
GST	glutathione S-transferases
P450	oxidases multifuncionais
CDCP	Centers for Disease Control and Prevention
SiBBR	Sistema de Informações sobre a Biodiversidade Brasileira
nm	Nano
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
O/A	Óleo e água
A/O	Água e óleo
rpm	Rotação por minuto
DMSO	Dimetilsulfóxido
LTQPN	Laboratório Temático Químico de Produtos Naturais
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
OEs	Óleos essenciais
OEPa	Óleo essencial de <i>P. alatipetiolatum</i>
OEPp	Óleo essencial de <i>P. purusanum</i>
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio anidro
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
UV	Luz Ultravioleta
TLC	Thin-Layer Chromatography
R _f	Fator de retenção
CG/MS	Cromatografia Gasosa acoplado a Espectro de Massas
NIST	National Institute of Standards and Technology
IR _K	Índice de retenção de Kovatz
LMD	Laboratório de Malária e Dengue
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
FVS	Fundação de Vigilância em Saúde
spp	Abreviatura científica para espécie
AChE	Acetilcolinesterase
DTNB	5,5'-dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico)
LABMICRA	Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia
CCCD	Cepas da Coleção Cefar Diagnóstica

CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CIM	Concentração Inibitória Mínima
NaOH	Hidróxido de sódio
NEPa	Nanoemulsão carregadas com óleo essencial de <i>P. alatipetiolatum</i>
NEPp	Nanoemulsão carregadas com óleo essencial de <i>P. purusanum</i>
NEBr	Nanoemulsão branca (sem óleo essencial)
mV	MiliVolts
ANOVA	Análise de Variância
CL	Concentração Letal
CL ₅₀	Concentração Letal de 50%
CL ₉₀	Concentração Letal de 90%
HUAM	Herbário da Universidade Federal do Amazonas
SisGen	Sistema Nacional de Patrimônio Genético e Gestão do Conhecimento Tradicional Associado
FeCl ₃	Cloreto férrico
<i>F</i>	Fischer
r ²	Regressão linear

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doenças transmitidas por mosquitos dos gêneros <i>Aedes</i> e <i>Anopheles</i>	1
1.1.2. Dengue	1
1.1.3. Febre Chikungunya	3
1.1.4. Zika	4
1.1.5. Febre amarela urbana	5
1.1.6. Malária	6
1.2. Família Culicidae: mosquitos vetores de doenças	7
1.2.1. Os ovos	8
1.2.2. Fase larval	9
1.2.3. Pupa	10
1.2.4. Adultos	11
1.3. Resistências dos mosquitos aos inseticidas sintéticos	13
1.4. Óleo essencial: uma alternativa no controle dos insetos vetores	16
1.5. Família Piperaceae	18
1.5.1. Gênero <i>Piper</i> e suas atividades contra insetos	19
1.5.2. <i>Piper alatipetiolatum</i> Yunck., 1966	21
1.5.3. <i>Piper purusanum</i> Yunck., 1966	22
1.6. Nanosistemas: veículos carregados de óleos essenciais	23
2. OBJETIVO	26
2.1. Geral	26
2.2. Específicos	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Coletas das espécies vegetais	27
3.1.1. Determinação do teor de umidade	28
3.2. Coleta dos mosquitos vetores de arboviroses e protozoários	33
3.2.1. Área de coleta dos ovos de <i>Aedes albopictus</i>	33
3.2.2. Manutenção das colônias dos vetores da dengue em laboratório	33
3.2.3. Área de coleta dos imaturos de <i>Anopheles</i>	35
3.2.4. Manutenção da colônia dos vetores da malária em laboratório	36
3.2.5. Identificação das atividades dos óleos essenciais	37

3.2.6. Bioensaio ovicida seletivo dos óleos essenciais	37
3.2.7. Bioensaio larvicida e pupicida seletivo dos óleos essenciais.....	38
3.2.8. Bioensaio ovicida de dose-resposta dos óleos essenciais e β -cariofileno	39
3.2.9. Bioensaio de dose-resposta dos óleos essenciais e β -cariofileno.....	40
3.3. Atividade dos óleos essenciais na inibição da acetilcolinesterase	41
3.4. Ensaios antimicrobianos	42
3.4.1 Reativação das cepas	42
3.4.2. Preparo das amostras	42
3.4.3. Determinação da atividade antimicrobiana	42
3.5. Toxicidade dos óleos essenciais e β -cariofileno contra <i>Artemia salina</i>	43
3.6. Sínteses das nanoemulsões carregadas com óleos essenciais	45
3.6.1. Determinação de tamanho de partícula e índice de polidispersão	45
3.6.2. Morfologia das nanoemulsões.....	46
3.6.3. Atividade ovicida das nanoemulsões	46
3.6.4. Atividade larvicida e pupicida das nanoemulsões	46
3.6.5. Avaliação do efeito residual	47
3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1. Material vegetal do gênero <i>Piper</i>	48
4.1.2. Teor de umidade e extração dos óleos essenciais	49
4.1.3. Perfis químicos dos óleos essenciais	51
4.1.4. Constituintes químicos do óleo essencial de <i>Piper alatipetiolatum</i>	52
4.1.5. Constituintes químicos do óleo essencial de <i>Piper purusanum</i>	55
4.2. Estudo dos vetores <i>Aedes</i> e <i>Anopheles</i>	57
4.2.2. Resultados seletivos dos óleos essenciais contra ovos do gênero <i>Aedes</i>	57
4.2.3. Resultados seletivos dos óleos essenciais contra larvas e pupas do gênero <i>Aedes</i>	57
4.2.4. Resultados de dose-resposta dos óleos essenciais e β -cariofileno contra ovos do gênero <i>Aedes</i>	58
4.2.5. Resultados dose-resposta dos óleos essenciais e β -cariofileno contra larvas do gênero <i>Aedes</i>	62
4.2.6. Resultados dose-resposta dos óleos essenciais e β -cariofileno contra pupas do gênero <i>Aedes</i>	66
4.2.7. Resultados seletivos dos óleos essenciais contra larvas do gênero <i>Anopheles</i>	68

4.2.8. Resultados de dose-resposta dos óleos essenciais e β -cariofileno contra larvas do gênero <i>Anopheles</i>	69
4.2.9. Atividade inibidora dos óleos essenciais contra AChE	73
4.2.10. Resultado da toxicidade dos óleos essenciais contra organismo não-alvo ...	74
4.2.11. Resultados da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.....	76
4.3. Resultados das sínteses e caracterização das nanoemulsões.....	78
4.3.2. Atividade ovicida das nanoemulsões contra ovos do gênero <i>Aedes</i>	81
4.3.3. Atividade larvicida das nanoemulsões contra larvas do gênero <i>Aedes</i>	83
4.3.3. Atividade larvicida das nanoemulsões contra pupas de <i>Aedes</i>	84
4.3.4. Resultados dos bioensaios das nanoemulsões contra <i>Anopheles</i>	86
4.3.5. Avaliação do efeito residual	88
5. CONCLUSÕES	91
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

ANEXOS

Deposito de patente

RMN ^{13}C do óleo essencial de *P. alatipetiolatum* (OEPa)

Artigo - Nanoemulsion loaded with essential oil from *Piper alatipetiolatum* (Piperaceae) as an-alternative agent in the control of *Aedes aegypti*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças transmitidas por mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Anopheles*

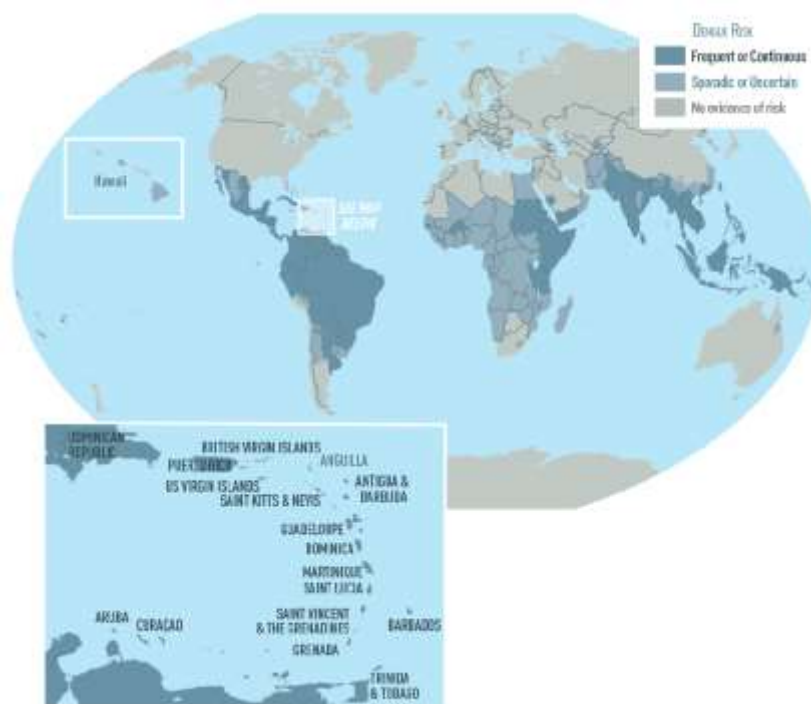
As distribuições geográficas de mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Anopheles* ao redor do mundo ocorrem em decorrência de diversos fatores como as condições antrópicas, mudanças ambientais, urbanização desordenada, além do transporte de mercadorias entre diversos países caracterizado como principal fator de distribuição dos ovos mosquitos (Ebi & Nealon, 2016). Em consequência desses fatores, diversas doenças como a dengue, chikungunya, zika ou malária disseminadas por esses mosquitos são registradas em mais de 100 países, principalmente nos localizados no hemisfério sul (Perdomo-Celis et al., 2017).

1.1.2. Dengue

A dengue é uma doença transmitida pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), é causada pelo agente etiológico do gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae*. A doença inclui os tipos imunológicos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Munusamy et al., 2016). A patologia está intimamente relacionada à má gestão de políticas pública no controle desses vetores associadas às condições precárias de saneamento básico (de Castro et al., 2013). A enfermidade é classificada em duas formas: a primeira é denominada de dengue clássica causada pelos tipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, as quais causam sintomas como febre, dores de cabeça, dores atrás dos olhos, manchas vermelhas no corpo, dores nas articulações e vômitos (Dechtawewat et al., 2016). A forma grave da doença é conhecida como choque do dengue com ou sem hemorragia, caracterizada por causar dificuldades respiratórias, sangramentos nas gengivas e nasais, dores abdominais severas, vazamento do fluído plasmático que pode causar o óbito em 48 h (OPAS, 2019).

A partir da década de 80, epidemias de dengue foram registradas em diversos continentes (Figura 1), principalmente no Americano atingindo diversos países como Bolívia, Paraguai, Equador, Peru, Cuba, México, Honduras, Venezuela e Brasil (OPAS, 2019). Na epidemia ocorrida em Cuba no ano de 1981, foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-2 (Oliveira et al., 2013). No Brasil, a primeira epidemia de dengue documentada clínica e laboratorialmente ocorreu em 1982 no município de Boa Vista (RR), onde foram identificadas as circulações dos sorotipos DENV-1 e DENV-4 (OPAS, 2019).

Figura 1. Distribuição da dengue no mundo.



Fonte: www.cdc.gov, (2019).

Os primeiros registros de casos de dengue na Índia são datados dos anos 60, o país é conhecido por enfrentar grandes problemas de saneamento básico e infraestrutura, o que entre outros fatores, contribuiu para o estabelecimento da dengue e de outras doenças como zika e malária (Nyamoita et al., 2013). Decorrente dos problemas que o país enfrenta em controlar os vetores, no ano de 2015 foram registrados mais de 12.000 casos de dengue, sendo considerado o pior surto da doença no país, fator que também ocorreu no Brasil naquele ano (Mathalaimuthu et al., 2017).

Em 2010 houve rápida disseminação mundial da doença, havendo aumento das notificações da doença nos países da América Latina, Colômbia, Honduras, México, Porto Rico e Venezuela, que somados os casos passam de 1.663.000 (Carvalho et al., 2017). Países da Ásia e Pacífico Ocidental registraram juntos mais de 1 milhão de casos, enquanto diversos países da Europa reportavam à WHO diversas epidemias da doença (OPAS, 2019). Em 2016, houve um aumento dos casos da dengue no Brasil, porém, em 2018, ocorreu queda significativa dos casos. Entretanto, até março de 2019 foram registrados 222.064 (Ministério da Saúde, 2020). No entanto, até a semana epidemiológica 21 de 2020, já foram registrados mais de 778.400 casos prováveis da dengue no país (Ministério da Saúde, 2020).

O principal método de controlar e prevenir a doença é evitar que os criadouros naturais e artificiais dos mosquitos acumulem água, além da aplicação de produtos inseticidas para matar as larvas e os adultos do *A. aegypti* e *A. albopictus*. Ademais, a ANVISA reconheceu que a droga Dengvaxia® é a única vacina reconhecida em todo o mundo com segurança e eficácia na prevenção da quatro sorotipos da dengue a longo prazo (Ministério da Saúde, 2016).

1.1.3. Febre Chikungunya

A Febre chikungunya também é transmitida pelos mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus*, entretanto, o vírus pertence à família *Togoviridae*, gênero *Alphavirus*, sendo isolado pela primeira vez entre os anos de 1952 e 1953 após uma série de surtos ocorridos em Rondo, Mawia e Makonde, que hoje são conhecidas como Tanzânia (Thiberville et al., 2013; McSweeney et al., 2015). Em 1963, ocorreu o primeiro surto da doença na província de Kolkata localizada na Índia (Nyari et al., 2016), enquanto outro estudo relata que o registro do surto ocorreu em 1824 (Razmy, 2014).

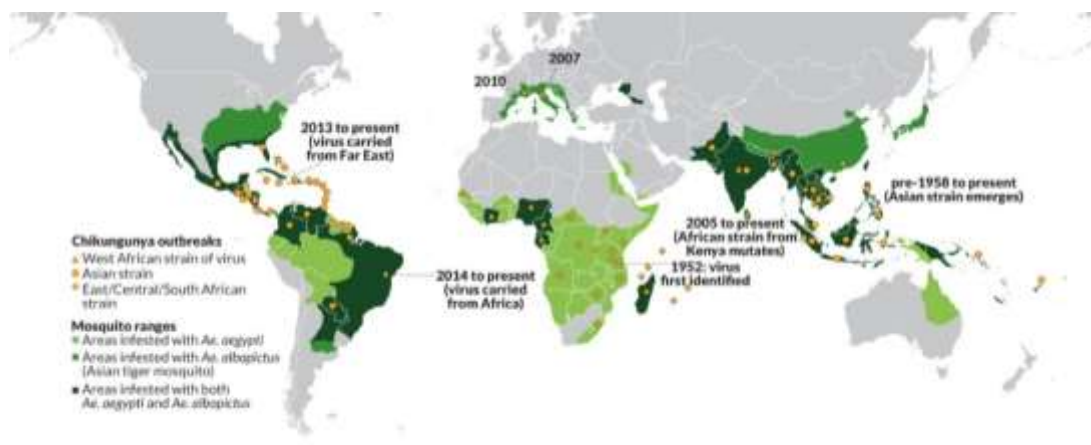
A doença apresenta os sintomas similares aos da dengue, contudo, não dispõe de vacina, o tratamento é concentrado no alívio da artralgia que afeta na maioria dos casos os membros inferiores causando dores intensas nos joelhos com grande capacidade debilitante, fazendo com que as pessoas andem curvadas, devido a isso, a doença recebeu o nome de chikungunya que no dialeto Makonde significa “a pessoa que anda curvado” (Honório et al., 2015). Esses sintomas podem persistir por até um ano após o desaparecimento da doença (Lo Presti et al., 2016).

A enfermidade apresenta maior risco para os recém-nascidos devido as desordens neurológicas como encefalopatias. Ademais, em idosos com saúde debilitada, ocorrem dores abdominais, mialgia, miocardites, conjuntivite, desordens hepáticas e dependendo da gravidade da doença, ocorrerem hemorragias que podem causar a morte (McSweeney et al., 2015).

A patologia teve uma rápida expansão pela África, Ásia e na Europa onde os primeiros surtos registrados ocorreram em 2006 (Figura 2) (Tomasello & Schlagenhauf, 2013). Somente no Sri Lanka, nos anos de 2006 e 2007, os registros da doença passaram de 100 mil, enquanto nesse período a doença foi registrada na ilha de Madagascar, Mayotte e Mauritius, passando a ser endêmica nessas e outras regiões (Razmy, 2014). Em 2013, a doença foi identificada nas Américas, atingindo os EUA, Canadá, Guiana Francesa, Ilhas

do Caribe e em 2014, foram registrados no Brasil 2.772 casos da doença, enquanto que em 2016, foram notificados 39.017 casos (Ministério da Saúde, 2020). Em 2018, o país notificou à OMS, 26.840 casos, em contra partida, em 2019 houveram 15.352 registros (Epidemiol, 2019). Porém, até a semana epidemiológica 21 de 2020, foram notificados 34.751 casos prováveis da doença em todo o país (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2020).

Figura 2. Distribuição global da febre chikungunya.



Fonte: WHO, (2019).

1.1.4. Zika

A zika também é transmitida pelos mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus*, e causada pelo vírus do gênero *Flavivirus* (Govindarajan et al., 2016; de Souza et al., 2019). A doença desencadeia erupção cutânea, conjuntivite não purulentas, edemas nas ponta dos dedos, olhos vermelhos, sensibilidade a luz, aftas, coceira, leucopenia e (Ioos et al., 2014).

O vírus da zika foi identificado pela primeira vez em macacos capturados na floresta zika, localizada na República da Uganda, no ano de 1947, em 1952 foi identificado em sangue humano dos residentes das florestas da Uganda e Tanzânia (WHO, 2020). Entre 1960 a 1980 foram reportados à OMS casos da doença em diversos países das Américas (Figura 3), Ásia e África, além da Micronésia, seguido pelos registros ocorridos na Polinésia Francesa ocorrido em 2013 (ECDC, 2014; WHO, 2020). No início de 2015, foram identificados os primeiros registros do zika vírus (ZIKV) em pacientes residentes da cidade de Natal, RN, Brasil (Musso et al., 2015; Zanluca et al., 2015).

Figura 3. Distribuição do zika vírus nas Américas.



Fonte: redegue.fiocruz.br, (2019).

Em comparação com as doenças já citadas, a zika apresenta risco elevado por desencadear complicações neurológicas como a Síndrome de Guillain-Barré e microcefalia congênita, além de outras desordens neurológicas (Coelho et al., 2017; Govindarajan et al., 2018). A Síndrome de Guillain-Barré é uma patologia caracterizada pelo ataque do sistema imunológico ao sistema nervoso, causando paralisia parcial ou total do sistema nervoso, desencadeando o colapso dos músculos envolvidos nas funções respiratórias, resultando no óbito (OPAS, 2019ab, 2020).

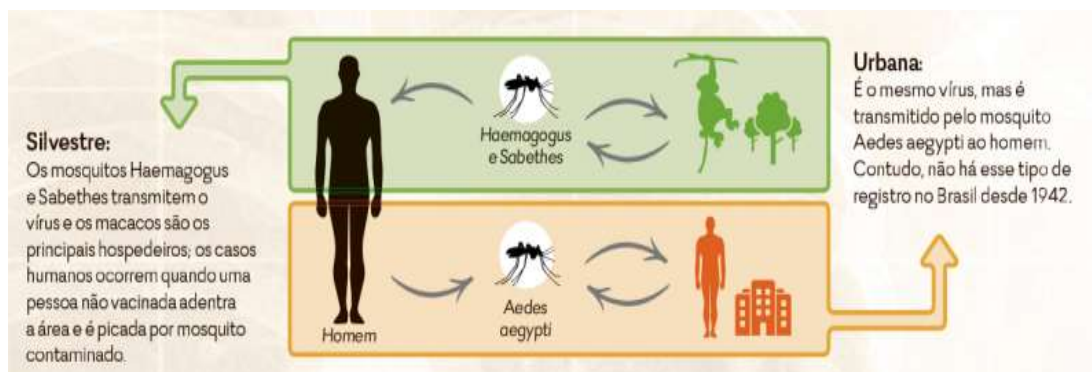
A microcefalia congênita é uma enfermidade caracterizada pela redução do tamanho médio da cabeça da criança, podendo ser identificada previamente no período da gestação (OPAS, 2019b). No Brasil, entre os anos de 2010 a 2014 foram notificados mais de 800 casos de doença, com 10 óbitos, ao passo que em que entre 2015 e 2019, os casos passaram de 4 mil, havendo 50 óbitos (Vigilância, 2015; Epidemiol, 2019).

1.1.5. Febre amarela urbana

A febre amarela urbana é desencadeada por vírus da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus* que no meio rural é transmitida por mosquitos do gênero *Haemagogus* e *Sabethes* por apresentarem hábitos silvestres, enquanto na zona urbana e periurbana, a doença é disseminada pelo mosquito *A. aegypti* (figura 4) (Barreto et al., 2007). A doença possui grande prevalência em países da América Central e América do Sul, além da África

que anualmente é responsável por aproximadamente 90% dos casos reportados à OMS (Kovendan et al., 2012; Masaninga et al., 2014).

Figura 4. Ciclo de transmissão da febre amarela silvestre e urbana.



Fonte: rededengue.fiocruz.br, (2019).

A WHO estima que aproximadamente ocorram 200 mil casos de febre amarela no mundo e cerca de 30 mil mortes ocorram anualmente, sendo relacionadas entre outros fatores, à competência vetorial, hospedeiros primatas que são reservatórios do agente etiológico e mudanças climáticas (Tretyakova et al., 2014). Nos países africanos a taxa de mortalidade é de 70%. A doença causa lesões renais, cardíaca e hepática, vômitos com coloração preta, hemorragias, febre, além de pele amarelada (Thomas et al., 2013).

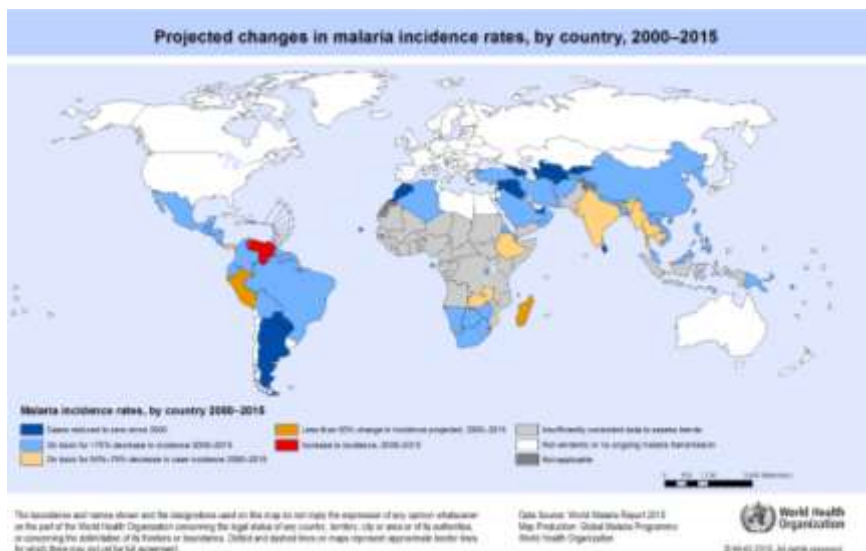
O tratamento dos sintomas da febre amarela é similar aos da dengue, chikungunya e zika (Patil et al., 2010). Porém, diferentemente dessas doenças, a febre amarela pode ser prevenida com uma vacina com poder de recuperação de 99%, no entanto, 1% das pessoas podem apresentar efeitos colaterais à vacina como febre, dor de cabeça, dores musculares ou hipersensibilidade devido as reações alérgicas à proteína do ovo contida na vacina (Thomas et al., 2013; Devi & Bora, 2017). O aprimoramento da vacina foi realizado pelo Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM) / Fundação Oswaldo Cruz de Pernambuco (FIOCRUZ, 2017).

1.1.6. Malária

A malária é uma das mais importantes doenças febris infecciosas causada por agentes etiológicos do gênero *Plasmodium* transmitidos por mosquitos do gênero *Anopheles* nas regiões periurbanas em países neotropicais (Figura 5) (MS, 2020ab). A doença é caracterizada por causar sudorese, dores de cabeça, tremores, calafrios, febre alta, vômitos, náuseas, falta de apetite e cansaço (Coelho et al., 2017).

Em 2017, os países africanos registraram cerca de 200 milhões de pessoas infectadas pela doença, correspondendo a 80% dos casos registrados em todo o mundo. Naquela região a doença é disseminada pelo mosquito *Anopheles gambiae* e causada em 99,7% dos casos pelo *P. falciparum* (Nyamoita et al., 2013).

Figura 5. Distribuição da malária no mundo.



Fonte: WHO, (2020).

Na região Amazônica, localizada na América do Sul, a doença é disseminada principalmente pelo mosquito *Anopheles darlingi* e é causada pelos agentes etiológicos *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium Vivax* (Tadei et al., 1998; Hernández-morales et al., 2015; MS, 2020ab). Em 2017, foram registrados 174.522 casos da doença nessa região, que é caracterizada pela constante derrubada da floresta para implementação do comércio de mineração, agricultura, agropecuária, além das condições de vulnerabilidade e pobreza dos habitantes daquela região (OPAS, 2020b).

No Brasil, nos anos de 2018 e 2019 foram registrados 225.389 casos reportados à OMS, sendo 99% dos casos registrados nos estados do Amazonas, Acre, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins (Villarreal-treviño et al., 2015; Ministério da Saúde, 2020abc).

1.2. Família Culicidae: mosquitos vetores de doenças

Os mosquitos estão agrupados em Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Diptera, Subordem Nematocera, Família Culicidae (Consoli & Lourenço-de- Oliveira, 1994). Na

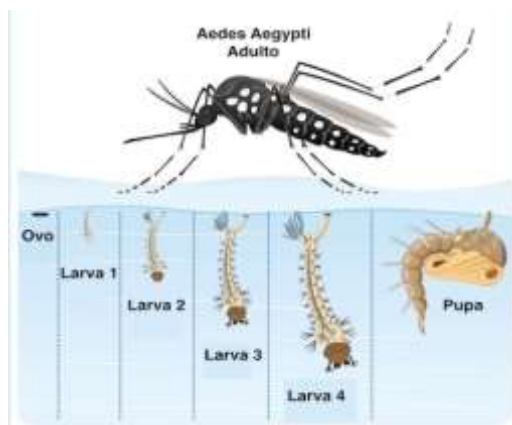
família Culicidae encontram-se três subfamílias: Toxorhynchitinae, Anophelinae e Culicinae (Aciole, 2009).

A subfamília Toxorhynchitinae agrupa os mosquitos que não são hematófagos (Reegan et al., 2014; Pingen et al., 2017). A subfamília Anophelinae é composta pelos gêneros *Bironella*, *Chagasia* e *Anopheles* cujos mosquitos são transmissores de várias doenças entre elas a malária (Ding et al., 2018; Govindarajan et al., 2018).

Na subfamília Culicinae são encontrados aproximadamente 34 gêneros entre eles o *Culex*, *Aedes* e *Mansonia* (Ebi et al., 2016). É nessa subfamília que os vetores são responsáveis pela transmissão de muitas doenças como a dengue, zika, chikungunya, febre amarela urbana, filariose ou elefantíase e febre do vale do Rio Rift, no qual muitas dessas doenças têm em comum os mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus* (Gokulakrishnan et al., 2013; Etchepare et al., 2015).

Esses mosquitos apresentam desenvolvimento holometábolo, o que significa que o ciclo de vida é constituído das fases de ovo, larva pupa e adulto, que ocorrem em ambiente aquático e posteriormente terrestre (Figura 6) (Cuntuára, 2012; Vasantha-Srinivan et al. 2017).

Figura 6. Ciclo de vida dos mosquitos da família Culicidae.



Fonte: educaedes.federalcubatao.com.br, (2018).

1.2.1. Os ovos

As fêmeas do gênero *Aedes* depositam os ovos na parede de qualquer substrato que acumule água, centímetros acima da superfície da água. Os ovos têm formato elíptico, possuem a cor branca no ato da oviposição, mas em curto tempo adquirem a cor preta (Figura 7). O córion que recobre os ovos é resistente à dessecação, permitindo que ovos se mantenham viáveis na ausência de água por até 450 dias. Essa condição permite que os

ovos sejam transportados por grandes distâncias, povoando ou superpovoando diversos países (Beserra et al. 2009; Lucena et al. 2011; Junior et al. 2013).

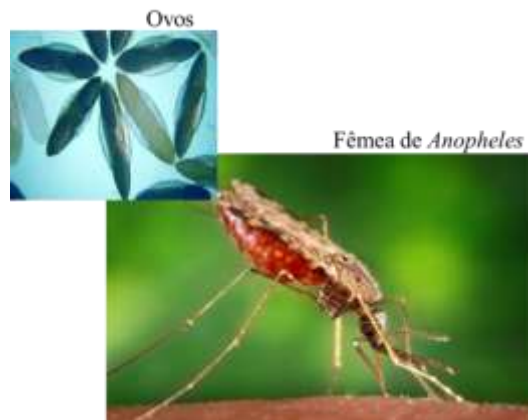
Figura 7. Ovos de mosquitos *Aedes*.



Fonte: Reseach, (2020) e adaptado por Oliveira, A.C (2020).

Os ovos (Figura 8) dos anofelinos são depositados diretamente em poças, lagos ou igarapés (Vieira et a. 2012; Sánches et al. 2014). O tempo para eclosão varia entre 2 a 4 dias sob temperatura de 30°C, dando origem as larvas (Júnior et al. 2012; Lima, 2015).

Figura 8. Ovos de mosquitos *Anopheles*.



Fonte: Epidemiol, (2020) e adaptador por Oliveira, A.C (2020).

1.2.2. Fase larval

As larvas possuem o corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen, apresentam tamanhos distintos denominadas de L1, L2, L3 e L4 que correspondem ao estágio de desenvolvimento (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). Nas larvas do gênero *Aedes*, o oitavo seguimento abriga o ânus e o sifão respiratório (figura 9), estrutura utilizada para realizar as trocas gasosas. As larvas consomem a maior parte da vida alimentando-se de

matéria orgânica presente na água. O aparelho bucal é do tipo raspador. Ao atingir o tamanho de L4, ocorre a metamorfose dando origem a pupa (Gouvêa et al., 2017).

Figura 9. Larva de *Aedes*.



Fonte: Epidemiol, (2019).

As larvas de *Anopheles* (Figura 10) não possuem sifão respiratório, entretanto, obtêm oxigênio por meio espiráculos respiratórios ao longo do abdômen, motivo pela qual permanecem horizontalmente na superfície da água para respirar. A cabeça é bem desenvolvida possuindo escovas bucais usadas para alimentar-se de matéria orgânica presente na água, como algas ou bactérias, são fotossensíveis, a temperatura da água acelera o desenvolvimento das larvas (World Health Organization, 2015).

Figura 10. Larva de *Anopheles*.



Fonte: Epidemiol, (2019).

1.2.3. Pupa

As pupas (Figura 11) têm o corpo dividido em dois segmentos: cefalotórax e abdômen. Nessa fase, não se alimentam, a respiração é realizada por meio de estruturas denominadas de trompetas respiratórias (WHO, 2018). Após um ou dois dias, passam a apresentar coloração escura, possibilitando visualizar a anatomia do mosquito, indicando

o final da fase aquática do animal, logo, ocorre a emergência do mosquito por meio de uma abertura no cefalotórax da pupa (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Figura 11. Anatomia da pupa de culicídeo.

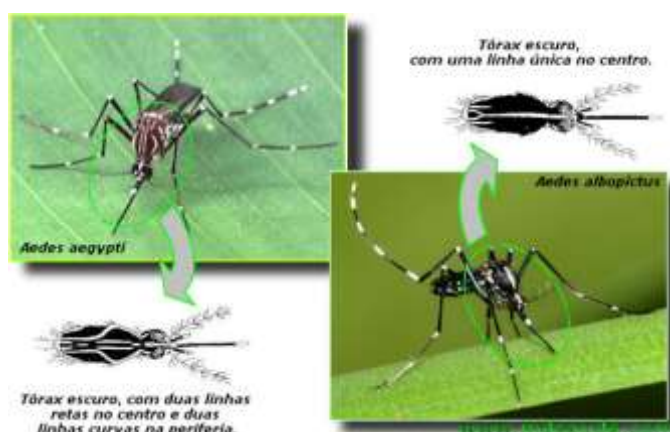


Fonte: Pancarahmat, (2020).

1.2.4. Adultos

Os mosquitos possuem o corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen. O adulto da espécie *A. aegypti* é facilmente reconhecida por apresentar duas faixas longitudinais no tórax, enquanto o *A. albopictus* apresenta apenas uma (Figura 12) (Razmy, 2014). O *A. aegypti* possui hábitos principalmente urbano, depositando os ovos dentro ou no entorno das casas, é um animal furtivo, possui preferência pelo sangue humano, sendo o principal vetor da dengue no mundo. Enquanto o *A. albopictus* possui hábitos silvestres, sendo encontrado em zonas rurais, fragmentos de florestas ou próximo as áreas urbanas, é um mosquito oportunista pois não faz preferência pelo sangue humano, de animais domésticos ou silvestres, é considerado vetor secundário da dengue (Gokulakrishnan et al., 2013; Thiberville et al., 2013).

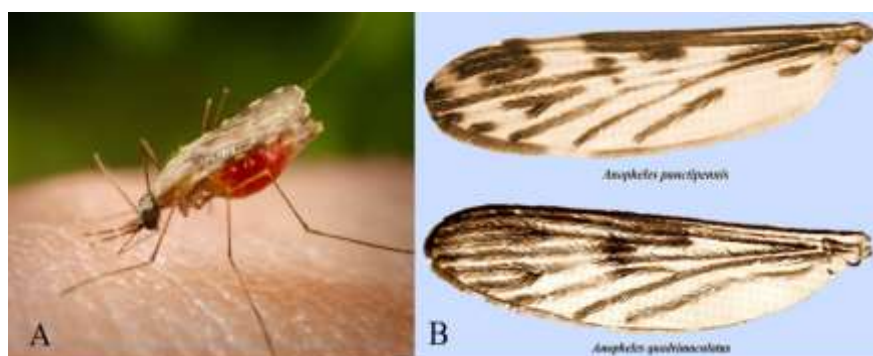
Figura 12. Mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.



Fonte: Universidade da Florida, (1999).

Nos anofelinos, as principais características morfológicas que ajudam na identificação dos mosquitos encontram-se nas asas, patas, palpos e tórax (Figura 13) (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). Esses mosquitos possuem hábitos silvestres, além disso, apresentam especificidade em relação ao tipo de água para a postura dos ovos e desenvolvimento das lavas, algumas espécies como o *An. darlingi* preferem águas não poluídas, sombreadas, sem correnteza, enquanto a espécie *An. aquasali* tem preferência por corpos d'água salobra (Epidemiol, 2019).

Figura 13. Fêmea de *Anopheles* (A) e morfologia das asas (B).



Fonte: Mosquito-kris, (2020).

Após atingirem a fase adulta, os mosquitos já estão aptos a realizarem a copula e posteriormente à hematofagia para adquirir todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento dos ovos (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). Durante a hematofagia, as fêmeas liberam por intermédio da saliva, substâncias anticoagulantes e analgésicas no local da picada, permitindo que os mosquitos não sejam percebidos, permitindo-lhes ingerir mais sangue (Dias et al., 2010). Além disso, se a pessoa está

infectada com a dengue ou malária, respectivamente os mosquitos *Aedes* e *Anopheles* tornam-se transmissores das doenças durante toda a vida (Ebi et al. 2016).

Após o ser humano ser infectado, o vírus da dengue adentra nas células dos pulmões, fígado ou linfóides, então o organismo humano inicia o processo de defesa produzindo anticorpos, causando efeitos inflamatórios, além de febre, dores de cabeça, nas órbitas, dores musculares, em casos graves pode ocorrer o surgimento de sangramentos (Ali, et al. 2012). Na infecção pelo *Plasmodium*, o protozoário afeta o fígado e glóbulos vermelhos, causando insuficiência hepática, podendo levar ao óbito (WHO, 2018).

1.3. Resistências dos mosquitos aos inseticidas sintéticos

De acordo com Krishnappa et al (2012), inseticidas são substâncias que independentemente da sua origem, possuem a capacidade de interromper o ciclo de vida do inseto, podendo atuar como ovicida, larvicida, pupicida ou adulticida.

Na década de 1950, o inseticida sintético diclorodifeniltricloroetano DDT (Figura 14) foi a primeira ferramenta introduzido na agricultura no controle de insetos pragas que causavam destruição das plantações, evitando a proliferação de doenças, o que consequentemente não exigia a atenção dos programas de controle de vetores devido alta eficiência no uso do DDT (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Melo-Santos et al. 2010; Govindarajan et al. 2016). Porém, após décadas de uso do DDT no controle desses insetos pragas e também no controle dos mosquitos, houve o desencadeamento da resistência de vários gêneros de mosquitos, entre eles o *Aedes* e *Anopheles*, que passaram a tolerar esse inseticida que antes era letal em baixas concentrações (Harapan et al. 2016). Diante desse fator, dosagens mais elevadas eram aplicadas, controlando as populações susceptíveis e perdendo a eficácia com as populações mais resistentes, resultando no fim do uso do DDT em 1970, passando a serem usados outras classes químicas de inseticidas sintéticos (Baranitharan et al. 2017).

Figura 14. Inseticida usado no controle de insetos pragas.



Fonte: ar.pinterest.com.br, (2018).

Um exemplo da resistência dos mosquitos à inseticidas sintéticos ocorreu na Colômbia entre os anos de 1980 a 1990, onde a principal forma de controle dos vetores era o uso irrestrito do DDT (Nogueira et al. 2010).

No Brasil, os inseticidas têm sido usados desde as campanhas contra os vetores da doença de chagas, febre amarela, malária e dengue, onde nessas campanhas usaram-se organoclorados, sal ionizado, carbamatos, organofosforados e piretróides, alguns como o hexaclorobenzeno (BHC) e o cianogás (Haddi et al. 2017).

Os **organoclorados** contêm carbono, hidrogênio, cloro e são constituídos por quatro grupos: difenil-alifáticos, hexaclorociclohexanos, ciclodienos e policloroterpenos que atuam no sistema nervoso dos insetos, mais precisamente no canal de sódio, alterando o equilíbrio de íons de sódio e potássio dos axônios, impedindo a transmissão normal do impulso nervoso em insetos, peixes ou mamíferos de pequeno porte, causando sua morte (Braga & Valle, 2007).

Os **organofosforados** são inseticidas que contêm fósforo, nitrogênio, hidrogênio, enxofre e oxigênio. Os inseticidas malathion, vapon, vidrin, etil e metil paration, fenitrothion atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase a deixando inativa, impedindo a propagação do impulso elétrico, causando a morte do inseto (Pontes et al. 2005). Quando manipulados incorretamente, podem intoxicar o homem causando efeitos como parada respiratória, convulsões ou morte, pois afeta diretamente o sistema nervoso central, além de serem tóxicos para organismos não-alvos (Haddi et al. 2017).

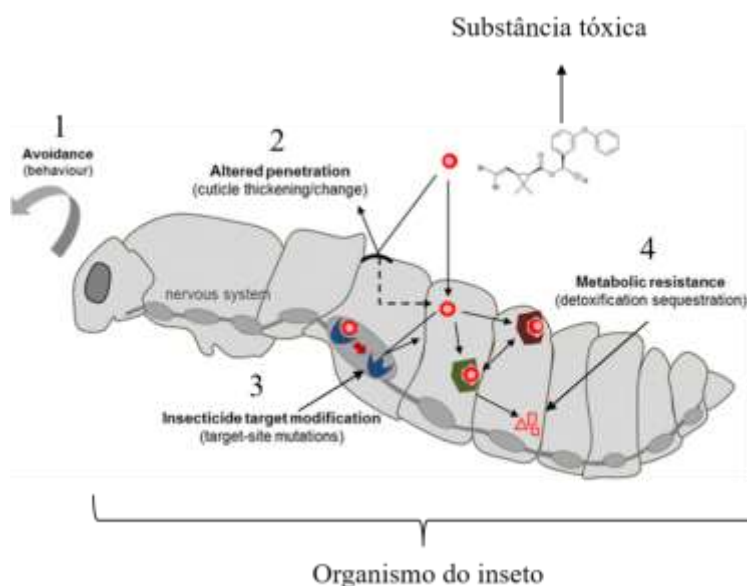
Os **carbamatos** têm ação similar aos organofosforados, sendo o composto carbamato, o responsável pelos efeitos tóxicos. O chumbinho (aldicarb) é um carbamato comercializado ilegalmente no Brasil, sua ingestão pode ocasionar coma ou morte (Ferreira-Mansur et al. 2012).

Os **piretróides** são produtos com baixo impacto ambiental e rápida ação inseticida, agem no canal de sódio da tensão transmembranar, conhecido pela abreviatura de Na_V do sistema nervoso dos insetos, causando tremores e consequentemente a morte do inseto, esse modo de ação é denominado de Knockdown ou *Kd* (Ferreira-Mansur et al. 2012). Porém, o estudo realizado por Liss et al. (2014) demonstrou a identificação de linhagens de mosquitos *Ae. aegypti* coletadas em 30 localidades do Brasil com mutações para a resistência do efeito Knockdown (resistência de desintoxicação). Segundo os autores, a resistência metabólica desencadeada pela mutação *Kdr* estar correlacionada às enzimas glutatona S-transferases (GST), oxidases multifuncionais P450 e às oxidases. Ainda segundo os autores, a identificação da toxina de piretro no organismo dos insetos direciona para a seleção do mecanismo da mutação *Kdr* para a desintoxicação do organismo.

As enzimas descritas anteriormente também estão relacionadas à resistência comportamental que é dita quando o inseto identifica substâncias tóxicas em seu habitat fazendo-o migrar para outro local seguro, além das linhagens de mosquitos resistentes apresentarem modificação na estrutura da cutícula de modo que o inseticida não consiga penetrar, em casos que o inseticida consegue passar pela cutícula, o local-alvo das substâncias tóxicas pode sofrer alteração, não permitindo a ligação da toxina com o alvo (Liss et al. 2014; Kweka et al. 2016).

A resistência metabólica é o processo no qual a toxina presente no organismo do inseto é eliminada rapidamente, evitando a intoxicação do animal (Figura 15) (CDCP, 2014). Todos esses mecanismos evitam que o sistema nervoso do inseto seja atingido, e consequentemente, evita sua morte. Os resultados publicados por Liss et al. (2014) descreve que a mutação *Kdr* podem estar correlacionadas às últimas epidemias de dengue e malária registradas na América do Sul entre os anos de 2010 a 2016, onde 60% dos casos foram registrados no Brasil em 2011, onde foram usados maciçamente inseticidas da classe dos piretróides para manter a população do vetor sob controle. A poluição ambiental causada pela urbanização também contribuiu para o desencadeamento das epidemias da dengue (Kweka et al. 2016; Mendes et al. 2017).

Figura 15. Ilustração dos mecanismos envolvidos na resistência dos insetos a substâncias tóxicas. Resistência comportamental (1). Resistência da cutícula para dificultar a penetração da substância tóxica (2). Modificação do local alvo da substância tóxica (3). Resistência metabólica (4).



Fonte: ar.pinterest.com (2018) e adaptado por Oliveira, A.C (2018).

1.4. Óleo essencial: uma alternativa no controle dos insetos vetores

Papiros egípcios datados de 1300 a 1600 a.C encontrados em escavações arqueológicas relatam que as plantas já eram usadas no tratamento de enfermidades e têm sido a base dos recursos utilizados pelas civilizações ao longo dos séculos no combate aos mais diversos males que prejudicam a saúde humana e animal, e até hoje, são utilizadas na alimentação e na cura de doenças (Do Nascimento et al. 2012).

Dependendo da região, diferentes espécies de plantas podem receber o mesmo nome popular, causando a identificação errada da planta, tornando seu uso popular perigoso, sendo imprescindível a identificação correta da espécie vegetal (Ruiz-Guerrero et al. 2015). Devido às crescentes publicações relatando resistências aos inseticidas sintéticos, disseminação das doenças relacionadas aos vários artrópodes vetores e a preocupação com o meio ambiente, muitos estudos são realizados utilizando várias espécies de plantas com o objetivo de encontrar substâncias ativas nos óleos essenciais ou extratos que possam ser utilizadas no controle de vetores (Bianco et al. 2013).

Os óleos essenciais são o resultado dos metabólitos secundários sintetizados pelas plantas, ademais, os metabólitos podem sofrer variações qualitativa e quantitativa, dependendo da região onde a espécie botânica habita (Barros et al. 2012). Os processos

bioquímicos e fisiológicos das plantas são influenciados por diversos fatores como temperatura, disponibilidade de água, luz e nutrientes no solo, resultando na alteração da síntese dos metabólitos secundários e consequentemente alteram a porcentagem do óleo essencial (Figura 16) ou extratos (Do Nascimento et al. 2012).

Os óleos essenciais ou extratos são constituídos de substâncias que podem atuar sinergicamente no organismo dos vetores causando sua morte, possuem baixa toxicidade e são biodegradáveis, sendo considerada uma das formas alternativas ao controle convencional de vetores, com grande potencial biotecnológico (Vila et al., 2010). Os óleos essenciais consistem principalmente da mistura de mono, sesquiterpenos ou fenilpropanóides (Belo et al., 2009). São lipofílicos e voláteis em temperatura ambiente, a luminosidade e umidade são alguns dos fatores que podem causar oxidação nos óleos essenciais, afetando sua qualidade e atividade biológica (Morais, 2009). Os óleos essenciais localizam-se nos espaços intercelulares ou nas bolsas oleíferas, presentes praticamente em todas as partes da planta, todavia, encontram-se em regiões definidas como flores, folhas, frutas, cascas, talos, sementes, raízes ou rizomas. As espécies das famílias Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae e Piperaceae são boas produtoras de óleos essenciais (Geromini et al. 2012).

Figura 16. Frascos com óleos essenciais.



Fonte: oleosessenciais.org.br, (2020).

Estudos fitoquímicos de várias espécies de plantas identificaram classes de substâncias bioativas nos óleos essenciais e nos extratos como terpenos, flavonóides, esteróis, éteres, alcaloides, saponinas, lignanas e entre outros, os quais foram atribuídas diversas atividades biológicas com destaque para as atividades antitumoral, antioxidante, analgésico, anticarcinogênicas, antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória, fotoprotetora, ovicidas, larvicidas, pupicidas e inseticidas (Machado et al. 2013).

Naturalmente nas plantas, essas substâncias desempenham funções relacionadas à proteção contra fungos, bactérias, herbivoria, competição com outras plantas por nutrientes, e dependendo do inseto, podem atuar como repelência, atração (polinização) ou inseticida (Gusmão et al. 2013).

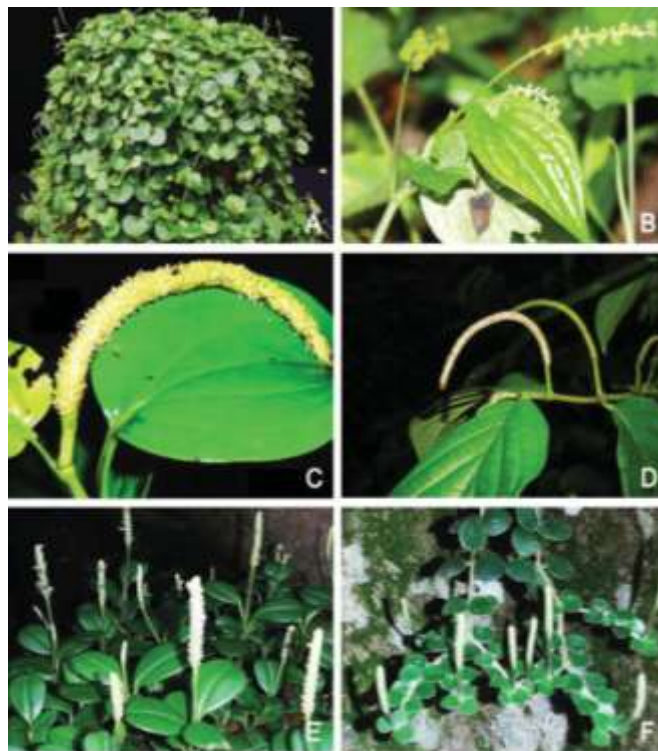
A utilização dos óleos essenciais no controle de mosquitos vetores e outros insetos têm significativas vantagens em comparação aos inseticidas sintéticos principalmente por serem biodegradáveis, são obtidos de recursos naturais, não promovem a resistência, apresentam toxicidade seletiva contra insetos, entre outros (Machado et al. 2007). Os óleos essenciais são de fácil obtenção, não deixam resíduos em alimentos e apresentam menor custo de produção e além disso, a crescente preocupação com o meio ambiente, torna o emprego desse produto um campo promissor para o desenvolvimento de novos produtos e métodos biológicos no controle de vetores (Andemo et al. 2014).

1.5. Família Piperaceae

Plantas da família Piperaceae são encontradas em grande abundância nas regiões tropicais e subtropicais dos hemisférios norte e sul (Machado et al. 2015). A família engloba os gêneros *Peperomia*, *Zippelia*, *Manekia*, *Verhuellia* e *Piper* (Figura 17) (Al-Mehmadi et al. 2010; Andrade et al. 2011).

As espécies são caracterizadas como arvoretas, ervas ou arbustos com caule nodosos, as flores são reduzidas e morfológicamente em formato de espiga (Machado et al. 2015). As folhas apresentam formato de lança, elípticas ou redondas, são alternadas simples, possuem pecioladas com ou sem estípulas (Gogosz et al. 2012). No Brasil são encontradas com grande facilidade em beiras das estradas, quintais das residências ou em áreas impactadas pela ação antrópica (Christ et al. 2016). A família tem grande importância científica, sendo constantemente alvo de estudos com o intuito de encontrar substâncias com atividades biológicas desde ao tratamento do câncer ao tratamento de doenças virais (Salvaro, 2009).

Figura 17. Gêneros de Piperaceae: *Verhuellia* (A). *Zippelia* (B). *Manekia* (C). *Piper* (D) e *Peperomia* (E,F)



Fonte: Machado, (2018).

Na China, Piperaceae são popularmente utilizadas no tratamento de arritmias cardíacas e asma, na Jamaica são usadas em tratamentos estomacais, no México são usadas no combate de várias infecções, enquanto no Brasil é empregada como diurético, anti-hemorrágico, excitante digestivo, males do fígado, tratamento de doenças crônicas, sedativo, antioxidante e antiofídico (Novaes et al. 2010; Burci, 2011). Entre muitos gêneros estudados no controle de vetores (Rajeswary et al. 2014; Kothandan et al. 2014), as plantas do gênero *Piper* se destacam por sua ampla atividade biológica, principalmente pelo seu potencial inseticida (Autran et al. 2009; Sheikh et al. 2012).

1.5.1. Gênero *Piper* e suas atividades contra insetos

Piper é o maior gênero com aproximadamente 2000 espécies de plantas (Villamizar et al. 2017). Na América do Sul, o gênero é encontrado em todos os países (Amezcu, 2016), e dependendo da cultura da região, são utilizadas para o tratamento de dores estomacais, inflamações, picadas de cobras, bebidas, condimentos alimentares entre outros propósitos (Branquinho et al. 2017).

Muitas espécies de *Piper* têm grande importância comercial e econômica. A exemplo, *P. nigrum* popularmente conhecida como pimenta-do-reino, utilizada no condimento de alimentos (Ferreira et al. 2012; Mullally et al. 2016). O gênero também tem importância científica em estudos bacteriológicos, fúngicos, antioxidante, inseticidas entre outros (Rebelo et al. 2012).

Estudos fitoquímicos identificaram flavonoides, fenólicos, ácidos benzênicos, amidas (Andrade et al. 2011; Silva et al. 2016; Maciel et al. 2016) fenilpropanóides, cromonas, lignanas, leolignanas, monoterpenos, sesquiterpenos e arilpropanóides entre outros compostos (Santos et al. 2012; Machado et al. 2013), com atividades ovicidas, larvicidas, pupicidas, adulticidas, repelência, inibição da alimentação, reguladores de crescimento, oviposição, deformações morfológicas e deterrência contra várias espécies de mosquitos (Furtado et al. 2005; Lobato et al. 2007; Machado et al. 2007; Bueno et al. 2010).

Pereira et al., (2008) verificou a atividade inseticida das espécies *Piper aduncum* e *Piper hispidivernum* sobre o caruncho *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera), importante inseto praga que ataca os grãos de caupi *Vigna unguiculata* (Fabaceae). Os resultados demonstraram que os óleos essenciais dessas espécies vegetais causaram de 91,6% a 100% de mortes do inseto. As mortes foram relacionadas as substâncias dilapiol e safrol, que são reconhecidamente substâncias inseticidas (Oliveira et al. 2013; Santos et al. 2013).

Os resultados do trabalho de Pinto et al., (2012) utilizando o dilapiol e seus derivados contra fêmeas de *A. aegypti* (Culicidae) tratadas por 45 min, resultou em 100% de mortes das larvas do mosquito. A piperina isolada de *P. nigrum* demonstrou grande atividade antiparasitária contra *Tripanossoma* spp e *leishmania* spp (Trypanosomatidae) (Ferreira et al., 2012).

Quin et al., (2010) realizou vários ensaios utilizando o óleo essencial de *P. sarmentosum* em vários ínstars de *Brontispa longissima* (Gestro) (Coleoptera), e demonstraram que a concentração de 2000 mg/mL reduziu em 92,26% a atividade alimentar das larvas do inseto, testes de toxicidade utilizando as concentrações de 5 a 8 µL causaram mortalidade de 86,91% a 100% e a taxa de eclosão reduziu para 8,5% na concentração de 20 µL.

O potencial inseticida de extratos de *Piper hispidum* foi avaliado por Santos e colaboradores (2010) contra o Coleoptera *Hypothenemus hampei*, causando 100% de mortalidade. Santos et al., (2010) utilizando extratos de *P. amargo*, *P. mikanianum* e *P. xylostoides* nas concentrações de 1%, 0,5%, 0,25% e 0,0625%, observou uma mortalidade

de 60 a 100% das larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Ixodidae) conhecido como carrapato-do-boi. Extratos das raízes e folhas de *P. aduncum* avaliados nas concentrações de 10, 20 e 30 mg/mL mataram 72% (CL₅₀ de 20,9%) a 80% (CL₅₀ de 20,2%) das larvas de *Aetalion* spp (Hemiptera) (Silva et al., 2007).

Óleos essenciais de *P. aduncum*, *P. callosum*, *P. divaricatum*, *P. marginatum* e *P. marginatum* var. *marginatum* foram utilizadas por Souto et al., (2011) em operárias de *Solenopsis saevissima* Smith (Hymenoptera), causando mortalidade de 100% (1000 ppm), 85% (500 ppm), e 55% (100 ppm) durante 24 h, enquanto que em 48 h as mortalidades foram de 100% em (1000 ppm e 500 ppm) e 76% em (100 ppm).

P. umbellata, conhecida popularmente como pariparoba, capeba ou malvarisco, encontrada em todo Brasil e facilmente encontrado no estado do Amazonas, é empiricamente usada no tratamento de doenças do fígado, dores estomacais, febre e como diurético (Baldoque et al., 2009; Vale et al., 2013). Junior et al., (2014) realizaram uma série de ensaios biológicos utilizando extratos de *P. umbellata* e verificaram que o extrato utilizado na concentração de 2000 mg/Kg, não causou qualquer tipo de alteração comportamental nos ratos, contudo, demonstrou forte atividade contra *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, e *Enterococcus faecalis*, nas concentrações de 12,5 a 25 mg/mL.

Medeiros et al., (2005) avaliaram a atividade ovicida de extratos de *P. umbellata* sobre *Plutella xylostella* (Lepidoptera) (traça-das-crucíferas), importante praga da couve, e constatou efeito deterrente (inibidor alimentar) dos extratos sobre oviposição do inseto de 78,9%. Santos et al., (2012) após inúmeros ensaios, constatou que o óleo essencial de *P. malacophyllum* apresentou ampla atividade antimicrobiana contra várias cepas Gram-positivas e Gram-negativas e moderada atividade antifúngica.

1.5.2. *Piper alatipetiolatum* Yunck., 1966

É um representante do gênero *Piper* conhecida vulgarmente como Pau d'angola, muito utilizado como planta ornamental. Apresenta caule verde, inflorescências eretas, e encontrado facilmente nas beiras das estradas e áreas desmatadas (Figura 18) (Cerqueira, 2005). Embora a espécie seja facilmente encontrada nos estados do Acre, Amazonas, Pará, Bahia e Espírito Santo (SiBBR, 2015), ainda são escassos os estudos com esta espécie. Porém, alguns estudos já foram reportados por nosso grupo de pesquisa descrevendo a atividade inseticida contra *Aedes* (Carneiro et al., 2014; Oliveira et al., 2014a; Oliveira et

al., 2017a; Oliveira et al., 2017b; Pereira, 2018, Oliveira et al., 2019a; Oliveira et al., 2019b).

Figura 18. *Piper alatipetiolatum*.



Fonte: Oliveira, A.C (2016).

1.5.3. *Piper purusanum* Yunck., 1966

P. purusanum (Figura 19) possui folhas alternadas com pecíolos, espigas eretas, facilmente encontrada em toda região Amazônica. Souza et al., (2009) aborda o estudo farmacológico analgésico da espécie em estudos de toxicidade geral e aguda em camundongos. O efeito tóxico contra vetores foi realizado por Gomes et al. (2009), ao estudarem a atividade do extrato aquoso na qual as concentrações de 150 e 200 mg/mL causaram 60 a 70% de mortes contra vetores da família Tephritidae cujos insetos são conhecidos como mosca-das-frutas que causam grandes prejuízos nas plantações de frutas brasileiras. Na literatura científica é possível encontrar alguns estudos descrevendo a atividade biológica da espécie contra imaturos de *Aedes* (Oliveira et al., 2014b).

Figura 19. *Piper purusanum*.



Fonte: Oliveira, A.C (2016).

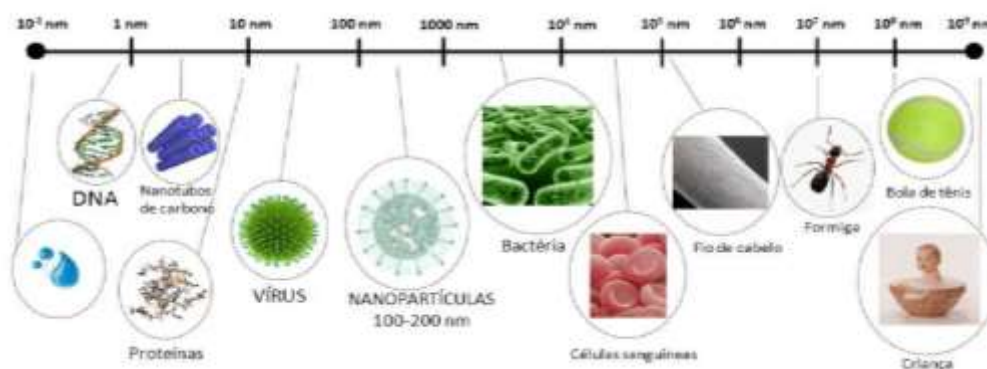
1.6. Nanosistemas: veículos carregados de óleos essenciais

A nanotecnologia é um ramo da ciência que detém a capacidade de manipular estruturas físicas, químicas ou biológicas em escala nanométrica (Figura 20), denominadas de nanoestruturas, cujos benefícios são empregados nas mais diversas áreas da ciência como na indústria manufatureira para a produção de nano sensores, até a biotecnologia para síntese de nano inseticidas (Bastos, 2006).

O termo nano (nm) referência ao tamanho reduzido das partículas que corresponde a bilionésima parte de 1 metro, ou seja, 1 nm equivale a 1/1.000.000.000 (Volpato et al., 2016b). Atualmente, a síntese de nanoestruturas carregadas com substâncias naturais ativas, permitiu o aprimoramento de métodos utilizados no controle de diversas pragas agrícolas e vetores de arboviroses, devido ao seu potencial de proteger o princípio ativo de fatores como a luminosidade que podem afetar a atividade. Ademais, permitem melhora da atividade biológica de maneira controlada, além de reduzir os custos de produção (Sugumar et al., 2012).

Esses efeitos são correlacionados às características fitoquímicas do princípio ativo, além das características da nanoestrutura como o tamanho, distribuição, reatividade, liberação controla. Esses e outros fatores facilitam a absorção e distribuição do princípio ativo no organismo dos insetos, desencadeando diversas reações que causam a morte (Abirami et al., 2016; Osanloo et al., 2017).

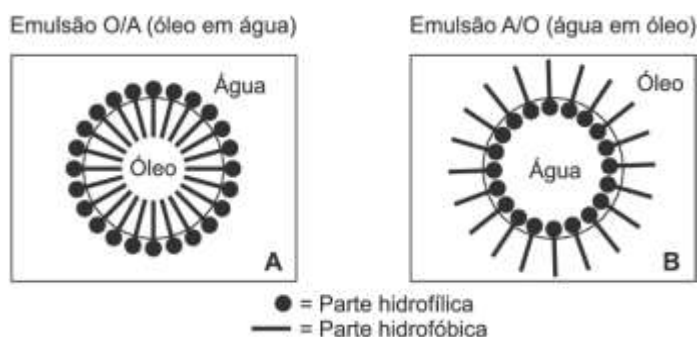
Figura 20. Sistemas biológicos em escala nanométrica.



Fonte: Nanotec, (2019).

As nanoestruturas são divididas em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) que são sistemas de transporte coloidal produzidos pelos métodos de homogeneização a alta pressão a quente ou frio, emulsão múltipla, difusão de solvente, emulsificação/ evaporação de solvente ou microdiluição. As nanocápsulas são sistemas que envolvem a combinação de princípios ativos gasosos, líquidos ou sólidos através da absorção, dispersão ou incorporação desses bioativos dentro de cápsulas que têm a função de aprimorar a solubilidade e estabilidade, além de proteger contra a degradação. Enquanto que as nanoemulsões são sistemas constituídos por gotículas esféricas com nanopartículas de tamanho de 50 a 500 nm formadas por uma fase oleosa e outra aquosa, classificadas como um sistema óleo e água (O/A) quando o óleo está internamente disperso na nanoestrutura ou água e óleo (A/O) quando a água está dispersa internamente (Figura 21) (Forgiarini et al., 2001; Mao et al., 2009; Let et al., 2012; de Almeida Vaucher et al., 2015; Espirito et al., 2017).

Figura 21. Exemplos de nanoemulsão O/A e A/O.



Fonte: Nanotec, (2020).

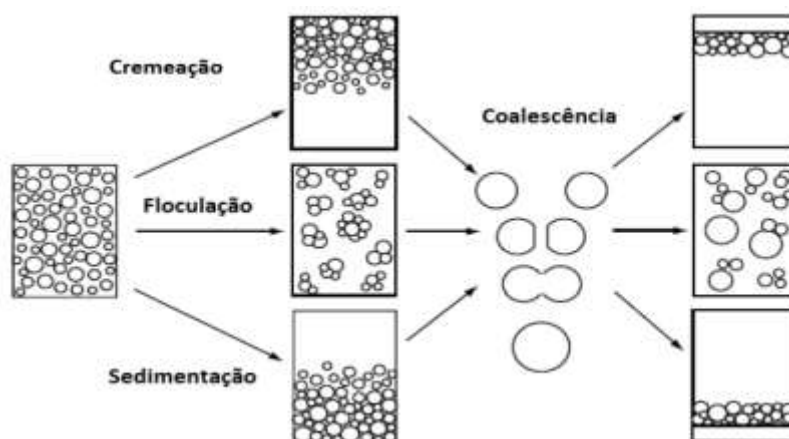
A síntese da nanoemulsão exige o emprego de dispositivos mecânicos (agitadores magnéticos) que geram energia (entre 400 a 800 rpm) para a conjugação das fases,

geralmente a energia é reduzida quando a síntese envolve substâncias ativas como óleos essenciais (Rezende et al., 2003). A energia empregada influencia no tamanho das nanopartículas que podem variar de 100 a 500 nm. O tamanho reduzido afeta a característica óptica do sistema pois os tamanhos das partículas são potencialmente menores que o comprimento de onda da luz visível (Sugumar et al., 2012; Osanloo et al., 2017).

A síntese também exige o uso de tensoativos como Tween, DMSO entre outros, para reduzir a pressão de Laplace que é caracterizada como a pressão interna e externa das partículas, além disso, os tensoativos atuam na compatibilidade entre as fases, colocando a fase aquosa em contato com a fase oleosa (óleo essencial) gerando as forças eletrostáticas repulsivas entre as gotículas, melhorando e prolongando a estabilidade do sistema, evitando assim, a separação das fases ou coalescência, floculação ou cremação, efeitos que indicam instabilidade (Figura 22) (Forgiarini et al., 2001; Nel et al., 2009; Rajaganesh et al., 2016a).

Os fatores citados acima permitem que óleos essenciais sejam encapsulados para serem usados no controle de insetos vetores, aumentando a eficiência da atividade inseticida, prolongando o tempo de ação e aplicação, proteção contra fotodegradação. Assim, um número significativo de estudos descrevem o emprego das nanoemulsões no controle dos vetores da malária e dengue (Rezende et al., 2003; Guterres et al., 2007; Shafiq and Shakeel, 2010; Sugumar et al., 2012; Benelli et al., 2017; Rajaganesh et al., 2016b; Crucho and Barros, 2017; Osanloo et al., 2017).

Figura 22. Fatores indicativos de instabilidade.



Fonte: Filho, (2019).

2. OBJETIVO

2.1. Geral

Avaliar a efetividade das nanoemulsões carregadas com os óleos essenciais de *Piper alatipetiolatum* e *Piper purusanum* no controle dos vetores da dengue e malária.

2.2. Específicos

Identificar os constituintes químicos dos óleos essenciais;

Caracterizar as atividades biológicas dos óleos essenciais em diferentes estágios do ciclo de vida de espécies dos gêneros *Aedes* e *Anopheles*;

Identificar o mecanismo de ação inseticida dos óleos essenciais;

Avaliar a toxicidade dos óleos essenciais em organismo aquático não-alvo;

Sintetizar e caracterizar nanoemulsões carregadas com os óleos essenciais ativos;

Avaliar as atividades biológicas das nanoemulsões em diferentes estágios do ciclo de vida do *Aedes* e *Anopheles*;

Determinar o efeito residual dos óleos essenciais e das nanoemulsões contra larvas de *Aedes*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coletas das espécies vegetais

As coletas das espécies vegetais foram realizadas seguindo método descrito por Andrade et al., (2011). Amostras de *P. alatipetiolatum* foram coletadas entre 09 e 11 h da manhã no horto da Universidade Nilton Lins (Figura 23), situada no bairro Parque das Laranjeiras (Latitude -3.060562 e Longitude -60.009110). Amostras de *P. purusanum* foram coletadas entre 10 e 12 h em área particular conhecida como “Toca do Lazer” situado nas margens do igarapé Tucumã-açu (Figura 24), localizado no ramal do Pau Rosa (Latitude -2.782853 e Longitude -60,084138).

As amostras vegetais foram cortadas numa altura de 30 centímetros do solo utilizando facão n° 128 (Tramontina®). Posteriormente, foram acondicionadas individualmente em sacos pretos com capacidade de 200 litros e transportadas ao Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (LTQPN), localizado no INPA.

Figura 23. Horto da Universidade Nilton Lins.



Fonte: GoogleMaps (2015).

Figura 24. Igarapé do Tarumã-açu.



Fonte: GoogleMaps (2015).

3.1.1. Determinação do teor de umidade

Para identificar o teor de umidade das folhas das espécies *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum*, foram utilizados os métodos descritos por Girard (2007) e Gouvea (2013) com modificações. Inicialmente, as folhas foram removidas dos galhos e moídas em moinho do tipo facas (Willey, modelo SP-32-SLABOR) com posterior registros das biomassas frescas (Figura 25). Em seguida, as folhas foram secas em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ até atingirem a massa constante para registros das biomassas secas. Os experimentos foram realizados em triplicata. As identificações dos teores de umidades foram estimadas usando a fórmula: $\% \text{ de umidade} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$.

Figura 25. Amostras vegetais moídas.



Fonte: Oliveira, A.C (2015).

3.1.2. Extrações dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* (OEPa) e *P. purusanum* (OEPp) foram extraídos utilizando aparato Clevenger (Figura 26) interligado ao sistema de refrigeração de água com temperatura ajustada para 10°C . Foram usados 50 g das folhas secas submergidos em 4 L de água destilada. As extrações dos óleos essenciais foram realizadas em quadruplicada com duração de 1 h em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Em intervalos de 15 min, os volumes dos óleos essenciais foram registrados diretamente nos Clevengers. Posteriormente, os OEs foram coletados, centrifugados, secos com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), armazenados em frascos âmbar (Figura 27) e mantidos sob refrigeração constante à -5°C (Guimarães et al., 2008). Os rendimentos dos óleos essenciais foram obtidos utilizando a fórmula a seguir (Girard, 2007).

$$R\% = \frac{\text{volume} \times \text{densidade}}{\text{massa}} \times 100$$

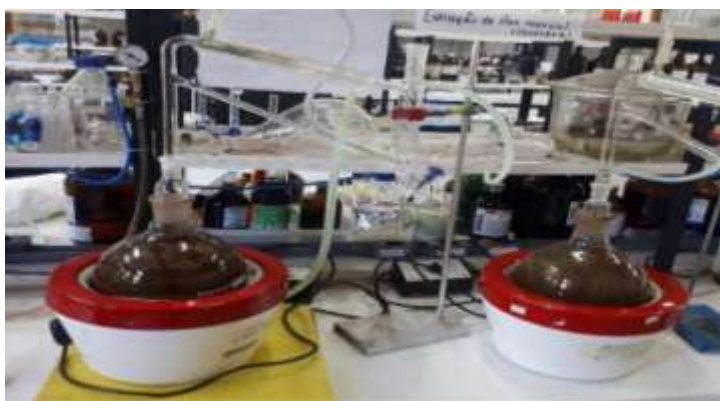
Onde: R% = rendimento em porcentagem do óleo essencial.

Volume = volume de óleo essencial mL.

Densidade = massa de 1 mL de óleo em mg.

Massa = massa seca de folhas em mg.

Figura 26. Extrações dos óleos essenciais.



Fonte: Oliveira, A.C (2015).

Figura 27. Armazenamento dos óleos essenciais de *Piper alatipetiolatum* (OEPa) e *Piper purusanum* (OEPp).



Fonte: Oliveira, A.C (2015).

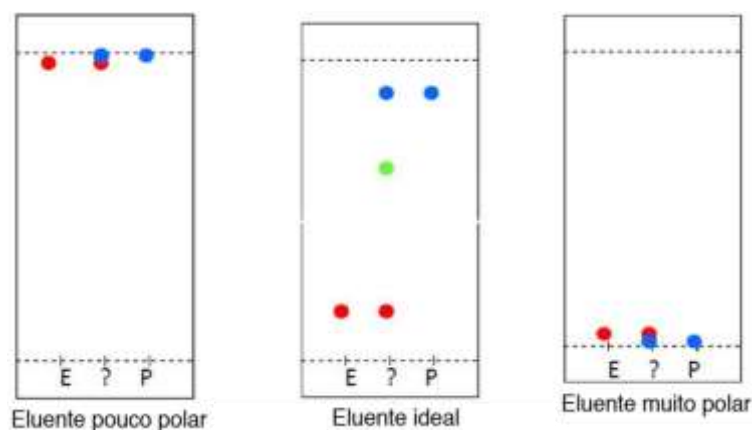
3.1.3. Análise dos perfis químicos dos óleos essenciais

As identificações dos perfis químicos dos óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* foram realizadas usando o método de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando cromatoplasas (ou placas) de fase normal com dimensões de 20 x 09 cm, espessura de 200 µm e indicador F – 254 (Silicycle UltraPure Silica Gels®, Canadá).

Inicialmente, 5 mg dos óleos essenciais solubilizados, isoladamente, em 5 mL de hexano foram aplicados com auxílio de capilar de vidro sobre as placas, que foram acondicionadas em cuba cromatográfica previamente saturada por 5 min com mistura de diferentes solventes até identificar o sistema de diferentes solventes até identificar o sistema (mistura de solventes – fase móvel) que melhor separa as manchas (Figura 28) e reveladas com diferentes reveladores (perfil químico do óleo essencial).

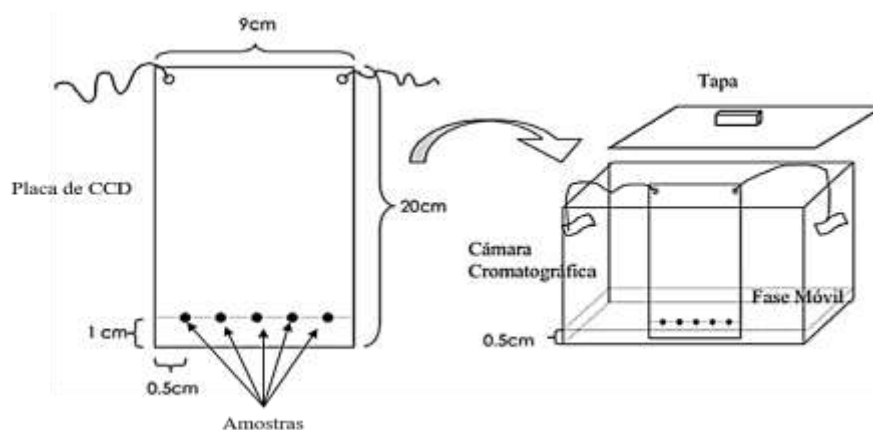
Terminadas as eluições, as placas foram reveladas com vanilina sulfúrica até a visualização das manchas (Figura 29). No laboratório Q-bioma, as manchas foram visualizadas sob Luz Ultravioleta (UV) nos comprimentos de ondas de 254 e 366 nm utilizando o aparelho CAMAG TLC Vizualizer (Figura 30), com os respectivos valores dos fatores de Rf determinados (Alexandre et al., 2017).

Figura 28. Ilustração da determinação da escolha do melhor sistema de eluição.



Fonte: Bio-quim, (2015) e modificado por Oliveira, A.C (2015).

Figura 29. Ilustração da análise por CCD dos óleos essenciais.



Fonte: Bio-quim, (2015) e modificado por Oliveira, A.C (2015).

Figura 30. Visualização das placas cromatográficas (CCD) contendo os óleos essenciais.



Fonte: Q-Bioma, (2015).

3.1.4. Análise e identificação dos constituintes voláteis

Os compostos químicos do óleo essencial foram identificados por meio de GC-MS e GC-FID. Injeção prévia o óleo essencial (1 mg) foi diluído em acetato etílico (1 mL). Para análises de GC-MS, foi utilizado um modelo Trace GC Ultra acoplado ao ISQ, um único espectrômetro de massa quadrupolo ambos pela Thermo Scientific (Figura 31). Para cada amostra, 1 μ L foi injetado com uma razão dividida de 1:50 para uma coluna capilar DB5/MS por TR-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). A temperatura do forno foi programada de 60 °C a 240 °C aumentando 3 °C/min, usando hélio como gás portador, com uma temperatura de injeção de 240 °C e temperatura da interface a 250 °C. O espectrômetro de massa foi definido da seguinte forma: temperatura da fonte de íons: 220 °C; faixa de massa: m/z 40-600 e velocidade de varredura de 2 s. O software XCalibur v.2.2. controlada e processada a aquisição de dados. A identificação do composto foi realizada em comparação com os espectros de massa experimental com os de bibliotecas comerciais (NIST, Adams e biblioteca interna).

Para permitir a identificação de duas colunas pelo GC-FID, as análises foram realizadas em um equipamento Agilent, modelo G-1860 Plus, com sistema de coluna dupla com duas colunas, um HP-5 (apolar) e um Innnowax-20 (polar), ambos com as mesmas dimensões (30 m x 0,32 mm x 0,32 μ m). A temperatura do forno foi programada de 60 °C a 240 °C aumentando 3 °C/min usando hidrogênio como transportador de gás a 4 mL/min. A temperatura de injeção foi definida para 250 °C com proporção dividida de 1:2. Os detectores de ionização de chamas foram fixados a 280 °C com taxas de fluxo de hidrogênio, ar sintético e nitrogênio a 30, 300 e 30 mL/min, respectivamente. Um amostrador líquido automático realizou cada conjunto de injeção a 1 μ L e um software HP

Chemstation controlou o sistema. Os índices de retenção (RI) foram obtidos utilizando-se a série *n*-alcanos (C8-C26) da Supelco e a equação Van Den Dool & Kratz, (1963). A identificação de cada composto foi feita por comparação do RI obtido, em ambas as colunas, com as encontradas na literatura (Adams, 2017; NIST, 2018, Davies, 1990).

Figura 31. Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas.



Fonte: Thermo Scientific, (2020).

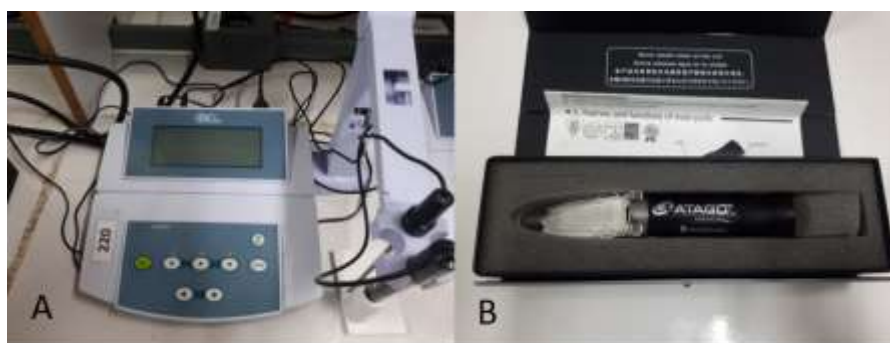
3.1.5. Análise de RMN

Os espectros de RMN do óleo essencial foram registrados em um espectrômetro Bruker, modelo Fourier 300 (300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C), utilizando tubos de amostra de 5 mm, CDCl_3 (99,9% D, Cambridge Isótopos Laboratories) como solvente. As mudanças químicas foram expressas em relação à TMS. As mudanças químicas são expressas como valores δ em partes por milhão (ppm). Anteriormente, 57 mg de óleo essencial foram dissolvidos em 0,7 mL de CDCl_3 -d e, em seguida, realizou um experimento quantitativo de banda larga de banda larga de ^{13}C com pulso de 30 graus, largura espectral de 323,35 ppm, atraso de relaxamento para 4 s, tamanho FID de 64 Kb e 22528 scans.

3.1.6. Características físico-químicas

Os pH dos óleos essenciais foram identificados imergido o sensor do phmetro (BEL ENGINEERING®, modelo PHS3BW) (Figura 32A) diretamente nos frascos contendo os óleos essenciais. Os índices de refração foram determinados utilizando 5 μL das amostras em refratômetro portátil (ATAGO, modelo MASTER-93H) (Figura 32B) previamente calibrado com água destilada ($n_D = 1,333$) (Anjali et al., 2012).

Figura 32. Phmetro (A) e refratômetro (B) utilizados nas análises.



Fonte: NANOPOL, (2019).

3.2. Coleta dos mosquitos vetores de arboviroses e protozoários

3.2.1. Área de coleta dos ovos de *Aedes albopictus*

Os ovos de *A. albopictus* foram coletados por meio de armadilhas ovitrampas instaladas durante cinco dias nas dependências do INPA. Internamente, nas paredes das armadilhas, foram presas com o auxílio de clips metálico palhetas de eucatex de superfície porosa submersa parcialmente em 300 mL de água de torneira (Figura 33). Posteriormente, as armadilhas foram recolhidas e transportadas ao Laboratório de Malária e Dengue (LMD) para triagem (Braga et al., 2007).

Figura 33. Ovitrampa e palhetas usados nas capturas dos ovos de *Aedes albopictus*.



Fonte: Laboratório de Malária e Dengue, (2016).

3.2.2. Manutenção das colônias dos vetores da dengue em laboratório

A colônia de mosquitos *A. aegypti* é mantida há mais de 10 anos no LMD em temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, 70 a 80% de umidade e fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro. Para atender a demanda diária de estudos inseticidas realizadas pelo LMD, a manutenção da colônia é realizada nas seguintes condições: ovos de *A. aegypti* armazenados em papéis celulosos foram transferidos para cubas plásticas retangulares de

cor brancas acrescidas de 2 L de água de torneira para que ocorresse a eclosão das larvas. Em seguida, as larvas foram alimentadas com mistura de ração de peixe (Treta Min®) e roedores (Zootekna®) na proporção de (1:1) até atingirem o estágio L4. As pupas foram transferidas para recipientes contendo 50 mL de água de torneira e colocadas no interior de gaiolas entomológicas (colocar dimensões) para emergências dos mosquitos adultos. Dentro das gaiolas, os adultos foram alimentados com solução de sacarose (10%), colocada no interior de um erlenmeyer contendo chumaço de algodão envolvido em rolo de gaze.

As fêmeas realizaram repasto sanguíneo em hamster *Mesocricetus auratus* anestesiado seguindo as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/INPA: 058/2018, em intervalos de 48 h (Figura 34). Após o repasto, recipientes plásticos (100 mL) recobertos internamente com papel filtro e 50 mL de água de torneira foram colocadas no interior das gaiolas para servir de substrato para oviposição para as fêmeas.

Para obtenção dos imaturos de *A. albopictus*, as palhetas de eucatex oriundas das coletas em campo foram depositadas sobre bancada de mármore, em sala com temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 70 a 80% de umidade, durante 6 h para eliminar a água absorvida da armadilha. Posteriormente, as palhetas foram visualizadas sob lupa entomológica para identificar a presença e quantificar o número de ovos. Em seguida, as palhetas contendo os ovos foram acondicionadas no fundo de recipiente retangular preenchidas com 2 L água de torneira para eclosão das larvas. As larvas, pupas e adultos de *A. albopictus* foram alimentados e manipulados usando o método já descrito para *A. aegypti*. As identificações das espécies foram realizadas durante a fase adulta com o auxílio de capturador manual e lupa entomológica, devido a praticidade e rapidez na visualização das características morfológicas (Aciole, 2009; Magalhães et al., 2010), Anjolette et al., 2016).

Figura 34. Ciclo de criação e manutenção das colônias de *Aedes* spp. (A) Palhetas de Eucatex presas às armadilhas ovitrampas contendo ovos de *Aedes* spp. (B) Cubas contendo larvas. (C) Recipiente contendo pupas. (D) Repasto sanguíneo.



Fonte: Laboratório de Malária e Dengue, (2016).

3.2.3. Área de coleta dos imaturos de *Anopheles*

As coletas das larvas dos anofelinos correram em diferentes regiões do ramal do brasileirinho localizado na zona leste de Manaus, em áreas de constante monitoramento pela Fundação de Vigilância em Saúde de Manaus (FVS) (Figura 35).

Figura 35. Local das coletas de larvas e adultos de *Anopheles*.



Fonte: Oliveira, A.C (2016).

As capturas dos adultos de anofelinos foram realizadas próximo ao curral e ocorreram entre 18 e 22 h utilizando aspiradores. Posteriormente, os adultos foram acondicionados em copos (500 mL) recobertos com tela fina na borda superior para que não ocorresse a fuga dos mosquitos. Entre às 8 e 11 h, ocorreram as capturas das larvas de anofelinos utilizando conchas entomológicas nas margens do lago. As larvas foram acomodadas em recipientes plásticos contendo amostra da água do lago e transportadas ao

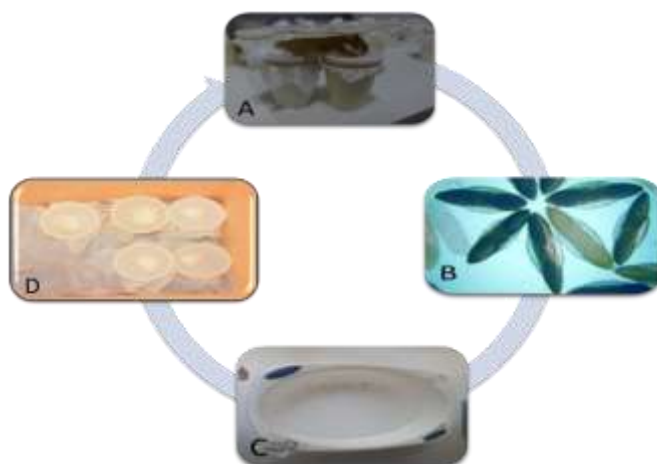
LMD. As coletas foram realizadas semanalmente devido as dificuldades em estabelecer uma colônia de *Anopheles* em laboratório, devido a dificuldade de cópula desta espécie em cativeiro (WHO, 1975).

3.2.4. Manutenção da colônia dos vetores da malária em laboratório

No LMD, as fêmeas dos anofelinos coletadas em campo foram identificadas nas seguintes espécies: *Anopheles darlingi*, *An. nunestovari*, *An. albitarsis* e *An. triannulatus*. Em seguida, as amostras foram incorporadas na colônia mantida na temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$; 70 a 80 % de umidade relativa e fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro. As fêmeas dos anofelinos realizaram repasto sanguíneo por cerca de 30 minutos em períodos de 48 h em hamster *M. auratus* (CEUA/INPA: 058/2014-18) (Figura 36). Posteriormente, as espécies foram acondicionadas separadamente em copos de desovas contendo internamente, papéis de celulose umedecidos. Os copos foram armazenados em caixas de isopor para manter a umidade e evitar que os ovos se tornem inférteis.

As larvas oriundas das eclosões e as que foram capturadas em campo foram acomodadas em cubas de manutenção e alimentadas com ração de peixe (Treta Min[®]) previamente maceradas até atingirem o estágio de L4. As pupas foram recolhidas, colocadas em copos plásticos contendo entre 10 mL de água destilada, posteriormente acoplados em gaiolas para emergência dos adultos (WHO, 1975; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Tadei et al., 1998; Villarreal-treviño et al., 2015).

Figura 36. (A) Copos contendo *Anopheles* spp realizando repasto em hamster. (B) ovos de *Anopheles* spp. (C) Cubas de criação das larvas. (D) copos de oviposição acondicionados em caixa de isopor.



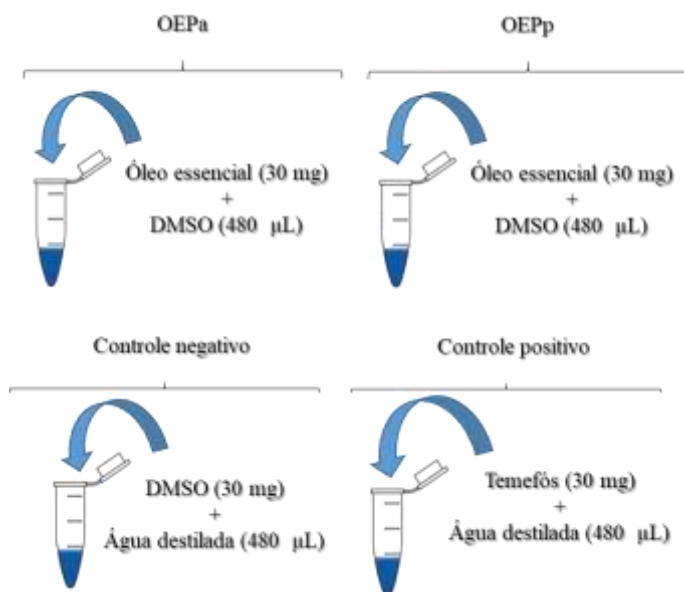
Fonte: Laboratório de Malária e Dengue, (2016).

3.2.5. Identificação das atividades dos óleos essenciais

Os bioensaios seletivos realizados para identificação da atividade biológica dos OEPa e OEPp contra imaturos dos gêneros *Aedes* e *Anopheles* foram realizados utilizando o protocolo da WHO, (2005) com modificações. Concentrações padrões (500 a 31,25 ppm), foram utilizadas adotando como critério de atividade positiva, as amostras que apresentaram atividade biológica $\geq 51\%$, e atividade inativa as amostras que apresentaram atividade $\leq 49\%$. Após confirmação da atividade, foram realizados testes dose-resposta com novas concentrações formuladas a partir da menor concentração dos óleos essenciais que atingiu 100% de atividade biológica nos testes pilotos.

Para cada bioensaio seletivo ovicida, larvicida e pupicida, foram preparadas soluções estoques com 30 mg de OEPa e de OEPp diluídas em 480 μL de DMSO. As soluções estoques do controle negativo (DMSO) e controle positivo (temefós®) também foram preparadas com 30 mg, entretanto, foram diluídas em 480 μL de água destilada (Figura 37).

Figura 37. Soluções estoques usados nos bioensaios seletivos.



Fonte: Oliveira, A.C (2016).

3.2.6. Bioensaio ovicida seletivo dos óleos essenciais

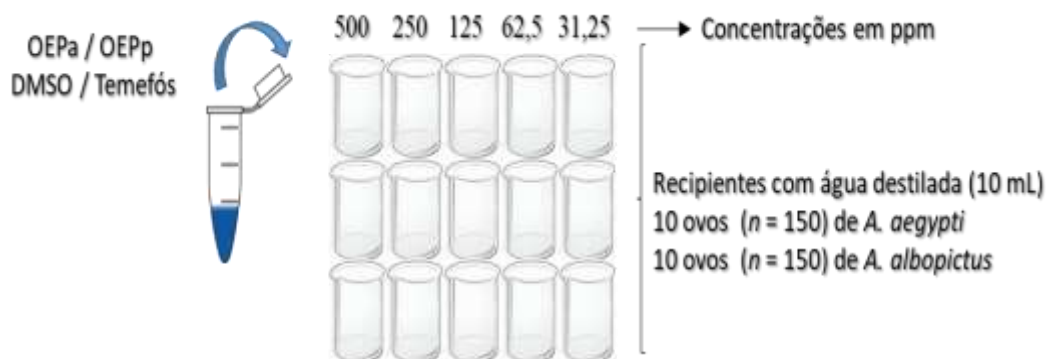
As identificações das atividades ovicidas dos óleos essenciais contra ovos de *A. aegypti* e *A. albopictus* foram realizadas modificando o método descrito por Reegan et al.,

(2014). Os experimentos foram realizados em sala climatizada com temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$; 70 a 80 % de umidade relativa. Grupos de 10 ovos ($n = 150$) de *A. aegypti* e grupos de 10 ovos ($n = 150$) de *A. albopictus* foram transferidas para recipientes plásticos (50 mL). Em seguida, as concentrações testes de 500 a 31,25 ppm oriundas das soluções estoques do OEPa, OEPP, DMSO (Sigma-Aldrich) e temefós (Sigma-Aldrich) foram pipetados diretamente sobre os ovos (Figura 38) e mantidos nessas condições por 24 h. Em seguida, foram acrescentadas 10 mL de água destilada aos recipientes contendo os ovos.

Os testes foram realizados em triplicata. Os registros de ovos não eclodidos foram realizados diariamente com auxílio de lupa entomológica (Stemi 2000-C) até completar 192 h de experimento. Os percentuais das atividades ovicidas de cada concentração foram mensurados usando a fórmula descrita a baixo. Não foi possível realizar testes usando ovos de *Anopheles* devido as dificuldades em adquirir o tamanho amostral (n) para os testes.

$$\text{Atividade ovicida \%} = \frac{\text{Número de ovos não eclodidos}}{\text{Número de ovos utilizados nos testes}} \times 100$$

Figura 38. Bioensaio seletivo contra ovos de *Aedes*.



Fonte: Oliveira, A.C (2016).

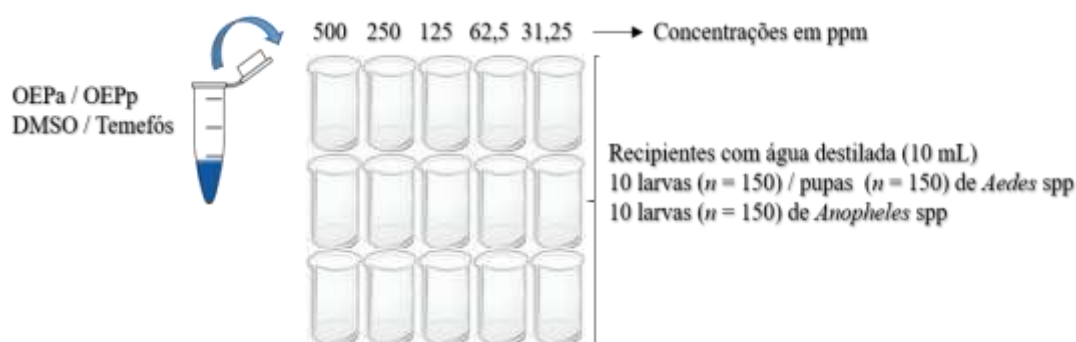
3.2.7. Bioensaio larvicida e pupicida seletivo dos óleos essenciais

Os bioensaios larvicidas e pupicidas foram realizados individualmente, seguindo o protocolo da WHO, (2005) com modificações. Os experimentos foram realizados em sala climatizada com temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$; 70 a 80 % de umidade relativa. Em cada experimento foram usados grupos de 10 larvas de 3º ínstar ($n = 150$) e pupas ($n = 150$) de *A. aegypti* e *A. albopictus* e grupos de 10 larvas de 3º ínstar de *An. darlingi*, *An. nunezovari*, *An. albitarsis* e *An. triannulatus* ($n = 150$) acondicionadas em recipientes plásticos (50 mL) contendo 10 mL de água destilada acrescidos das concentrações de 500

a 31,25 ppm das soluções estoques de OEPa, OEPp, DMSO e temefós (controle positivo) (Figura 39).

As larvas receberam alimento (1 mg) no momento da montagem dos bioensaios. Os experimentos foram realizados em triplicata e os registros das mortes foram realizados após 24 h de exposição das concentrações testes. Não foram realizados testes contra as pupas de *Anopheles* devido ao número amostral (n) obtidos durante o desenvolvimento do vetor ser insuficiente.

Figura 39. Bioensaio seletivo dos OEPa e OEPp contra imaturos de *Aedes* e *Anopheles*.

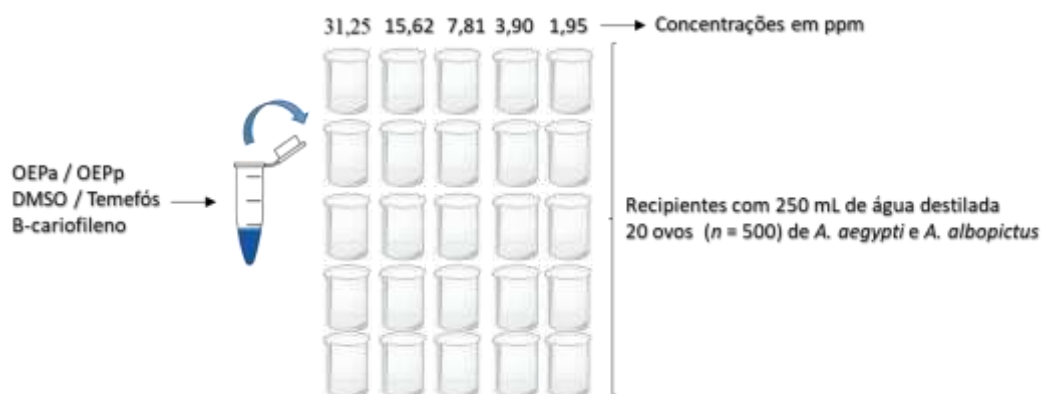


Fonte: Oliveira, A.C (2016).

3.2.8. Bioensaio ovicida de dose-resposta dos óleos essenciais e β -cariofileno

Os bioensaios ovicidas de dose-resposta dos óleos essenciais e β -cariofileno (Sigma-Aldrich) foram realizados seguindo o método descrito no item 3.2.6 com modificações. As soluções estoques foram preparadas separadamente com 18 mg de OEPa, OEPp e β -cariofileno diluídas em 1 mL de DMSO. As soluções estoques de DMSO e temefós, controle negativo e positivo, respectivamente, foram preparadas com 18 mg diluída em 1 mL de água destilada. Os testes foram realizados com grupos de 20 ovos ($n = 500$) de *A. aegypti* e *A. albopictus* transferidos para recipientes (300 mL) acrescido das soluções estoques nas concentrações de 31,25 a 1,95 ppm. Decorridos 24 h, foram acrescentados 250 mL de água destilada aos recipientes. Os experimentos foram realizados em quintuplicata com cinco repetições (Figura 40) (Reegan et al., 2014).

Figura 40. Bioensaio dose-resposta dos OEPa, OEPp e β -cariofileno contra ovos de *Aedes*.



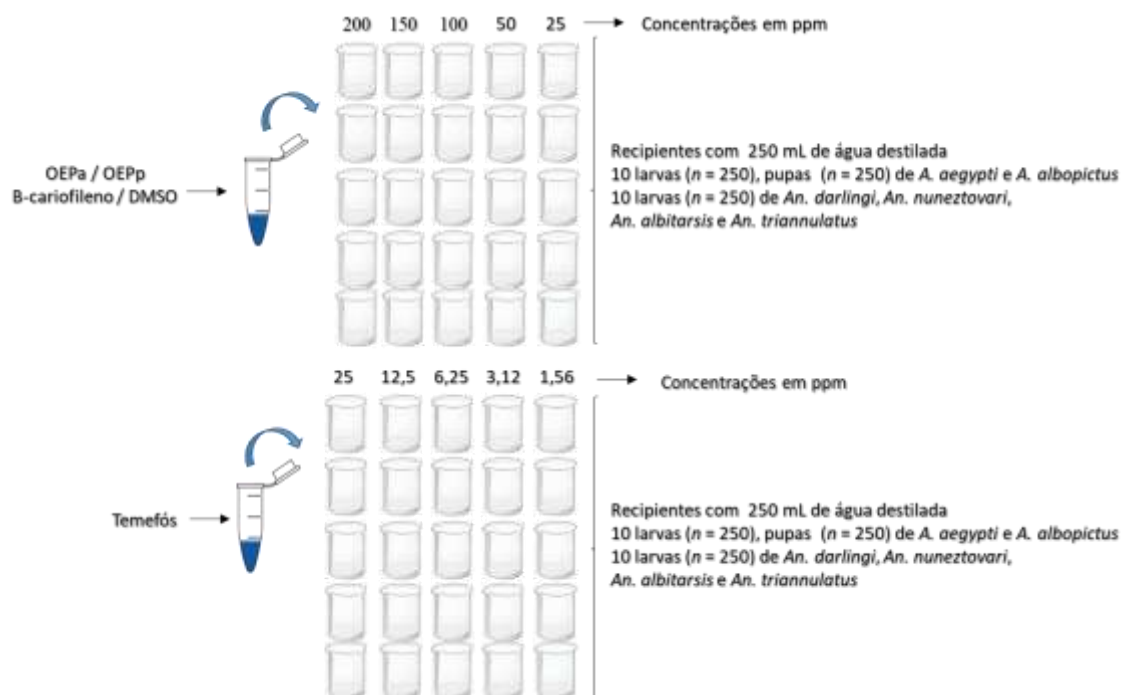
Fonte: Oliveira, A.C (2016).

3.2.9. Bioensaio de dose-resposta dos óleos essenciais e β -cariofileno

Os bioensaios larvicidas e pupicidas foram realizados conforme descrito no item 3.2.7 com algumas alterações. As soluções estoques do OEPa, OEPp e β -cariofileno foram preparadas com 26,25 mg diluídos em 1 mL de DMSO. O controle negativo (DMSO) foi preparado com 26,25 mg diluído em 1 mL de água destilada. Enquanto que o controle positivo (temefós) foi preparado com 2 mg diluído em 700 μ L de água destilada.

Grupos de 10 larvas de 3º ínstar ($n = 250$) e pupas ($n = 250$) de *A. aegypti* e *A. albopictus* e grupos de 10 larvas de 3º ínstar ($n = 250$) de *An. darlingi*, *An. nuneztovari*, *An. albitarsis* e *An. triannulatus* foram distribuídos em recipientes (300 mL) contendo 250 mL de água destilada, acrescido das concentrações de 200 a 25 ppm das soluções estoques de OEPa, OEPp, β -cariofileno e DMSO. Enquanto o controle positivo (temefós) foi avaliado nas concentrações 25 a 1,56 ppm. Os experimentos foram realizados em quintuplicata (Figura 41) e replicados cinco vezes, sendo as leituras realizadas após 24 h (WHO, 2005).

Figura 41. Bioensaio dose-resposta dos OEPA, OEPP e β -cariofileno contra imaturos de *Aedes* e *Anopheles*.



Fonte: Oliveira, A.C (2016).

3.3. Atividade dos óleos essenciais na inibição da acetilcolinesterase

A atividade dos óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi realizado na FIOCRUZ-RJ seguindo o método descrito por Ellman et al., (1961) e modificado por Rhee et al., (2001). Os testes colorimétricos *in vitro* foram realizados em microplacas de 96 poços usando enzima *Electrophorus electricus* (Gymnotidae) tipo VI (Sigma[®]) e reagentes 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), iodeto de acetilcolina e galantamina como inibidor padrão.

Nos poços das microplacas foram adicionados 25 μ L de acetilcolina 15 mM, 125 μ L de DTNB, 50 μ L de tampão Tris-HCl 50 mM com pH 8 contendo 0,1% de BSA (albumina do soro bovino) e 25 μ L dos óleos essenciais nas concentrações de 1 mg/mL⁻¹. Galantamina foi usado como inibidor padrão, enquanto metanol e Tris-HCl foram usados como controles. A absorbância foi medida cinco vezes no comprimento de 405 nm utilizando leitor de microplacas Thermoplate[®] (modelo TP-reader) nos intervalos de 15s, após essas leituras foram adicionadas nos poços 25 μ L de acetilcolinesterase 0,22 U mL⁻¹. As absorbâncias foram novamente medidas (nove vezes) com intervalos de 15s. Os ensaios foram realizados em quintuplicata. As curvas de regressão não linear (0,31 a 10 μ g/mL)

foram transformadas e normalizadas para obtenção da concentração inibitória mediana (CI₅₀) usando o programa Graphic Prism 6.0 com $p < 0,05$ de significância.

3.4. Ensaios antimicrobianos

3.4.1. Reativação das cepas

Os bioensaios antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia (LABMICRA), coordenado pela Dr. Antônia Queiroz Lima e Souza e realizados pela aluna Sarah Raquel Silveira da Silva. Os microrganismos testados foram cepas da coleção Cefar Diagnóstica (CCCD): *Staphylococcus aureus* (Sa), *Escherichia coli* (Ec), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Enterococcus faecalis* (Ef), *Candida albicans* (Ca), *C. tropicalis* (Ct). As bactérias foram reativadas em *Mueller Hinton* (MH) ágar (HIMEDIA®) e as leveduras em *Sabouraud* (SB) ágar (HIMEDIA®), e mantidas a 36 ± 1 °C por 24 e 48 h, respectivamente. Após a reativação dos patógenos em caldo MH para bactérias, e caldo SB para levedura, ambos foram posteriormente incubados a 35°C por 24 h. A concentração de colônias utilizada no teste foi correspondente a 10^7 UFC.mL⁻¹ para bactérias e 2×10^5 UFC.mL⁻¹ para levedura de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002; 2003).

3.4.2. Preparo das amostras

Os OEs de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* foram pesados e solubilizados na concentração de 2 mg/mL (solução mãe) em Dimetilsufóxido (DMSO) 10 % e água destilada autoclavada 90 %. O controle negativo foi realizado com a substituição das amostras pela mesma solução que as amostras foram solubilizadas, DMSO (10%). O controle positivo foi realizado substituindo as amostras por antibióticos na concentração da solução mãe de 2 mg/mL sendo administrado tetraciclina para *E. coli* e *P. aeruginosa*, ampicilina para *S. aureus* e *E. faecalis*, e fluconazol para *C. albicans* e *C. tropicalis*.

3.4.3. Determinação da atividade antimicrobiana

Realizou-se uma triagem (screening) das amostras em microplaca de 96 poços, onde em triplicata, adicionou-se 100 µL do meio de cultura em caldo na concentração dobrada (2x), conforme citado no item 3.4.2. Em sequência, adicionou-se 100 µL da solução mãe da amostra (2 mg/mL) e 10µL da suspensão de células do patógeno. Por fim, os ensaios foram incubados a 35 °C por 24 h. Após 24 h foi adicionado 10 µL do revelador TTC

(2,3,5-cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio) a 2% nos poços com inóculo bacteriano. Havendo crescimento microbiano, o revelador muda a cor da solução para a cor rósea.

Após os resultados positivos do screening, realizou-se o teste de diluições sucessivas para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), onde em cada triplicata (A1, A2, A3) foram adicionadas a placa de Elisa, 100 µL da amostra nos primeiros poços e 100 µL do meio de cultura duplicado (2x.) O primeiro poço foi homogeneizado com a própria pipeta e desse retirou-se 100 µL e inseriu-se no poço seguinte (B1, B2, B3) realizando sucessivamente as diluições em cada poço (Tabela 1). Os controles positivo e negativo também foram realizados nessas condições.

Acrescentou-se em todos os poços 10 µL do patógeno nas concentrações de células citadas no item 3.4.1 O experimento foi incubado a 35 °C por 24 h. Após 24 h colocou-se 10 µL do revelador. Como contra prova, plaqueou-se 10 µL do experimento em meio sólido somente para aqueles que mostraram notoriamente a ausência de crescimento microbiano.

Tabela 1. Delineamento diluições das concentrações dos óleos essenciais.

Poços	Concentração
A ○○○	1 mg/mL = 1000 µg/mL
B ○○○	0,5 mg/mL = 500 µg/mL
C ○○○	0,25 mg/mL = 250 µg/mL
D ○○○	0,125 mg/mL = 125 µg/mL
E ○○○	0,0625 mg/mL = 62,5 µg/mL
F ○○○	0,03125 mg/mL = 31,25 µg/mL
G ○○○	0,015625 mg/mL = 15,62 µg/mL
H ○○○	0,0078125 mg/mL = 7,81 µg/mL

3.5. Toxicidade dos óleos essenciais e β-cariofileno contra *Artemia salina*

A identificação e compreensão da toxicidade de extratos, óleos essenciais ou substâncias ativas contra organismos aquáticos não-alvo são fatores necessários para o monitoramento da toxicidade e elaboração de estratégias de aplicação desses derivados botânicos, em campo, com o objetivo de controlar a população dos mosquitos vetores sem causar a morte de organismos não-alvos (Santos, 2014). Diante disso, foi realizado teste de toxicidade dos OEPA, OEPp e β-cariofileno contra o crustáceo da espécie *Artemia salina* (Artemiidae) devido à alta sensibilidade desse invertebrado em detectar alterações no meio

ambiente aquático. O teste foi realizado seguindo o método descrito por Meyer et al., (1982) com modificações. Inicialmente, foi utilizado recipiente retangular de vidro (dimensões de 4,9 x 15,1 x 10,4 cm) contendo solução salina constituída de sal marinho na concentração de 30 g/L⁻¹ e pH entre 8 e 9 ajustado por intermédio de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) na concentração de 0,1 mol L⁻¹. Em seguida, ovos de *A. salina* foram adicionados ao recipiente contendo a solução salina para eclosão por um período de 48 h com constante aeração e temperatura controlada (25°C) (Figura 42A).

Terminado as 48 h, grupos de 10 larvas foram transferidas para tubos de ensaio (Figura 42B) contendo 34 mL da solução salina. Os OEPa, OEPp e β -cariofileno foram avaliados nas concentrações de 10, 100, 500, 1000 e 1500 ppm, previamente solubilizados com 1 mL de DMSO. O controle negativo (DMSO) foi testado nessas mesmas concentrações, enquanto que o temefós (controle positivo) foi avaliado nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 ppm. Os testes foram realizados em triplicata, com a contagem dos crustáceos mortos realizada após 24 h do início do experimento, seguido da determinação da concentração letal mediana para matar 50% das larvas (CL₅₀) com intervalos de confiança de 95% (IC95%) estimada pela análise de Probit usando o programa POLOPLUS. A toxicidade foi classificada como atóxica quando CL₅₀ > 1000 µg/mL, baixa quando a CL₅₀ > 500 µg/mL, moderada quando o valor de CL₅₀ variou entre 100 a 500 ppm e alta quando o valor da CL₅₀ < 100 ppm.

Figura 42. Recipiente para desenvolvimento de larvas de *A. salina*.

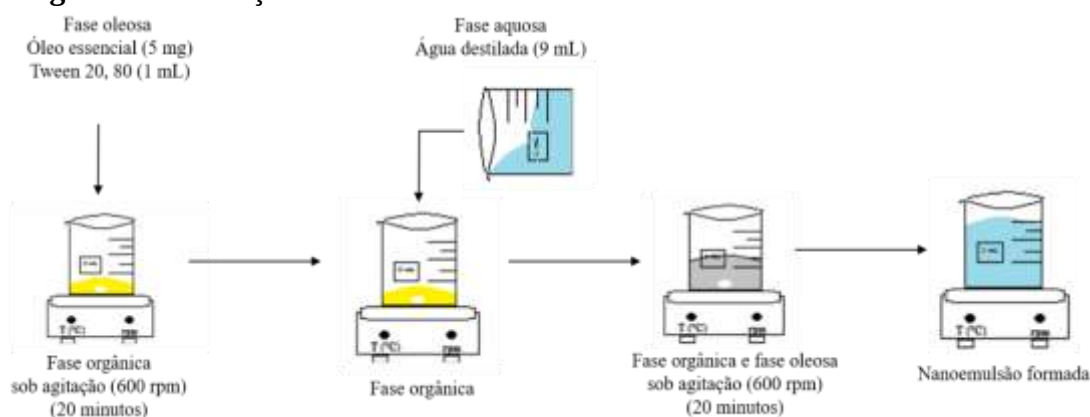


Fonte: Santos, E.F (2019).

3.6. Sínteses das nanoemulsões carregadas com óleos essenciais

As nanoemulsões carregadas com os óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* (NEPa) e *P. purusanum* (NEPp) foram sintetizadas separadamente de acordo com o método descrito por Osanloo et al., (2017), com algumas modificações. Os dois nanosistemas foram sintetizados com 1 mL de Tween 20 (e outro com Tween 80), aos quais foram adicionados 5 mg dos óleos essenciais das espécies vegetais, homogeneizados durante 20 min a 600 rpm. Em seguida, 9 mL de água destilada (fase aquosa) foi vertido cuidadosamente na fase orgânica de cada nanosistema e mantida agitação constante por mais 20 min. O controle negativo (NEBr) foi desenvolvido com 1 mL de Tween 20, 80 e 9 mL de água destilada. As sínteses foram realizadas em triplicata em temperatura ambiente de 25 ± 2 °C (Figura 43) (Deposito de patente em anexo).

Figura 43. Ilustração da síntese das nanoemulsões carregadas com óleos essenciais.



Fonte: Oliveira, A.C (2019).

3.6.1. Determinação de tamanho de partícula e índice de polidispersão

Os tamanhos médios das nanopartículas e os índices de polidispersão foram medidos por Espectroscopia de Correlação de Fótons, usando um Zetasizer (MALVERN, UK). As nanoemulsões foram diluídas apropriadamente em água destilada e agitadas em ultrassom por 5 min, antes de fazer a medição. Foi utilizado um comprimento de onda do laser de 633 nm, com ângulo de espalhamento 173° graus e temperatura a 25°C.

O potencial Zeta (ζ) e a condutividade também foram medidos em aparelho Zetasizer (MALVERN, UK). As amostras foram dissolvidas em água destilada nas mesmas proporções usadas para a determinação de tamanho. O ensaio foi feito a 25°C, usando uma voltagem de 150V. As medidas foram feitas em triplicata (Rafael et al., 2017).

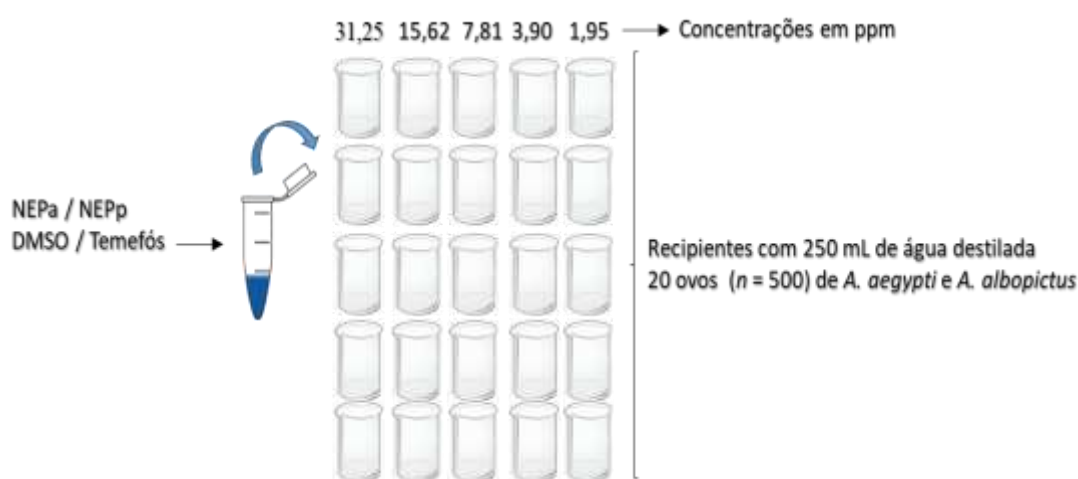
3.6.2. Morfologia das nanoemulsões

A análise topográfica em 2D e 3D dos nanosistemas foram realizadas em equipamento Shimadzu (modelo SPM-9700) nas seguintes condições de operação: leitura: modo contato; taxa de digitação: 0,60 Hz; resolução: 512 x 512 e 2048 x 2048 pixels; área de análise: 20 x 20 μm^2 ; ganho de: 1200,000; ponto de operação: 1,0 V; Software de tratamento de imagem: Gwyddion (64 bits) e Software de tratamento de dados: Shimadzu (Mao et al., 2009).

3.6.3. Atividade ovicida das nanoemulsões

A atividade ovicida das nanoemulsões foram avaliadas seguindo o método descrito no item 3.2.8. As soluções estoques foram preparadas com 18 mg de NEPa, NEPp, NEBr e temefós diluídas em 1 mL de água destilada. Grupos de 20 ovos ($n = 500$) de *A. aegypti* e *A. albopictus* foram distribuídos em recipientes plásticos (300 mL). Em seguida, as concentrações de 31,25 a 1,95 ppm obtidas das soluções estoques foram pipetados sob os ovos. Decorridos 24 h, foram acrescentados 250 mL de água destilada aos recipientes (Figura 44). Os experimentos foram realizados em quintuplicata com cinco repetições em temperatura de $22,6 \pm 3^\circ\text{C}$ e 81% de umidade (Reegan et al., 2014).

Figura 44. Ilustração do bioensaio ovicida das nanoemulsões contra ovos de *A. aegypti* e *A. albopictus*.



Fonte: Oliveira, A.C (2019).

3.6.4. Atividade larvicida e pupicida das nanoemulsões

Os bioensaios larvicidas e pupicidas foram realizados conforme descrito no item 3.2.9 com algumas alterações. As amostras NEPa, NEPp, NEBr e temefós foram avaliadas

nas concentrações de 1,5 a 25 ppm. Em cada amostra, grupos de 10 larvas de 3º ínstar ($n = 250$) e pupas ($n = 250$) de *A. aegypti* e *A. albopictus* e grupos de 10 larvas de 3º ínstar ($n = 250$) de *An. darlingi*, *An. nuneztovari*, *An. albitarsis* e *An. triannulatus* foram distribuídos em recipientes (300 mL) contendo 250 mL de água destilada. Os experimentos foram realizados em quintuplicata (Figura 45) e replicados cinco vezes com registros de mortes após 24 h de experimento (WHO, 2005).

Figura 45. Ilustração dos bioensaios de dose-resposta contra larvas e pupas de *Aedes* e *Anopheles*.



Fonte: Oliveira, A.C (2019).

3.6.5. Avaliação do efeito residual

O efeito residual é a característica que os defensivos biológicos ou químicos têm em manter-se ativo por um determinado período. A identificação do tempo de ação residual e percentual de letalidade, permitem que o tempo entre uma aplicação e outra do defensivo seja mais amplo, isso reduz os custos de produção, além de reduzir os riscos da resistência (WHO, 2016).

As avaliações dos efeitos residuais das amostras OEPa, OEPp, NEPa e NEPp foram realizados utilizando o método de renovação de água descritos por Tadei et al., (2002) e José et al., (2005) com algumas adaptações. Os bioensaios foram realizados simultaneamente em condições de laboratório. Para cada amostra foram utilizados três recipientes plásticos (300 mL) contendo 150 mL de água de torneira, aos quais foram adicionadas grupos de 10 larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* ($n = 30$). Em seguida, foram acrescidas as concentrações letais larvicidas (CL_{50}) das amostras OEPa, OEPp, NEPa e NEPp.

A cada 24 h, a água nos recipientes foi removida mantendo o volume residual sempre em 50 mL, as larvas mortas e vivas expostas foram registradas (indicador de efeito

residual). Em seguida, foram acrescidos mais 100 mL de água e 10 larvas ($n = 30$). A cada período de 48 h, as incidências ou efeito residual das amostras foram obtidos das médias das larvas mortas durante esse período usando a fórmula a seguir: Efeito residual = Número de larvas mortas / número de larvas expostas x 100.

3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises das comparações dos teores de umidades e rendimento dos óleos essenciais foram realizadas pelo teste t pareado ($t < 0,05$). A análise de regressão linear ($r^2 < 0,05$) foi aplicado para identificar a relação entre o tempo de extração e volumes dos óleos essenciais. ANOVA e teste Tukey ($p < 0,05$) foi aplicada para analisar os percentuais de atividade biológica dos OEs e nanoemulsões, além das comparações entre as concentrações letais (CL). Para as análises descritas acima, foi utilizado o programa GraphPad Prism 6.0. As concentrações letais (CL) que causaram 50 e 90% de mortalidade das larvas e pupas com intervalo de confiança de 95% (IC95%) foram estimados pelo método de Probit, sendo utilizado o programa PoloPlus versão 1.0 (Robertson et al. 2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Material vegetal do gênero *Piper*

As amostras de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* foram identificadas pela curadora botânica Dra. Maria Rosalva da Costa Bilby. As exsicatas foram depositadas no Herbário da Universidade Federal do Amazonas com os respectivos registros HUAM n° 44126 e HUAM n° 11425. Além disso, amostras também foram encaminhadas ao Herbário Virtual de Flora e Fungos localizado no INPA e comparadas com as exsicatas de *P. alatipetiolatum* (n° 42,264, n° 34,659) e *P. purusanum* (n° 224,490, n° 274,482, n° 107,549, n° 188,202, n° 210,557 e n° 227,548) (Reegan et al., 2014).

As espécies vegetais estão regularmente registradas no Sistema Nacional de Patrimônio Genético e Gestão do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o cadastro n° ADC693C (Figura 46).

Figura 46. Certidão do cadastro no SisGen.

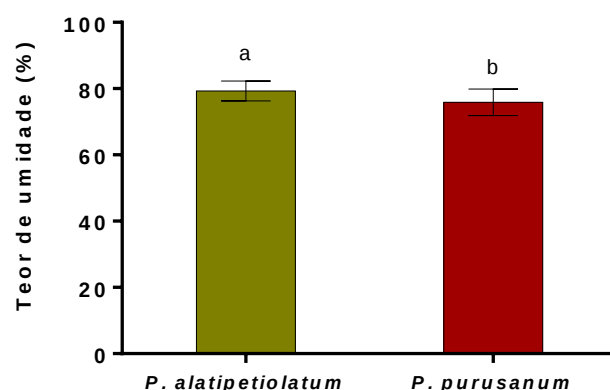


Fonte: SisGen.com.br (2019).

4.1.2. Teor de umidade e extração dos óleos essenciais

A desidratação das espécies vegetais em temperatura ambiente de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ permitiu o registro da massa seca de $5,15 \pm 0,7$ g e $79,3 \pm 2,0\%$ do teor umidade de *P. alatipetiolatum*. Enquanto que a massa seca registrada na espécie *P. purusanum* foi de $4,15 \pm 0,4$ g, com teor de umidade de $75,9 \pm 4,0\%$ (Figura 47). Esses resultados corroboram com os registros de Assis, (2012) e Rolfs et al., (2012) que demonstraram que amostras vegetais desidratadas em temperaturas entre 20 a 27°C variaram entre 60 a 82,34% nos teores de umidade.

Figura 47. Comparação entre os teores de umidade de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* desidratadas em temperatura ambiente de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.



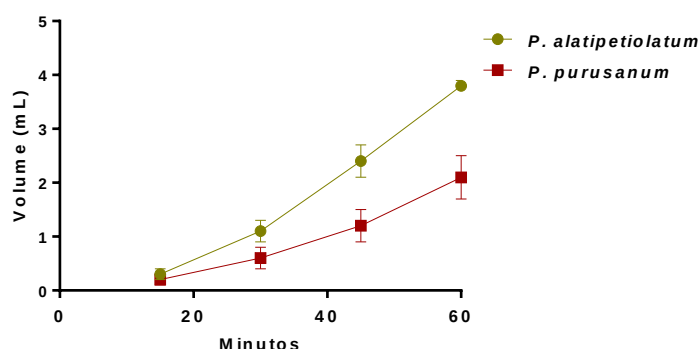
Fonte: Oliveira, A.C (2017).

De acordo com Gasparin et al., (2017), o tempo de secagem e o teor de umidade das plantas são fatores afetados pelas condições ambientais do local de coleta da planta, índice pluviométrico, luz natural, temperatura, umidade, constituição química e física do

solo, além das características individuais de cada planta que podem fazê-las reter mais água. A importância da desidratação é devido ao fato de que após as coletas, os vegetais não paralisam totalmente a atividade metabólica, podendo ocorrer a oxidação pela ação de enzimas oxirredutoras, afetando a qualidade do produto de interesse (óleo essencial). Assim, a desidratação permite a preservação do perfil químico da amostra (Girard, 2007; Rolfs et al., 2012; Gouvea, 2013).

Os volumes e rendimentos dos óleos essenciais extraídos de 50 g das folhas de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* são demonstrados nas figuras 48 e 49, respectivamente. Verificou-se que o volume final de $3,8 \pm 0,1$ mL e rendimento de $7,6 \pm 0,3$ do OE extraído de *P. alatipetiolatum* foram superiores ($p < 0,05$) ao volume final de $2,1 \pm 0,4$ mL e rendimento de $4,2 \pm 0,7\%$ do óleo essencial extraído de *P. purusanum*. Ademais, os volumes e rendimentos foram consequentemente influenciados pelo tempo de extração ($r^2 = 0,986$). As características físico-químicas dos OEs são demonstradas na tabela 2.

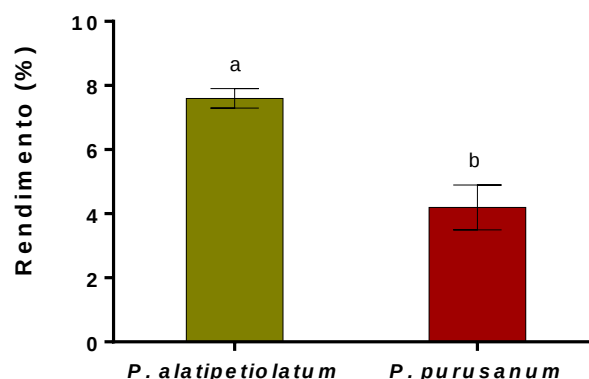
Figura 48. Relação entre o tempo de extração e volumes dos óleos essenciais.



Fonte: Oliveira, A.C (2017).

A relação entre tempo de extração, volume do óleo e rendimento também foram reportados por Conde-hernández et al., (2017) ao identificar que o rendimento do OE extraído de 100 g das folhas de *P. auritum* (Piperaceae) durante 30 min foi de 2,37% e ao final de 2 h aumentou para 3,09% ($r^2 = 0,996$), enquanto o rendimento de OE das folhas de *Porophyllum ruderale* (Asteraceae) variou de 0,82% (30 min) para 1,35% (2 h) ($r^2 = 0,999$). A compreensão dessa relação permite a quantificação adequada do óleo essencial para cada espécie vegetal, considerando a massa usada na extração, além disso, os fatores sazonais do local de coleta e característica individual da planta também devem ser levados em consideração (Fornari et al., 2012; Conde-Hernández et al., 2014).

Figura 49. Comparação entre os rendimentos obtidos dos óleos essenciais extraídos das folhas de *P. alatifolium* e *P. purusum*.



Fonte: Oliveira, A.C (2017).

Em outras espécies de *Piper* e outros gêneros os rendimentos foram inferiores aos registrados em *P. alatifolium* e *P. purusum*. Da Silva et al., (2014) reportaram rendimentos de 0,8, 0,6 e 1% obtidos dos óleos essenciais extraídos de 100 g das folhas das espécies *P. aleyreanum*, *P. anonifolium* e *P. hispidum* (Piperaceae) durante 3 h de extrações. Ali et al., (2015) identificaram variações nos rendimentos de 1,52 a 2,02%, 0,001 a 0,082% e 0,032 a 0,12% dos óleos essenciais extraídos de 100 g das folhas, galhos e raízes de *Thymus algeriensis* (Lamiaceae) entre 2 e 4 h de extrações.

Segundo Andrade et al., (2011), Oliveira et al., (2016) e Alencar Filho et al., (2017), a idade e genética do vegetal, sazonalidade das chuvas, predação por herbívoros, qualidade do solo, temperatura e luminosidade são alguns dos fatores que influenciam na produção dos óleos essenciais. Esses fatores poderiam explicar as diferenças registradas nos óleos essenciais das espécies de piperáceas desse estudo.

Tabela 2. Características físico-química dos óleos essenciais.

Amostra	Aspecto	pH	Densidade (g/cm ³)	Índice de refração
OEPa	incolor	4,5 ± 0,0	0,921	1,575
OEPPa	incolor	5,3 ± 1,9	0,974	1,941

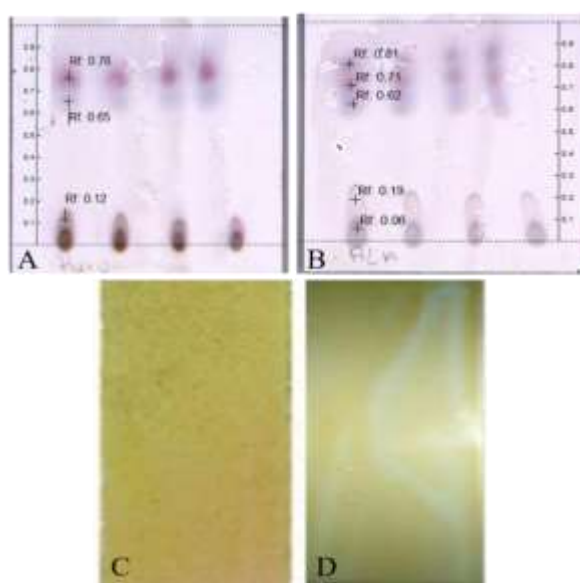
OEPa. Óleo essencial de *P. alatifolium*. OEPPa. Óleo essencial de *P. purusum*.

4.1.3. Perfis químicos dos óleos essenciais

Diferentes sistemas de solventes e reveladores foram usados para as identificações dos perfis químicos dos óleos essenciais de *P. alatifolium* e *P. purusum* através do método de (CCD). As placas eluídas no sistema hexano/acetato de etila (9:1) reveladas com

vanilina sulfúrica permitiram a visualização de três manchas no óleo essencial de *P. purusanum* com Rf de 0,12, 0,65 e 0,76 (Figura 50A). Enquanto no óleo essencial de *P. alatipetiolatum* foram observadas cinco manchas com fator de detenção de 0,06, 0,19, 0,62, 0,71 e 0,81 (Figura 50B). As manchas roxo/lilás são indicativos de que os perfis químicos dos óleos essenciais são de natureza terpênica (Alexandre et al., 2017). Nas placas reveladas com Dragendorff e cloreto férrico (FeCl₃) não foram identificadas manchas (figuras 50C e D).

Figura 50. Placas de CCD com amostras dos óleos essenciais de *Piper alatipetiolatum* e *Piper purusanum* reveladas com diferentes reveladores: (A) vanilina sulfúrica, (B) vanilina sulfúrica, (C) Dragendorff e (D) cloreto férrico (FeCl₃).



Fonte: Oliveira, A.C (2017).

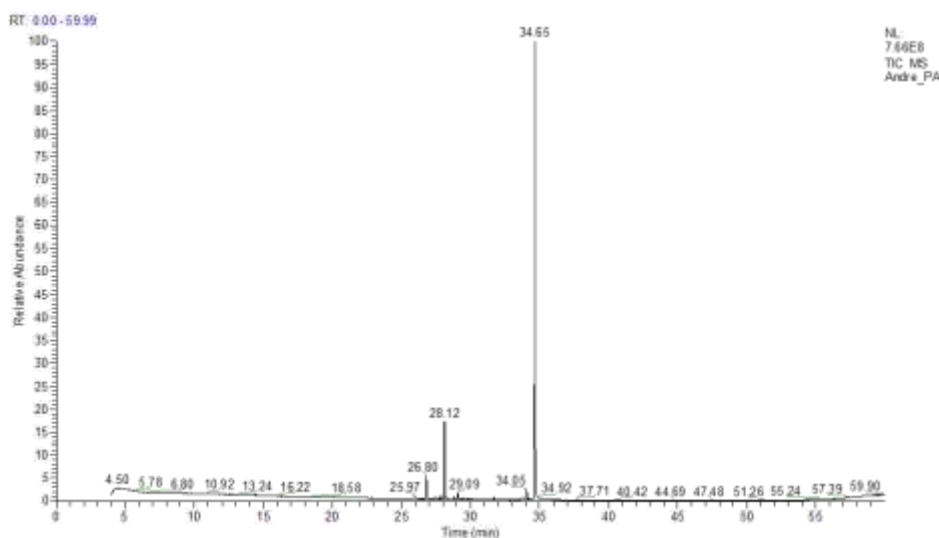
4.1.4. Constituintes químicos do óleo essencial de *Piper alatipetiolatum*

O cromatograma do óleo essencial de *P. alatipetiolatum* é demonstrado na figura 51. Os constituintes químicos são demonstrados na tabela 3. Ao total, 100% das substâncias do óleo essencial foram identificadas e classificadas como sesquiterpenos (50%) e sesquiterpenos oxigenados (50%). As principais substâncias foram ishwarona (78,58%), ishwarol (8,2%), β -elemeno (6,87%), selin-11-en-4 α -ol (2,88%) e ishwarano (2,36%). Essas substâncias foram previamente identificadas no óleo essencial de *P. alatipetiolatum* por Andrade et al., (2009), sendo a ishwarona também identificada como o componente principal, seguida de ishwarol e ishwarano. A primeira identificação de ishwarona isolado da espécie *Aristolochia indica* (Aristolochiaceae) ocorreu por RMN em 1935 (Ganguly et

al., 1969), Posteriormente, essa substância, além de ishwarol e ishwarano classificados como raros sesquiterpenos também foram identificados by ^{13}C RMN por Grob et al., (1984), Gupta et al., (1997), Casanova et al., (2005) e Lago et al., (2007). Ishwarona (2,8%) foi uma das substâncias majoritárias identificadas no óleo essencial de *A. indica* (Shafi et al., 2002). Enquanto ishwarona (0,2 a 2%) foi descrito como substância incomum no óleo essencial extraídos das partes aéreas de *Monanthotaxis capea* (Annonaceae) (Mevy et al., 2004). Além do mais, os percentuais de ishwarona identificados nesses óleos essenciais foram inferiores ao reportado em nosso estudo com óleo essencial de *P. alatifoliatum*.

A variabilidade na composição química no OE de espécies de *Piper* coletadas no Estado do Amazonas, também foram registradas em *P. marginatum* (Andrade et al., 2008), *P. aduncum* (Almeida et al., 2009), *P. dilatatum* (Andrade et al., 2011). Amostras dos OEs de *P. obliquum* e *P. aduncum* (Piperaceae) coletadas no Panamá foram caracterizadas principalmente com 27 e 40% de β -cariofileno, enquanto as espécies coletadas no Equador apresentaram safrol (45,86%) e dilapiol (90%) (Guerrini et al., 2009).

Figura 51. Cromatograma do óleo essencial de *Piper alatifoliatum*.



Fonte: Oliveira, A.C (2017).

A análise GC-FID realizada pela coluna apolar mostrou um valor de RI de 1680, consistente com valor encontrado para o sesquiterpeno ishwarona em Adams, (2017). Entretanto, não encontramos dados de IR em coluna polar para esse sesquiterpeno, bem como dados de espectros de massas em bibliotecas NIST ou Adams. Considerando a ausência desses dados, foi realizada a análise óleo essencial por ^{13}C RMN (espectro anexado), que indicou que se trata de uma mistura de ishwarone e um composto menor,

identificado como ishwarol B (Artigo anexado). Esses dados também diferem qualitativa e quantitativamente da composição química relatada por Araújo et al., (2019), que identificaram monoterpenos (50,55%), sesquiterpenes (45,69%) e linalol (43,88%), β -cariofileno (16,11%), α -pineno (2,56%), α -terpineol, α -humuleno (2,99%), germacreno D (5,79%), α -cadinol (2,40%), óxido de cariofileno (2,73%), (*E*)-nerolidol (2,71%), viridiflorene (3,40%), β -selineno (2,62%) e selin-11-en-4 α -ol (1,38%) como principais compostos em óleo essencial de *P. alatipetiolatum* obtido no Estado do Amazonas. Entretanto, neste trabalho, a análise em duas colunas capilares de diferentes polaridades, onde a separação na coluna polar foi muito mais eficaz, bem como a análise do espectro ^{13}C NMR possibilitou resultados mais precisos com a mistura Ishwarone/Ishwarol, confirmando os dados indicados por Andrade et al (2009).

Tabela 3. Substâncias identificadas no óleo essencial de *Piper alatipetiolatum*.

Nº	Substância	RI ^{DBa}	RI ^{innowax-20b}	Área (%)	Identificação
1	β -elemeno	1390	1595	6.87	MS, RI
2	β -Longipineno	1400	1627	0.83	MS, RI
3	Ishwarane	1468	1644	2.36	MS, RI
4	Selin-11-en-4 α -ol	1660	2211	2.88	MS, RI
5	Ishwarone	1680	2239	78.58	MS, RI, NMR ^{13}C
6	Ishwarol	1691	2331	8.2	NMR ^{13}C
Sesquiterpenes (%)					67
Sesquiterpenos oxigenados (%)					33
Substâncias identificadas (%)					100

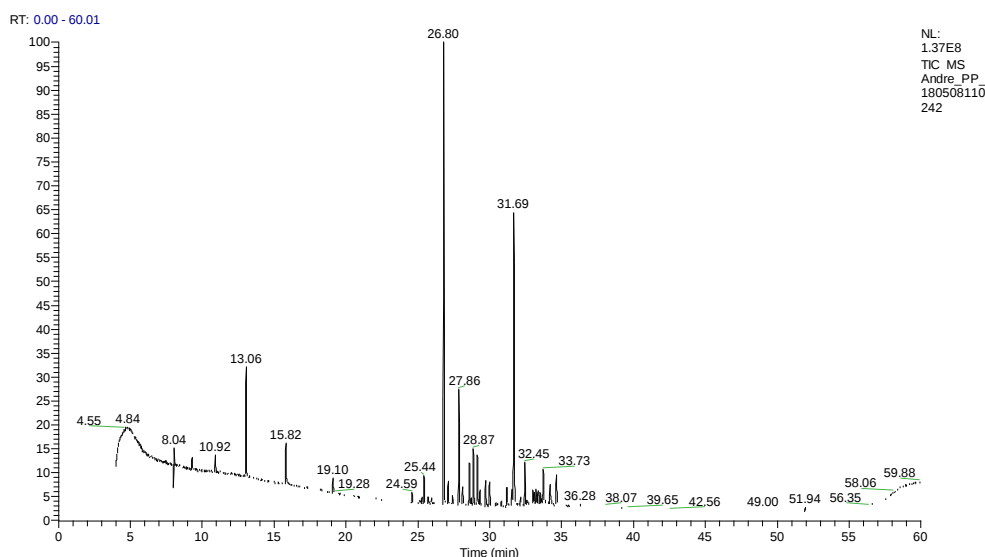
^aRI – Índice de retenção em coluna apolar calibrada com *n*-alcanos. ^bRI - Índice de retenção em coluna polar calibrada com *n*-alcanos. MS – Espectro de massas.

Em OEs de outras espécies de *Piper*, os percentuais de sesquiterpenos variaram entre 70 a 80% e os rendimentos dos OEs variaram entre 1 a 3% (Bajpai et al., 2013; Sperotto et al., 2013; Bosquiroli et al., 2015; Ventorim et al., 2016). Ademais, no OE de *P. anonifolium* o percentual da substância selin-11-en-4 α -ol (20,08%) foi significativamente maior em comparação ao OE de *P. alatipetiolatum* (da Silva et al., 2014b). Selin-11-en-4 α -ol (43,4%) foi o composto majoritário identificado no OE extraído das flores de *Pluchea carolinensis* (Asteraceae) com atividade inseticida (Taylor et al., 2009). Entretanto, em estudo posterior, foram identificados os percentuais de 17,7% nas flores e 34,4% nas folhas (Kerdudo et al., 2016).

4.1.5. Constituintes químicos do óleo essencial de *Piper purusenum*

Na figura 52 é demonstrado o cromatograma contendo os tempos de retenções das 13 substâncias caracterizadas no óleo essencial de *P. purusenum*. Linalol (0,52%) e α -terpineol (1,54%) pertencem a classe de monoterpenos oxigenados e representam 15,3% do OE. Enquanto 53,8% do OE foi constituído por sesquiterpenos, correspondendo as substâncias β -cariofileno (57,05%), α -humuleno (14,50%), γ -muuroleno (0,60%), germacreno D (8,20%), β -selineno (2,10%), α -selineno (4,42%) e δ -cadineno (2,04%). As substâncias *E*-nerolidol (4,23%), óxido de cariofileno (3,46%), eudesmol (0,84%) e cariofileno (*Z*) (0,61%) representam 30,7% dos sesquiterpenos oxigenados (Tabela 4). Ao total, 94% do óleo essencial foi identificado.

Figura 52. Cromatograma do óleo essencial de *Piper purusenum*.



Fonte: Oliveira, A.C (2017).

Em estudos anteriores, perfis químicos similares ao OE de *P. purusenum* foram identificados nas espécies *P. aleyreanum*, *P. anonifolium* e *P. hispidum* (Piperaceae) coletadas em diferentes localidades do estado do Pará, das quais os OEs extraídos das folhas foram majoritariamente constituídos por sesquiterpenos variando de 68,8 a 79,8%, enquanto os percentuais de monoterpenos foram de 10,1 a 19,5%. Além disso, as principais substâncias identificadas no OE de *P. aleyreanum* foram β -elemeno (16,3%), biciclogermacreno (9,2%), δ -elemeno (8,2%), germacreno D (6,9%), β -cariofileno (6,2%) e espatuneol (5,2%), ao mesmo tempo em que β -selineno (12,7%), α -selineno (11,9%) e α -pineno (8,8%) foram identificadas no OE de *P. anonifolium*. Enquanto β -cariofileno (10,5%), α -humuleno (9,5%), δ -3-careno (9,1%), α -capoen (7,3%), limoneno (6,9%),

óxido de cariofileno (5,9%) e β -selineno (5,1%) foram identificados no OE de *P. hispidum* (da Silva et al., 2014).

Tabela 4. Substâncias identificadas no óleo essencial de *Piper purusanum*.

Nº	Substância	RI ^{DB5a}	RI ^{innowax-20b}	Identificação	Área (%)
1	Linalol	1095	1555	RI, MS	0.52
2	α -terpineol	1186	1656	RI, MS	1.54
3	β -cariofileno	1419	1638	RI, MS	57.05
4	α -Humuleno	1454	1680	RI, MS	14.50
5	γ -Muuroleno	1479	1690	RI, MS	0.60
6	Germacreno D	1481	1708	RI, MS	8.20
7	β -Selineno	1490	1715	RI, MS	2.10
8	α -Selineno	1498	1750	RI, MS	4.42
9	δ -Cadineno	1523	1772	RI, MS	2.04
10	<i>E</i> -Nerolidol	1563	2033	RI, MS	4.23
11	Óxido de cariofileno	1583	2036	RI, MS	3.46
12	Eudesmol	1662	2203	RI, MS	0.84
Monoterpeno oxigenado					15,3%
Sesquiterpeno					53,8%
Sesquiterpeno oxigenado					30,7%
Substâncias identificadas					94%

^aRI – Índice de retenção em coluna apolar calibrada com *n*-alcanos. ^bRI - Índice de retenção em coluna polar calibrada com *n*-alcanos. MS – Espectro de massas.

4.2. Estudo dos vetores *Aedes* e *Anopheles*

4.2.2. Resultados seletivos dos óleos essenciais contra ovos do gênero *Aedes*

Os OEPa e OEPp avaliados nas concentrações de 31,25 a 500 ppm ($p > 0,05$) apresentaram 100% de atividade contra os ovos de *A. aegypti* e *A. albopictus*. Em adição, temefós também demonstrou 100% de atividade contra ovos desses vetores nas concentrações de 62,50 a 500 ppm ($p > 0,05$). Ao mesmo tempo em que DMSO não apresentou atividade (dados não demonstrados) (Tabela 5). Assim, é caracterizada que a inibição da eclosão dos ovos ocorreu pela ação dos óleos essenciais. Além de quê, o percentual de 100% de atividade ocorrida em 31,25 ppm, justificaram o critério da escolha dessa concentração para a realização dos bioensaios de dose-resposta ovicida de acordo com o protocolo da WHO, (2005).

Tabela 5. Percentuais das inibições dos ovos de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* tratados com óleos essenciais.

ppm	<i>A. aegypti</i>		<i>A. albopictus</i>		Temefós	
	OEPa	OEPp	OEPa	OEPp	<i>A. aegypti</i>	<i>A. albopictus</i>
31,25	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	48,7 ± 2,1 ^b	59 ± 0,0 ^e
62,50	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a
125	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a
250	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a
500	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a

Os resultados são demonstrados em média (%) ± desvio padrão. Letras na mesma linha indicam diferença estatística (ANOVA two-way e Tukey $p \leq 0,05$). OEPa – óleo essencial de *P. alatipetiolatum*. OEPp – óleo essencial de *P. purusanum*.

4.2.3. Resultados seletivos dos óleos essenciais contra larvas e pupas do gênero *Aedes*

Os OEPa e OEPp avaliados nas concentrações de 250 e 500 ppm ($p > 0,05$) mataram 100% das larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus*, enquanto diferenças significativas nos percentuais de mortalidades foram registradas entre as concentrações de 31,25 a 125 ppm ($p < 0,05$). Temefós matou 100% das larvas em todas as concentrações ($p > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Percentuais de mortes das larvas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* tratadas os OEPA e OEPp.

ppm	<i>A. aegypti</i>		<i>A. albopictus</i>		Temefós	
	OEPA	OEPp	OEPA	OEPp	<i>A. aegypti</i>	<i>A. albopictus</i>
31,25	31,0 ± 2,6 ^a	23,3 ± 2,1 ^b	31,3 ± 2,5 ^a	13,3 ± 2,1 ^c	100 ± 0,0 ^d	100 ± 0,0 ^d
62,50	45,3 ± 0,6 ^a	42 ± 3,6 ^b	46,7 ± 2,1 ^c	32,3 ± 2,1 ^d	100 ± 0,0 ^e	100 ± 0,0 ^e
125	66,7 ± 3,1 ^a	63,7 ± 2,5 ^b	57 ± 2,6 ^c	42,3 ± 3,2 ^d	100 ± 0,0 ^e	100 ± 0,0 ^e
250	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a
500	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a

Os resultados são demonstrados em média (%) ± desvio padrão. Letras na mesma linha indicam diferença estatística (ANOVA two-way e Tukey $p \leq 0,05$).

Contra pupas de *A. aegypti* e *A. albopictus*, 100% de mortes também ocorreram nas concentrações de 250 e 500 ppm ($p > 0,05$) dos OEPA e OEPp. Em comparação ao temefós, que causou 100% de mortes em todas as concentrações ($p > 0,05$) (Tabela 7). Não houve mortes no controle negativo (dados não demonstrados). De acordo com os critérios da WHO, (2005) para a realização de estudos de dose-resposta, a concentração de 250 ppm foi identificada para a realização desse teste.

Tabela 7. Percentuais de mortes das pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* tratadas os OEPA e OEPp.

ppm	<i>A. aegypti</i>		<i>A. albopictus</i>		Temefós	
	OEPA	OEPp	OEPA	OEPp	<i>A. aegypti</i>	<i>A. albopictus</i>
31,25	8,3 ± 1,2 ^a	6,7 ± 1,2 ^b	11,7 ± 1,5 ^c	11,0 ± 1,7 ^d	100 ± 0,0 ^e	100 ± 0,0 ^e
62,50	24,7 ± 1,2 ^a	20,3 ± 3,2 ^b	29,3 ± 1,5 ^c	22,0 ± 2,6 ^d	100 ± 0,0 ^e	100 ± 0,0 ^e
125	31,7 ± 2,5 ^a	38,9 ± 2,5 ^b	41,7 ± 2,5 ^c	48,7 ± 1,2 ^d	100 ± 0,0 ^e	100 ± 0,0 ^e
250	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a
500	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a

Os resultados são demonstrados em média (%) ± desvio padrão. Letras na mesma linha indicam diferença estatística (ANOVA two-way e Tukey $p \leq 0,05$).

4.2.4. Resultados de dose-resposta dos óleos essenciais e β -cariofileno contra ovos do gênero *Aedes*

Os resultados dos percentuais de inibição dos ovos de *A. aegypti* tratados com OEPA, OEPp e β -cariofileno (Sigma-Aldrich®) nas concentrações de 1,95 a 31,25 ppm são apresentados na figura 53. Houve diferença significativa entre todas as concentrações, exceto em 31,25 ppm ($p > 0,05$) dos OEs que inibiram em 100% dos ovos desse vetor. Ademais, OEPA apresentou maior atividade (13,3 ± 1,5 a 100 ± 0%), seguido por OEPp

($10,7 \pm 1,5$ a $100 \pm 0\%$) e β -cariofileno (4 ± 2 a $72 \pm 2,7\%$), respectivamente. Essas atividades foram superiores à temefós, em que o maior percentual foi de 50%. Não houve registro atividade no controle negativo (dados não demonstrados).

Na espécie *A. albopictus*, também não houve diferença entre as concentrações de 31,25 ppm dos OEs ($p > 0,05$). O OEPp demonstrou melhor atividade ($5,3 \pm 1,5\%$ a $100 \pm 0\%$), seguindo por OEPa ($12,3 \pm 1,5$ a $100 \pm 0\%$) e β -cariofileno (2 ± 1 a $68 \pm 3,1\%$). A atividade de temefós também ficou abaixo de 50% (Figura 54). Esses resultados foram similares ao reportado por Reegan et al., (2014), que também identificou a relação de dose-resposta em testes com ovos de *A. aegypti* tratados com extrato hexânico obtidos da espécie *Limonia acidissima* L. (Rutaceae) testada nas concentrações de 2 a 10 ppm que inibiram de 0,5 a 78,4% após 120 h.

Figura 53. Atividade dos OEPa e OEPp e β -cariofileno contra ovos de *A. aegypti*.

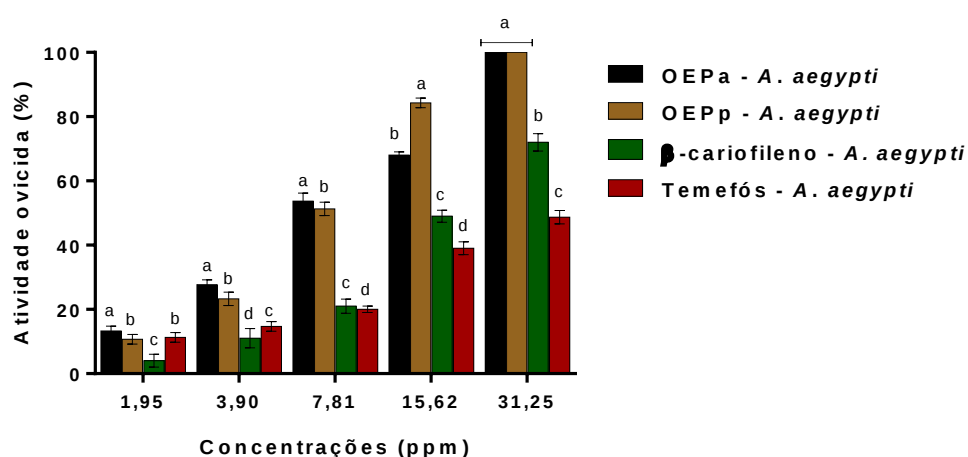
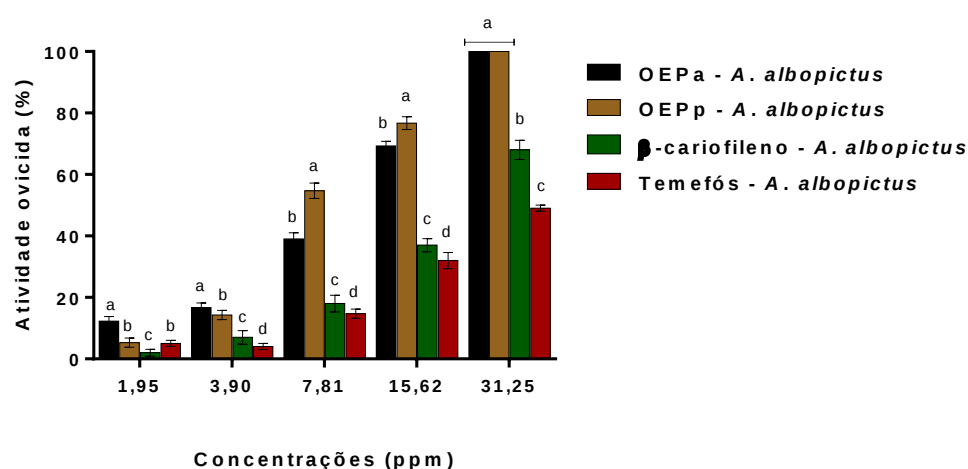


Figura 54. Atividade dos OEPa e OEPp e β -cariofileno contra ovos de *A. albopictus*.

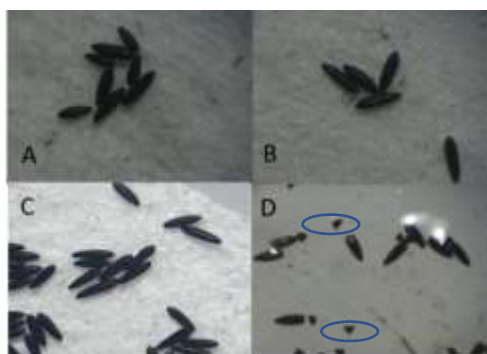


A alta toxicidade dos OEPa, OEPP e β -cariofileno avaliados em concentrações abaixo de 50 ppm podem ser comparados com dados da literatura, pois segundo os estudos de Govindarajan et al., (2011), extrato metanólico das folhas de *Ervatamia coronaria* (Apocynaceae) testado nas concentrações de 50 a 300 ppm contra diferentes culicídeos inibiram de 44 a 73% dos ovos de *Culex quinquefasciatus*, 53 a 100% dos ovos de *A. aegypti* e 49 a 100% dos ovos de *An. stephensi* (Culicidae). Enquanto o extrato metanólico de *Caesalpinia pulcherrima* (Fabaceae) avaliada nas concentrações de 75 a 300 ppm contra esses respectivos vetores inibiram de 44 a 73%, 41 a 100% e 46 a 100%. O óleo essencial de *Zanthoxylum rhoilfolium* (Rutaceae) constituído majoritariamente pela substância β -elemeno (31,26%) apresentou atividade ovicida e ninficida contra *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) (Christ et al., 2016).

As atividades ovicidas dos OEPa, OEPP e β -cariofileno também foram superiores aos extratos etanólico e acetato de etila obtidos das folhas de *Gliricidia sepium* Jacq. (Fabaceae) avaliados nas concentrações de 25 a 100 ppm contra ovos de *An. stephensi* (Culicidae) que inibiram de 13 a 100% (acetato de etila) e 19 a 100% (etanólico), respectivamente. Ademais, o registro de que 100% dos ovos de *An. stephensi* tratados com o controle negativo (DMSO) eclodiram (ausência de atividade ovicida) (Krishnappa et al., 2012) corroboram com o registro identificado em nosso estudo utilizando esse controle.

Na figura 55A, B e C é possível visualizar que os ovos de *Aedes* tratados com os óleos essenciais de *P. alatipetiolatum*, *P. purusanum* e β -cariofileno não estão com os opérculos “tampa dos ovos” separados dos ovos. Indicando que os produtos vegetais inibiram a eclosão dos ovos, ou seja, houve a interrupção do desenvolvimento embrionário larval. Esse evento não ocorreu com ovos tratados com DMSO (Figura 55D).

Figura 55. Ovos de *Aedes* tratados com os óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* (A), *P. purusanum* (B), β -cariofileno (C) e DMSO (D). Círculos aos redores dos opérculos.

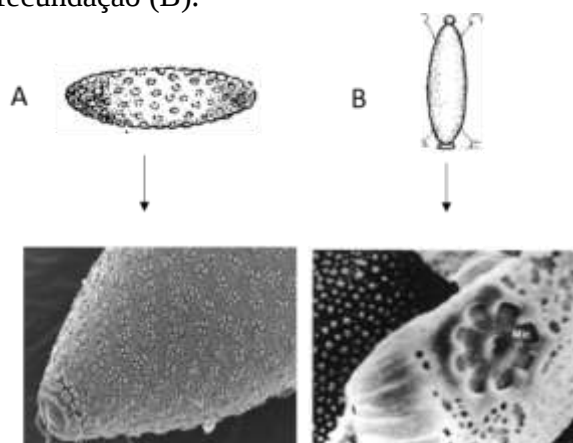


Fonte: Oliveira, A.C (2019).

Os ovos do gênero *Aedes* e de outros culicídeos são recobertos externamente por uma camada de cera denominada córion (Figura 56A) cuja função é de proteger o embrião e a gema que é um líquido constituído por nutrientes usado pelo embrião como alimento, quando o córion é fino, a oxigenação do ovo é realizada pela superfície do córion. Entretanto, podem ocorrer o desenvolvimento de estruturas denominadas de esponjas, filamentos ou câmara de ar para auxiliar na oxigenação. A fecundação ocorre quando o espermatozóide entra no ovo através das micrópilas (Figura 56B) existentes na zona apical dos ovos (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Habid, 2003; Vital, 2006). As investigações inicialmente realizadas por Singh et al., (1978) revelaram que compostos ativos como óleos essenciais ou extratos vegetais adentram nos ovos através das micrópilas, causando a coagulação da gema, interrompendo o desenvolvimento embrionário.

Em estudos posteriores são reportados que após os óleos essenciais e substâncias ativas ao entrarem nos ovos, causaram a interrupção da síntese da quitina durante a formação do exoesqueleto do animal, resultando na má formação e morte do embrião de *A. aegypti* (Suman et al., 2013). Além disso, o acúmulo do OE dentro dos ovos impediu a respiração, causando a morte do embrião por anóxia (Mehlhorn et al., 2011; Kala et al., 2019). Outros estudos sugerem que devido à complexidade da constituição química e pH dos OEs, a ação ovicida é iniciada pela degradação do córion, impedindo a embriogênese e inibição da AChE. Ademais, o prolongamento da exposição dos ovos de *A. aegypti* e *A. albopictus* aos OEs das piperáceas estudadas e ao β -cariofileno maximizam a atividade ovicida (Grando, 2015; Carolina et al., 2016; Sarma et al., 2019).

Figura 56. Ovos de *Aedes* recobertos com córion (A). Micrópila (MIC), duto usado pelos espermatozóides para fecundação (B).



Fonte: Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994).

4.2.5. Resultados dose-resposta dos óleos essenciais e β -cariofileno contra larvas do gênero *Aedes*

Os percentuais de mortes das larvas de *A. aegypti* tratadas com OEPa, OEPp e β -cariofileno avaliados nas concentrações de 25 a 200 ppm são apresentados na figura 57. Houve diferença entre todas as concentrações, exceto em 200 ppm ($p > 0,05$) com 100% de atividade. O OEPa foi o mais ativo (35 ± 2 a $100 \pm 0\%$), seguido pelo OEPp ($8 \pm 1,3$ a $100 \pm 0\%$) e β -cariofileno ($11 \pm 2,2$ a $100 \pm 0\%$), respectivamente. Temefós testado nas concentrações de 1,56 a 12,50 ppm matou de $24 \pm 2,1$ a $100 \pm 0\%$ das larvas do vetor.

Contra larvas de *A. albopictus*, o OEPa também demonstrou maior atividade (27 ± 1 a $100 \pm 0\%$), seguido pelo OEPp ($25 \pm 1,2$ a $100 \pm 0\%$) e β -cariofileno ($17 \pm 2,4$ a $100 \pm 0\%$), respectivamente. Enquanto temefós matou de 23 ± 1 a $100 \pm 0\%$ (Figura 57). Não houve registro de larvas mortas no controle negativo (dados não demonstrados).

Figura 57. Percentuais de larvas de *A. aegypti* mortas após tratamento com os óleos essenciais de *P. alatifetiolatum* e *P. purusanum* e β -cariofileno.

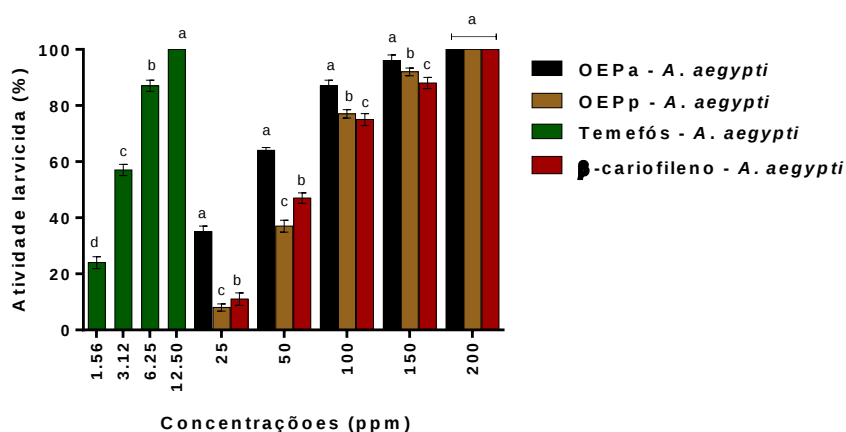
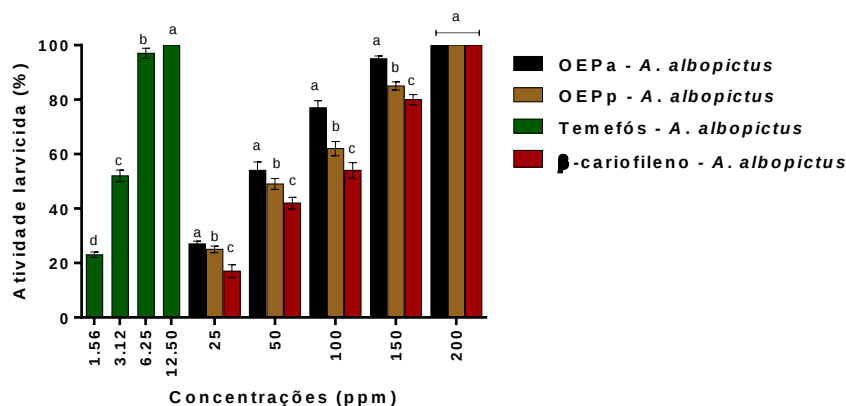


Figura 58. Percentuais de larvas de *A. albopictus* mortas após tratamento com os óleos essenciais de *P. alatifetiolatum* e *P. purusanum* e β -cariofileno.



Os valores estimados pelo método de Probit das concentrações letais (CL) dos OEs de *P. alatipetiolatum*, *P. purusanum*, β -cariofileno e temefós contra as larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* são apresentados na tabela 8. Foi identificada diferença entre todas as CL₅₀ ($p < 0,05$), exceto a estimada para temefós. Contra as larvas de *A. aegypti*, a maior toxicidade foi registrada com o OEPa, com CL₅₀ de 33,74 ppm. Enquanto a menor toxicidade foi apresentada com o OEPP avaliado contra *A. aegypti*, com CL₅₀ de 62,33 ppm respectivamente. Adiante, as larvas de *A. albopictus* apresentaram maior susceptibilidade ao β -cariofileno, com CL₅₀ de 37,28 ppm, enquanto a menor susceptibilidade foi registrada com OEPP, com CL₅₀ de 49,75 ppm.

Tabela 8. Comparação entre as concentrações letais (CL) dos óleos essenciais contra larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus*.

Amostra	Mosquito	CL ₅₀ (ppm) (LCI-LCS)	CL ₉₀ (ppm) (LCI-LCS)	$\chi^2(g.l)$
OEPa	<i>A. aegypti</i>	33,74 ^b (28,874-39,236)	100,69 (82,723-128,994)	9,4(7)
	<i>A. albopictus</i>	46,96 ^e (39,975- 54,658)	115,07 (54,658-95,169)	12(7)
OEPP	<i>A. aegypti</i>	62,33 ^g (58,636-66,097)	142,55 (131,987-155,553)	0,2(3)
	<i>A. albopictus</i>	49,75 ^f (42,216- 58,100)	58,100 (103,598-163,382)	12(7)
β - cariofileno	<i>A. aegypti</i>	40,36 ^d (32,527-47,766)	78,63 (64,636-109,026)	6,2(3)
	<i>A. albopictus</i>	37,28 ^c (28,445-45,378)	78,72 (62,741-118,044)	7(3)
Temefós	<i>A. aegypti</i>	2,68 ^a (2,379-2,990)	6,60 (5,698-8,014)	2,4(7)
	<i>A. albopictus</i>	2,59 ^a (2,216-3,002)	5,43 (4,494-7,283)	8,6(6)

OEPa – óleo essencial de *P. alatipetiolatum*. OEPP – óleo essencial de *P. purusanum*. CL – Concentrações letais estimadas para matar 50 e 90% das larvas. LCI, LCS – Limite de confiança inferior. LCS – Limite de confiança superior. χ^2 - Chi quadrado ($p < 0,05$). g.l – grau de Liberdade. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ($p < 0,05$).

Os resultados apresentados na tabela 8 são corroboram com a atividade larvicida reportados por Da Silva et al., (2016), ao identificar que o OE de *Piper corcovadensis* (Piperaceae) constituído de 82% de sesquiterpenos, matou de 0 e 100% das larvas de *A. aegypti*, exibindo CL₅₀ de 30,52 ppm. As atividades inseticidas identificadas nos OEs de *P. purusanum* e *P. alatipetiolatum* constituídos respectivamente de 84 e 100% de sesquiterpenos podem estar correlacionadas ao sinergismo das substâncias apresentadas nas tabelas 3 e 4. A porcentagem da substância selin-11-en-4- α -ol identificada no óleo essencial de *P. alatipetiolatum* foi <2%. Entretanto, no óleo essencial de *Pluchea carolinensis* (Asteraceae), essa substância foi identificada majoritariamente nas folhas

(33,4%) e flores (17,7%), além do mais, o OEs apresentou importante atividade contra *A. aegypti* (Kerdudo et al., 2016).

Em estudo recente, Govindarajan & Benelli, (2016a) identificou que α -humuleno possui atividade contra as larvas de 3º ínstar de *An. subpictus*, com CL₅₀ de 6,19 µg/mL, contra *A. albopictus*, com CL₅₀ de 6,86 µg/mL e contra *Culex quinquefasciatus* (Culicidae), com CL₅₀ de 7,39 µg/mL. Além disso, também foi identificada que o β -elemeno apresenta ação contra as larvas de *An. subpictus* (CL₅₀ de 10,26 µg/mL), *A. albopictus* (CL₅₀ de 11,15 µg/mL) e *C. quinquefasciatus* (CL₅₀ de 12,5 µg/mL). O óleo essencial de *Plectranthus barbatus* (Lamiaceae) foi majoritariamente constituído de β -cariofileno (42,5%), nos testes com essa substância isolada foram estimados CL₅₀ de 84,20 µg/mL contra larvas de *An. subpictus*, CL₅₀ de 87,25 µg/mL contra *A. albopictus* e CL₅₀ de 94,34 µg/mL contra *C. triaeniorhynchus* (Culicidae) (Govindarajan & Benelli 2016b). Linalol isolado das folhas de óleos essenciais de *Ocimum basilicum* (Lamiaceae) exibiram CL₅₀ de 73,45 ppm contra larvas de *Culex pipiens* (Dris et al., 2017).

No OE da espécie *Cordia leucomalloides* (Boraginaceae), 90,6% das substâncias foram classificadas como sesquiterpenos, sendo δ -cadineno (17,4%), biciclogermacreno (12,5%), germacreno D (11,2%) e β -cariofileno (15,7%) foram as principais substâncias, enquanto na espécie *C. curassavica* (Boraginaceae), 43,9% do OE foi constituído de sesquiterpenos e 47,3% de monoterpenos, sendo α -pineno (20,5%), β -pineno (13,1%), biciclogermacreno (13,8%) e β -cariofileno (12,4%) as principais substâncias. Além do mais, os resultados demonstraram que as amostras apresentaram forte atividade inseticida contra larvas de *A. aegypti*, exibindo CL₅₀ de 63,1% e CL₅₀ de 97,7%, respectivamente (Santos et al., 2006).

As larvas do gênero *Aedes* são conhecidas por desenvolverem-se normalmente em sistemas aquáticos contendo água limpa ou contendo certos graus de poluição, o que podem-lhe conferir certo nível de resistência, observações realizadas a olho “nu” ou com ajuda de técnicas modernas de monitoramento comportamental de larvas expostas a substâncias de interesse científico, são o início para o esclarecimento do modo de ação de substâncias tóxicas no organismo larval (WHO, 2005). Na perspectiva de ocorrer algum tipo de alteração visível a olho nu, foi realizado o monitoramento larval nos intervalos de 2 h durante 24 h.

As larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* tratadas com os óleos essenciais de *P. alatipetiolatum*, *P. purusanum* e β -cariofileno, demonstraram movimentos natatórios

acelerados. Em sequência, foram observados movimentos letárgicos e tremores, mesmo quando estimuladas ou tocadas artificialmente com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, algumas larvas permaneciam no fundo dos recipientes ou mantinham o corpo horizontalmente a superfície da água. Esses comportamentos são descritos como anormais devido ao fato que as larvas do gênero *Aedes* têm como uma das características permanecerem em posição vertical em relação a superfície da água para realizarem a troca gasosa (Ali et al., 2015). Em sequência, foi observado o escurecimento gradual da cabeça, tórax, cerdas, seguimentos abdominais e anal e posteriormente, houve o registro das larvas mortas. Esses efeitos não foram observados com as larvas tratadas com o controle negativo (DMSO) (Figura 59).

Figura 59. Alterações observadas nas larvas após exposição aos óleos essenciais das piperáceas (A) e β -cariofileno (B). Escurecimento da cabeça (1), tórax (2), abdômen (3), cerdas (4), escurecimento e ondulação do sifão respiratório (5), Escurecimento do seguimento (6) e papilas anais (7). Larvas (C e D) tratadas com DMSO.



Fonte: Oliveira, A.C (2016).

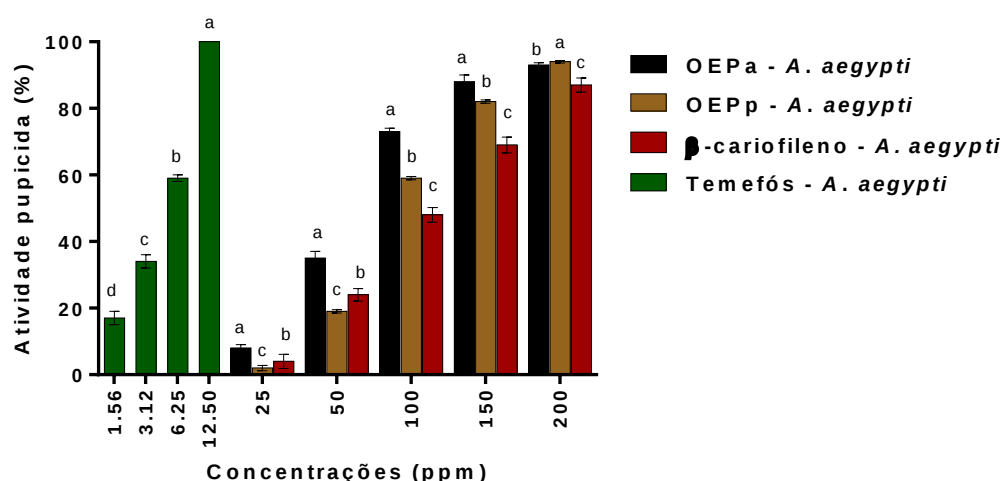
As observações descritas acima também ocorreram com larvas de *A. aegypti* tratadas com extratos obtidos das algas marinhas *Bryopsis pennata* (Bryopsidaceae), *Sargassum binderi* (Sargassaceae) e *Padina australis* (Dictyotaceae) (Yu et al., 2015). Com larvas de L1 a L4 de *A. aegypti*, *An. stephensi* e *C. quinquefasciatus* (Culicidae) tratadas com extrato aquoso obtido das sementes de *Annona squamosa* (Annonaceae) (Ramanibai et al., 2016). Esses efeitos também foram causados pelo óleo-resina de *Copaifera reticulata* (Fabaceae) (Abed et al., 2007) e com o OE de *P. aduncum* (Oliveira et al., 2013). Os óleos essenciais podem agir no sistema endócrino afetando a secreção da ecdisona (conhecido como hormônio da muda) secreção líquida entre a epiderme e o exoequeleto, impedindo que ocorra a troca das exúvias, causando a sobreposição da cutícula, afetando o

desenvolvimento larval, tendo como outras consequências, o escurecimento do corpo das larvas (Kabir et al., 2013; Mendes et al., 2017b). Estudos indicam que os movimentos letárgicos e tremores demonstrados pelas larvas são consequências direta da ação dos óleos essenciais no sistema nervoso central, que atuam equivalentemente aos inseticidas sintéticos fosforados (temefós), clorados ou carbamatos inibindo a ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Aciole, 2009; Bianco et al., 2013; Oliveira et al., 2013).

4.2.6. Resultados dose-resposta dos óleos essenciais e β -cariofileno contra pupas do gênero *Aedes*

Os percentuais de pupas de *A. aegypti* e *A. albopictus* mortas após exposição aos OEs de *P. alatifetiolatum*, *P. purusanum* e β -cariofileno avaliados nas concentrações de 25 a 200 ppm estão apresentados nas figuras 72 e 73, respectivamente. O OEPA apresentou maior toxicidade contra pupas de *A. aegypti*, com mortalidade variando de 8 ± 1 a $93 \pm 0,7\%$, seguido pelo OEPp, que matou de $2 \pm 0,8$ a $94 \pm 0,4\%$, enquanto β -cariofileno apresentou menor atividade, com percentuais de $2 \pm 0,4$ a $87 \pm 2,1\%$, respectivamente.

Figura 60. Percentuais de pupas de *A. aegypti* mortas após tratamento com os óleos essenciais de *P. alatifetiolatum* e *P. purusanum* e β -cariofileno.



Contra pupas de *A. albopictus*, o OEPp foi mais ativo, causando mortalidade de 3 ± 2 a $91 \pm 2,5\%$, enquanto o OEPA causou a morte de 3 ± 1 a $89 \pm 1,5\%$. β -cariofileno também demonstrou menor atividade, com percentual de $4 \pm 2,1$ a $87 \pm 2,1\%$. Ademais, as análises dos percentuais de mortalidades demonstraram diferença entre as toxicidades das amostras estudadas ($p < 0,05$), com relação significativa entre as mortalidades e as concentrações investigadas ($r^2 = 0,9842$). Em relação as concentrações letais (CL), o OEPA

foi caracterizado com a maior atividade pupicida contra *A. aegypti*, com CL₅₀ de 66,17 ppm, enquanto contra *A. albopictus* o OEPp foi o mais tóxico, com CL₅₀ de 71,52 ppm, respectivamente (Tabela 9).

Figura 61. Percentuais de pupas de *A. albopictus* mortas após tratamento com os óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* e β -cariofileno.

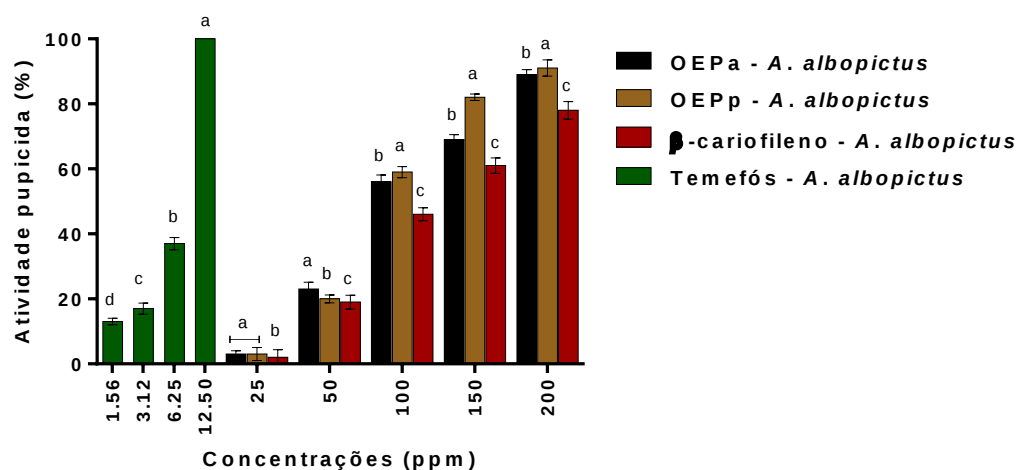


Tabela 9. Comparações entre as concentrações letais dos óleos essenciais contra pupas de *A. aegypti* e *A. albopictus*.

Amostra	Mosquito	CL ₅₀ (ppm) (LCI-LCS)	CL ₉₀ (ppm) (LCI-LCS)	$\chi^2(g.l)$
OEPa	<i>A. aegypti</i>	66,17 ^b (59,665-72,874)	164,54 (144,533-193,219)	0,8(3)
	<i>A. albopictus</i>	91,39 ^e (76,644-108,228)	234,41 (184,180-342,536)	3,4(3)
OEPp	<i>A. aegypti</i>	85,68 ^d (78,503-93,133)	183,65 (163,787-211,743)	0,7(3)
	<i>A. albopictus</i>	71,52 ^c (64,106-79,258)	198,39 (170,770-240,100)	0(3)
β -cariofileno	<i>A. aegypti</i>	103,21 ^f (82,122-130,653)	277,05 (199,810-516,766)	5,4(3)
	<i>A. albopictus</i>	110,82 ^g (99,975-123,397)	313,05(259,492-403,446)	1,7(3)
Temefós	<i>A. aegypti</i>	4,42 ^a (3,188-5,942)	14,64 (9,997-29,340)	6,1(3)
	<i>A. albopictus</i>	5,95 ^a (4,322-8,474)	20,44 (13,005-49,500)	6,3(3)

OEPa – óleo essencial de *P. alatipetiolatum*. OEPp – óleo essencial de *P. purusanum*. CL – Concentrações letais estimadas para matar 50 e 90% das pupas. LCI, LCS – Limite de confiança inferior. LCS – Limite de confiança superior. χ^2 - Chi quadrado ($p < 0,05$). g.l – grau de Liberdade. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ($p < 0,05$).

As pupas de *A. aegypti* e *A. albopictus* tratadas com os OE de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum*, β -cariofileno e temefós avaliados em diferentes concentrações também apresentaram tremores, movimentos letárgicos, escurecimento do cefalotórax, pás natatórias e abdômen, que também apresentaram anatomia “achatada”, fatores não registrados no DMSO. Algumas pupas iniciaram o processo de emergência, no qual

algumas partes anatômicas do inseto como o tórax, cabeça, base das asas, palpos e uma pequena parte do abdômen foram expostas ao meio terrestre (Figura 62).

As alterações descritas no parágrafo acima também ocorreram com pupas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* (Culicidae) tratadas com óleos essenciais de *Zanthoxylum limonella* Alston (Rutaceae) e temefós (Soonwera et al., 2017) e com pupas de *Culex pipiens* (Culicidae) tratadas com óleo essencial de *Ocimum basilicum* (Lamiaceae) (Dris et al., 2017). Além da inibição da acetilcolinesterase, os óleos essenciais também inibem nos canais de sódio causando a paralização dos movimentos musculares intercostais envolvidos no processo de respiração, causando a morte do animal pelo déficit de oxigênio celular, causando a morte do inseto durante a emergência (Raveton et al., 2006; Cadavid-restrepo et al., 2012; Carreño et al., 2014; Haddi et al., 2017; Carreño Otero et al., 2018).

Figura 62. Pupas de *Aedes* tratadas com o OE de *P. purusanum* (A), β -cariofileno (B), temefós (C) e DMSO (D). Tórax (1), cabeça (2), palpos, (5) asas, tarços (4) e abdômen ficaram presos na exúvia (6). A linha vermelha ilustra o limite entre os meios aquático e terrestre, pois as pupas permaneceram horizontalmente na linha da água para que os adultos possam deixar as exúvias para o meio terrestre.



Fonte: Oliveira, A.C (2016).

4.2.7. Resultados seletivos dos óleos essenciais contra larvas do gênero *Anopheles*

Os OEPa, OEPp e temefós demonstraram atividade contra larvas 3º ínstar de *Anopheles* spp (Tabela 10). Os OEs causaram 100% de atividade entre as concentrações de 125 a 500 ppm ($p > 0,05$). Na concentração de 62,5, o OEPa foi mais ativo contra larvas

de *An. nuneztovari*, com 50% de mortes, ao mesmo tempo que larvas de *An. darlingi* foram mais sensíveis a ação do OEPa, com 54% de mortes.

Em 31,25 ppm, o percentual de mortes causadas pelo OEPa foram de 21,2 a 32%, enquanto os percentuais registrados do OEPp foram de 21 a 33%, respectivamente. No controle positivo (temefós), 100% de atividade ocorreu em toda as concentrações testadas ($p > 0,05$). Não houve registro de mortes no controle negativo (dados não demonstrados).

Tabela 10. Resultados dos bioensaios de OEPa e OEPp contra larvas do gênero *Anopheles*.

Amostra	ppm	Espécie animal			
		<i>An. nuneztovari</i>	<i>An. triannulatus</i>	<i>An. darlingi</i>	<i>An. albitarsis</i>
OEPa	31,25	28,2 ± 0,1 ^a	32 ± 0,9 ^b	24,4 ± 1,5 ^c	21,2 ± 2 ^d
	62,50	50 ± 0,8 ^a	49,2 ± 1,1 ^b	41 ± 0,8 ^c	46,4 ± 0,8 ^d
	125	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a
	250	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a
	500	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a
OEPp	31,25	31 ± 1 ^a	29 ± 2,1 ^b	33 ± 1,5 ^c	21 ± 0,8 ^d
	62,50	41 ± 0,8 ^a	51 ± 1,1 ^b	54 ± 2,2 ^c	39 ± 2,7 ^d
	125	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a
	250	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a
	500	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a
Temefós	31,25	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a
	62,50	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a
	125	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a
	250	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a
	500	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a

As concentrações estão em ppm e os resultados são demonstrados em média (%) ± desvio padrão. Letras na mesma linha indicam diferença estatística (ANOVA two-way e Tukey $p \leq 0,05$).

4.2.8. Resultados de dose-resposta dos óleos essenciais e β -cariofileno contra larvas do gênero *Anopheles*

Os resultados dos bioensaios de dose-resposta dos OEs de *P. alatipetiolatum* e *P. purusum* e β -cariofileno avaliados nas concentrações de 12,2 a 125 ppm contra larvas de 3º ínstar de *An. nuneztovari*, *An. triannulatus*, *An. darlingi* e *An. albitarsis* são apresentados na tabela 11. Diferença significativa foi identificada entre os percentuais de larvas de anofelinos mortas após tratamento com o OEPa ($p < 0,05$). Os maiores percentuais de

mortes foram registrados contra *An. albitarsis*, com mortalidade de $21 \pm 2,1$ a $100 \pm 0\%$, seguido pelas espécies *An. darlingi*, *An. nuneztovari* e *An. triannulatus*, respectivamente.

Em relação ao OEPp, também foi identificada diferença entre os percentuais de larvas mortas ($p < 0,05$). Em adição, as larvas de *An. darlingi* apresentaram maior susceptibilidade ao OE, com mortalidade de 10 ± 1 a $100 \pm 0\%$, seguida pelas espécies *An. albitarsis*, *An. nuneztovari* e *An. triannulatus*. Por fim, β -cariofileno causou maior mortalidade contra *An. albitarsis*, com $6 \pm 0,8$ a $91 \pm 1,9\%$ e menor atividade contra *An. triannulatus*.

Tabela 11. Resultados da atividade de OEPA, OEPp e β -cariofileno contra larvas do gênero *Anopheles*.

Amostra	ppm	Espécie animal			
		<i>An. nuneztovari</i>	<i>An. triannulatus</i>	<i>An. darlingi</i>	<i>An. albitarsis</i>
OEPa	25	$11 \pm 2,1^a$	13 ± 1^b	$14 \pm 2,1^c$	$21 \pm 2,1^d$
	50	$48 \pm 1,5^a$	$39 \pm 1,9^b$	$52 \pm 2,4^c$	$56 \pm 0,7^d$
	75	$72 \pm 0,5^a$	$64 \pm 0,3^b$	$72 \pm 1,7^c$	$77 \pm 0,2^d$
	100	$86 \pm 0,1^a$	$80 \pm 1,4^b$	$90 \pm 0,6^c$	$87 \pm 1,6^d$
	125	$100 \pm 0,0^a$	$100 \pm 0,0^a$	$100 \pm 0,0^a$	$100 \pm 0,0^a$
OEPp	25	$9 \pm 0,2^a$	$12 \pm 0,9^b$	10 ± 1^c	$13 \pm 2,1^d$
	50	$41 \pm 0,5^a$	$24 \pm 1,7^b$	$51 \pm 2,4^c$	$48 \pm 0,4^d$
	75	$62 \pm 2,4^a$	$54 \pm 0,1^b$	67 ± 2^c	61 ± 2^d
	100	$84 \pm 2,3^a$	$79 \pm 0,8^b$	$92 \pm 0,8^c$	$89 \pm 2,6^d$
	125	$100 \pm 0,0^a$	$100 \pm 0,0^a$	$100 \pm 0,0^a$	$100 \pm 0,0^a$
β - cariofileno	25	3 ± 1^a	8 ± 1^b	$9 \pm 1,1^c$	$6 \pm 0,8^d$
	50	$11 \pm 2,1^a$	$19 \pm 2,1^b$	23 ± 1^c	$13 \pm 0,9^d$
	75	$30 \pm 2,7^a$	$39 \pm 1,7^b$	$46 \pm 2,4^c$	$52 \pm 2,1^d$
	100	$49 \pm 1,7^a$	$56 \pm 1,9^b$	$64 \pm 2,6^c$	$75 \pm 2,4^d$
	125	$64 \pm 2,2^a$	$68 \pm 2,2^b$	$76 \pm 2,9^c$	$91 \pm 1,9^d$
Temefós	1,5	$14 \pm 1,5^a$	16 ± 1^b	$5 \pm 1,3^c$	$8 \pm 0,5^d$
	3,12	$20 \pm 1,0^a$	$24 \pm 2,5^b$	$11 \pm 1,1^c$	$14 \pm 2,1^d$
	6,25	$47 \pm 1,5^a$	$61 \pm 1,3^b$	$41 \pm 0,8^c$	$24 \pm 1,9^d$
	12,5	$100 \pm 0,0^a$	$100 \pm 0,0^a$	$100 \pm 0,0^a$	$100 \pm 0,0^a$
	25	$100 \pm 0,0^a$	$100 \pm 0,0^a$	$100 \pm 0,0^a$	$100 \pm 0,0^a$

Os resultados são demonstrados em média (%) $\pm$ desvio padrão. Letras na mesma linha indicam diferença estatística (ANOVA two-way e Tukey $p \leq 0,05$).

Os resultados estimados pelo método de Probit para as concentrações letais (CL) são apresentadas na tabela 12. A análise comparativa das CL permitiu identificar que não houve diferença entre as CL₅₀ estimadas do OE_{Pa} entre as espécies *An. albitarsis* (CL₅₀ de 41,36 ppm) e *An. darlingi* (CL₅₀ de 45,98 ppm) ($p > 0,05$) e entre as espécies *An. nuneztovari* (CL₅₀ de 50,27 ppm) e *An. triannulatus* (CL₅₀ de 52,60 ppm) ($p > 0,05$), respectivamente.

As CL estimadas do OE_{Pp} contra *An. albitarsis* (CL₅₀ de 48,60 ppm), *An. darlingi* (CL₅₀ de 49,21 ppm), *An. triannulatus* (CL₅₀ de 50,25 ppm) e *An. nuneztovari* (CL₅₀ de 49,88 ppm) foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Em contrapartida, β -cariofileno apresentou maior atividade contra *An. albitarsis* (CL₅₀ de 71,33 ppm) e menor atividade contra a espécie *An. nuneztovari* (CL₅₀ de 102,48 ppm), respectivamente. Em adição, os valores estimados das CL para temefós contra as larvas dos anofelinos variaram de CL₅₀ de 5,93 a 6,46 ppm, contudo, sem diferença estatística entre esses resultados ($p > 0,05$).

Segundo Cheng et al., (2009), princípios ativos com CL₅₀ < 100 ppm apresentam alta toxicidade, enquanto amostras com CL₅₀ > 100 ppm apresentam atividade moderada. Dito isso, os óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* e β -cariofileno foram classificados com toxicidade elevada contra as larvas dos anofelinos estudados, exceto β -cariofileno investigado contra *An. nuneztovari*.

Outras espécies do gênero *Piper* também demonstraram atividade elevada contra larvas de 3º ínstar do gênero *Anopheles*, como reportado com o óleo essencial de *P. capense* avaliada contra *An. gambiae*, com CL₅₀ de 34,9 ppm (Matasyoh et al., 2011), ou atividade moderada, como identificadas nos extratos metanólicos obtidos das folhas de *P. tuberculatum* e *P. alatabaccum* avaliados contra larvas de 3º ínstar de *An. darlingi*, com CL₅₀ de 194 e 235 ppm, respectivamente (Cardoso et al., 2012). As larvas tratadas com os OEs de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* e a substância β -cariofileno também apresentaram movimentos acelerados, tremores e movimentos letárgicos. Além disso, o escurecimento da cabeça, tórax e seguimentos abdominais também ocorreram previamente à morte dos animais (Figura 63).

Tabela 12. Comparação entre as concentrações letais dos óleos essenciais e β -cariofileno contra larvas de 3º instar do gênero *Anopheles*.

Amostra	Mosquito	CL ₅₀ (ppm) (LCI-LCS)	CL ₉₀ (ppm) (LCI-LCS)	$\chi^2(g.l)$
OEPa	<i>An. nuneztovari</i>	50,27 ^b (46,511-54,030)	97,20 (88,784-08,490)	6(7)
	<i>An. triannulatus</i>	52,60 ^b (46,730-58,581)	108,76 (94,581-131,162)	10(7)
	<i>An. darlingi</i>	45,98 ^a (42,250-49,574)	94,52 (85,779-06,190)	5(7)
	<i>An. albitarsis</i>	41,36 ^a (37,833-44,994)	94,48 (84,821-07,458)	6(7)
OEPp	<i>An. nuneztovari</i>	49,88 ^a (43,345-56,619)	104,91 (89,444-130,723)	12(7)
	<i>An. triannulatus</i>	50,25 ^a (44,319-56,225)	98,711 (85,978-118,819)	11(7)
	<i>An. darlingi</i>	49,21 ^a (45,578-52,843)	92,889 (85,070-103,250)	5(7)
	<i>An. albitarsis</i>	48,60 ^a (42,747-54,627)	103,99 (89,626-126,781)	10(7)
β - cariofile no	<i>An. nuneztovari</i>	102,48 ^d (93,814-114,142)	237,54 (195,198-317,296)	2,2(3)
	<i>An. triannulatus</i>	90,29 ^c (81,716-101,420)	255,31 (203,471-356,639)	2,5(3)
	<i>An. darlingi</i>	77,94 ^b (71,163-85,793)	203,93 (169,883-263,783)	2,6(3)
	<i>An. albitarsis</i>	71,33 ^a (52,540-84,410)	137,247 (109,096-277,283)	5,8(3)
Temefós	<i>An. nuneztovari</i>	5,93 ^a (4,540-7,758)	16,33 (11,657-29,209)	5(3)
	<i>An. triannulatus</i>	6,07 ^a (4,627-7,980)	16,66 (11,842-30,250)	6(3)
	<i>An. darlingi</i>	6,46 ^a (5,725-7,299)	20,51 (17,037-25,964)	0(3)
	<i>An. albitarsis</i>	6,25 ^a (5,673-6,897)	13,96 (12,178-16,591)	2(3)

OEPa – óleo essencial de *P. alatifetiolatum*. OEPp – óleo essencial de *P. purusanum*. CL – Concentrações letais estimadas para matar 50 e 90% das larvas. LCI, LCS – Limite de confiança inferior. LCS – Limite de confiança superior. χ^2 - Chi quadrado ($p < 0,05$). *g.l* – grau de Liberdade. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Figura 63. Larvas do gênero *Anopheles* tratadas com os OEs de *P. alatifetiolatum* (A), *P. purusanum* (B) e β -cariofileno (C) comparadas ao DMSO (D, E, F).



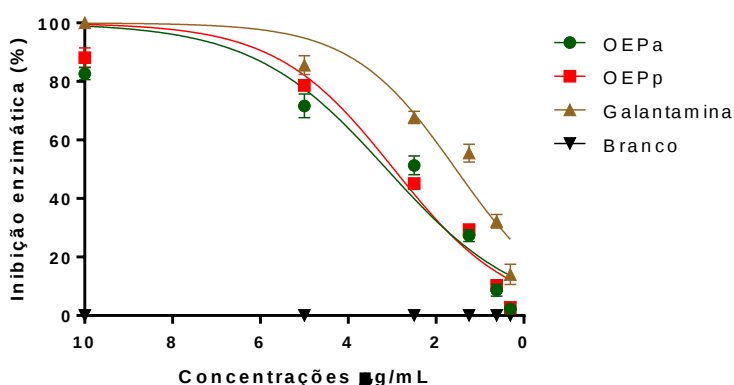
Fonte: Oliveira, A.C (2019).

4.2.9. Atividade inibidora dos óleos essenciais contra AChE

Os resultados das atividades inibidoras dos óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* contra a enzima acetilcolinesterase (AChE) são apresentados na figura 64. O percentual de inibição da AChE causada pelo OEPA de $2,3 \pm 1,5$ a $82,7 \pm 2\%$ (IC_{50} de $2,14 \mu\text{g/mL}$, $r^2 = 0,9118$) foi estatisticamente igual a inibição causada pelo OEPp, que inibiu de $2,7 \pm 2,1$ a $88,2 \pm 3,2\%$ (IC_{50} de $1,94 \mu\text{g/mL}$, $r^2 = 0,9608$) ($p > 0,05$). Entretanto, esses resultados apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparados ao padrão (galantamina), que inibiu de $14,1 \pm 3,5$ a $100 \pm 0\%$ (IC_{50} de $1,55 \mu\text{g/mL}$, $r^2 = 0,9899$).

Os resultados descritos acima confirmam que as atividades ovicidas, larvicidas e pupicidas identificadas nos óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* contra as espécies dos gêneros *Aedes* e *Anopheles* (Culicidae) ocorreram após a inibição da enzima acetilcolinesterase. Esses resultados também são ratificados por Da Silva et al., (2014a), que registrou atividade anticolinesterase nas espécies *P. aleyreanum*, *P. anonifolium* e *P. hispidum* (Piperaceae) com IC_{50} de 0,01 a $10 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Em adição, os óleos essenciais dessas espécies foram majoritariamente ricos nas substâncias selin-11-en-4-ol (20%), germacreno D (14,2%), óxido de cariofileno (10%), β -cariofileno (11%), δ -elemeno (8,2%), β -elemeno (16,3%), α -humuleno (9,5%), β -selineno (12,7%) e *E*-nerolidol (8,2%).

Figura 64. Percentuais das atividades dos óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* (OEPa) e *P. purusanum* (OEPp) na inibição da acetilcolinesterase.



Fonte: Oliveira, A.C (2019).

Os impulsos nervosos (informações) são transmitidos de um neurônio transmissor (célula excitada) para o neurônio receptor (célula em repouso) ordenadamente pela ação da

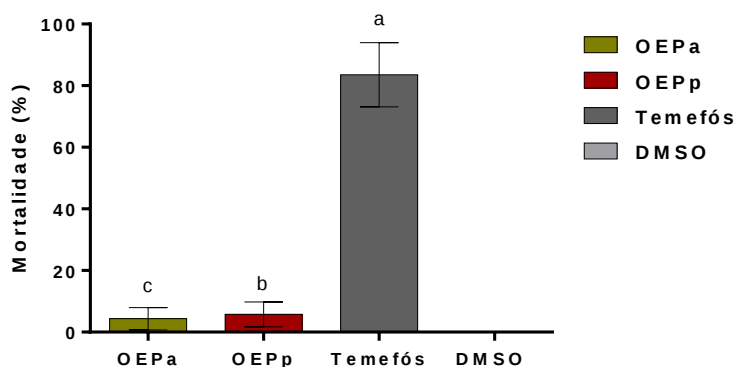
enzima acetilcolinas, para que a informação seja transmitida, é necessário que o neurônios em repouso esteja previamente excitado, para que isso ocorra, a acetilcolina sai do neurônio transmissor para a fenda sináptica, causando a excitação do neurônio anteriormente em repouso, sendo feita a transferência do impulso nervoso. Após isso, a enzima acetilcolinesterase liga-se a acetilcolina, quebrando-a em colina + acetato, após isso, o neurônio retorna ao estado de repouso. A colina + acetato retorna para o interior do neurônio transmissor para iniciar o ciclo da transmissão da informação.

Os produtos sintéticos e de origem natural com ação no sistema nervoso dos insetos, atuam ligando-se de forma irreversível com a acetilcolinesterase, causando o acúmulo da acetilcolina na fenda sináptica, causando a hiperexcitação do neurônio receptor devido a transmissão descontrolada dos impulsos, gerando falência do sistema nervoso central, causando movimentos acelerados e posteriormente tremores letárgicos e morte (José et al., 2005; Che-mendoza et al., 2009; Melo-Santos et al., 2010; Nogueira, 2010; Zamora Perea et al., 2009; Aguirre-Obando et al., 2016).

4.2.10. Resultado da toxicidade dos óleos essenciais contra organismo não-alvo

Os resultados das toxicidades dos óleos essencial de *P. alatipetiolatum* (OEPa) e *P. purusanum* avaliados contra larvas de *A. salina* são apresentados na figura 65. A menor toxicidade foi registrada com o OEPa, que matou de $6 \pm 2,2$ a $33 \pm 2,4\%$ das larvas, com CL_{50} de 2.122 e CL_{90} de 3.242 ppm (slope = 8.570 ± 1.719 , $\chi^2 = 0,1$ e grau de liberdade = 3), ao mesmo tempo em que o OEPp matou de $18 \pm 2,7$ a $34 \pm 2,4$ ppm, CL_{50} de 2.258 e CL_{90} de 3.624 ppm (slope = $6,237 \pm 1,078$, $\chi^2 = 3,6$ e grau de liberdade = 3). Enquanto a maior toxicidade foi registrada com temefós, com percentuais de mortes de $10 \pm 1,8$ a $100 \pm 0\%$, com CL_{50} de 36,09 e CL_{90} de 61,92 ppm (slope = $5,469 \pm 0,437$, $\chi^2 = 4,7$, grau de liberdade = 2), com valor de $p < 0,05$ indicando diferença significativa entre os percentuais das CL entre os óleos essenciais em comparação ao controle positivo.

Figura 65. Percentuais de toxicidades dos óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* (OEPa) e *P. purusanum* (OEPp) contra *A. salina*.



Fonte: Oliveira, A.C (2019).

De acordo com Meyer et al., (1982), toxicidade de substância avaliadas contra organismos aquáticos não-alvos são classificadas como atóxica quando $CL_{50} > 1000$ ppm, baixa quando a $CL_{50} > 500$ ppm, moderada quando o valor de CL_{50} variar entre 100 a 500 ppm e alta quando o valor da $CL_{50} < 100$ ppm. Assim, os óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* foram caracterizados como atóxicos contra larvas de *A. salina*. Diversos estudos reportam os resultados das toxicidades de diferentes óleos essenciais contra larvas de *A. salina*, como registrado com óleo essencial de *H. suaveolens* (Lamiaceae) (CL_{50} de 49,72 $\mu\text{g/mL}$) (Bezerra et al., 2017), *E. jambolana* (Myrtaceae) (CL_{50} de 15,5 $\mu\text{g/mL}$), *H. suaveolens* (Lamiaceae) (CL_{50} de 2,5 $\mu\text{g/mL}$) (Sobral-souza et al., 2014). Esses resultados demonstram que os óleos essenciais dessas espécies foram significativamente mais tóxicos quando comparadas ao OEs de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum*.

Produtos de origem botânica podem apresentar baixa, moderada ou elevada toxicidade para diferentes organismos não-alvo (Demirci et al., 2017), como reportado por Lagarto Parra et al., (2001), ao identificar que o extrato de *P. auritum* (Piperaceae) apresentou toxicidade contra *A. salina* (CL_{50} de 26,67 $\mu\text{g/mL}$) e foi atóxico contra ratos albinos suíços (CL_{50} de 1.802 mg/mL). A compreensão da toxicidade das substâncias sobre organismos não-alvo permite o desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos de aplicação das substâncias em ambiente urbano ou rural mais seguros no combate aos mosquitos vetores da (Pavela, 2015).

4.2.11. Resultados da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Os resultados do bioensaio da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* (OEPa) e *P. purusanum* (OEPp) são demonstrados na tabela 13. Os dados demonstraram que o OEPp apresentou atividade bacteriana contra *E. faecalis* e *S. aureus*, ao mesmo tempo que o OEPa apresentou atividade contra *E. faecalis*. Entretanto, não foi detectada atividade contra os demais patógenos.

Posteriormente ao bioensaio de microdiluição, verificou-se que a concentração inibitória mínima (CIM) do OEPp foi de 0,125 mg/mL contra *S. aureus* (Figura 66), enquanto a CIM do OEPp contra *E. faecalis* foi de 0,5 mg/mL. Em relação ao OEPa avaliado na concentração de 0,25 mg/mL, foi detectada atividade intermediária contra *E. faecalis*, enquanto que na concentração de 0,5 mg/mL a atividade contra esse patógeno foi considerada como sensível (Figura 67). *E. faecalis* é a principal bactéria causadora da infecção nosocomial em recém nascidos em tratamento em unidade de terapia intensiva devido à rápida perda de peso, além de causar meningite e infecção urinária (Furtado et al., 2014), enquanto *S. aureus* é responsável por causar diversas infecções como pneumonia, síndrome do choque tóxico ou endocardite (Santos et al., 2007).

Tabela 13. Resultado da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum*.

Patógenos	OEPp	OEPa
<i>C. albicans</i>	R	R
<i>C. tropicalis</i>	R	R
<i>E. faecalis</i>	S	S
<i>E. coli</i>	R	R
<i>P. aeruginosa</i>	R	R
<i>S. aureus</i>	S	R

Candida albicans. *Candida tropicalis*. *Enterococcus faecalis*. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. R = resistente, S = Sensível.

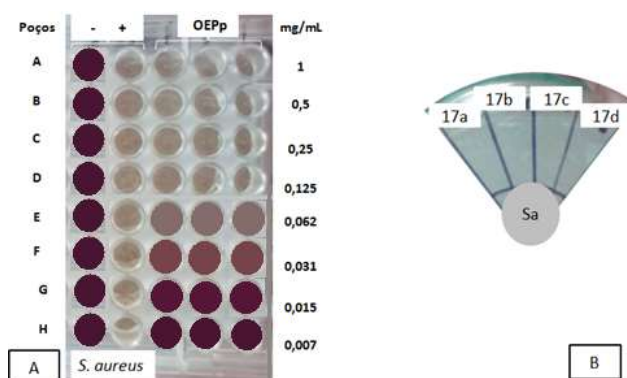
As atividades antimicrobianas dos óleos essenciais contra esses microrganismos podem ser correlacionadas as substâncias identificadas no OE de *P. purusanum* como óxido de cariofileno e β -cariofileno as quais inibiram de 73,41 e 81,12% o crescimento da *P. fluorescens* (Pseudomonadaceae) (Myszka et al., 2017), enquanto β -cariofileno possui grande importância medicinal devido sua ampla atividade antimicrobiana reportada contra *B. cereus* (Bacillaceae), *B. subtilis* (Bacillaceae), *S. aureus* (Staphylococcaceae), *K. pneumoniae* (Enterobacteriaceae) (Dahham et al., 2015) e *S. mutans* (Streptococcaceae)

(Yoo et al., 2018), ao mesmo tempo em que linalol também possui atividade contra *S. enterica* (Enterobacteriaceae) (CIM = 5 mg/mL), *E. coli* (Enterobacteriaceae) (CIM = 5 mg/mL), *S. aureus* (Staphylococcaceae) (CIM = 10 mg/ml) e *Listeria monocytogenes* (Listeriaceae) (CIM = 10 mg/mL) (Jin et al., 2019). Ademais, também foram reportadas atividade antimicrobiana das substâncias germacreno (Prosser et al., 2002), δ -cadineno (Davis et al., 1996), *E*-nerolidol (Baldissera et al., 2020), eudesmol (Natascha et al., 2019) e α -humuleno (Sonntag et al., 2015).

No óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* Lour (Lamiaceae) constituído pelas substâncias β -cariofileno (19,91%), α -humuleno (1,74%), germacreno D (38,60%), δ -cadineno (3,16%), óxido de cariofileno (2,13%) e *trans*-nerolidol (6,29%), a CI_{50} foi de 128 μ g/mL contra *Streptococcus mutans* (INCQS 00446) (Streptococcaceae) (Santos et al., 2016).

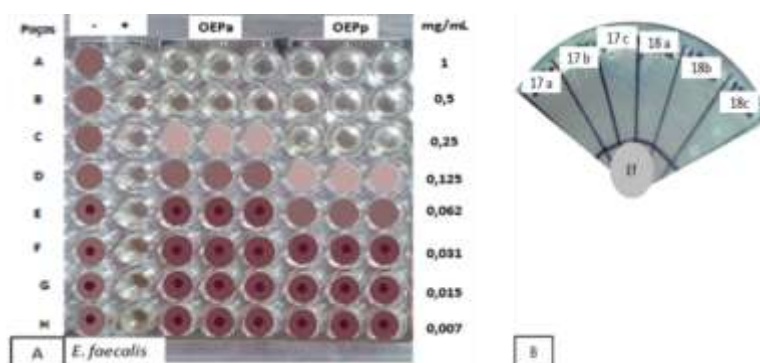
Em relação as substâncias identificadas no óleo essencial de *P. alatipetiolatum* com atividade reportada na literatura destaca-se β -elemeno com atividade antimicrobiana (Fang et al., 2018; Sawicki et al., 2018), além de quê δ e β -elemeno também possuem atividade anticâncer induzida por apoptose (Chen et al., 2017; Xie et al., 2020; Xuwei et al., 2019), enquanto mustakona isolada das raízes de *Cyperus articulatus* (Cyperaceae) foi ativa contra cepas de *Plasmodium falciparum* (CIM = 2 mg/mL) quando comparada ao controle positivo (Rukunga et al., 2008). Ademais, a atividade medicinal do β -longipineno foi comprovada ao inibir em 89,30% (IC_{50} = 34,47 μ g/mL) da α -amilase (alvo de ação dos medicamentos para diminuir a hiperglicemia) em comparação ao controle positivo acarbose (IC_{50} = 55,56 μ g/mL) (Xu et al., 2017).

Figura 66. A - Placa da CIM; B - placa da contra-prova confirmando a ausência de crescimento bacteriano até a concentração 0,125 mg/mL de amostra do OEPp. 17a - poço A; 17b - poço B, 17c - poço C, 17d - poço D.



Fonte: Silva, S.R.S. (2019).

Figura 67. Placa da CIM; B - placa da contra-prova confirmando a ausência de crescimento bacteriano; 17 - OEPP; 18- OEPa; a - poço A; b - poço B, c – poço.



Fonte: Silva, S.R.S. (2019).

4.3. Resultados das sínteses e caracterização das nanoemulsões

Os nanoemulsões desenvolvidos com 9 mL de água destilada, 5 mg dos OEs e tensoativos (Tween 20 e 80) são demonstradas na figura 68. Após 1 h do término das sínteses, a nanoemulsão desenvolvida com Tween 80, carregada com OE de *P. purusanum* (NEPp - 80) apresentou tonalidade marrom clara e aparência mais líquida, pH variando entre 5,1 a 5,7 e elevada polidispersão ($0,960 \pm 0,047$), indicando desnaturação e instabilidade (Paula et al., 2011). O tamanho médio das partículas foram de $451,1 \pm 17,74$ nm (Figura 69A) e potencial Zeta de $-6,19 \pm 0,87$ mV (Figura 69B).

A nanoemulsão desenvolvida com Tween 80 e OE de *P. alatipetiolatum* (NEPa - 80) apresentou tonalidade leitosa, indicativo de ausência de desnaturação e variação do pH entre 5,4 e 6,9. Contudo, o tamanho médio das partículas de $433,20 \pm 7,40$ nm e índice de polidispersão de $0,366 \pm 0,018$ (Figura 83C e D) foram considerados elevados, embora o valor do potencial Zeta de $-8,93 \pm 0,08$ mV foi considerado adequado.

O nanossistema sintetizado com OE de *P. alatipetiolatum* e Tween 20 (NEPa – 20) foi caracterizado com tonalidade leitosa, com tamanho médio das partículas de $315,6 \pm 8,44$ nm, índice de polidispersão de $0,044 \pm 0,015$, pH entre 5,2 a 5,7 e potencial Zeta de $-8,51 \pm 0,14$ mV (Figura 70A e B), ao mesmo tempo em que a nanoemulsão contendo OE de *P. purusanum* (NEPp – 20) foi caracterizada com tamanho médio de $135 \pm 0,26$ nm, índice de polidispersão de $0,092 \pm 0,001$, potencial Zeta de $-14,40 \pm 0,78$ mV, pH variando entre 4,9 e 5,2 e coloração leitosa (Figura 70C e D) com morfologia aproximadamente esféricas (Figura 71), corroborando com a síntese desenvolvida com Tween 20 e óleo essencial de *A. indica* (Meliaceae) (Anjali et al., 2012). Além disso, não foi observado a formação de fases, cremação ou coalescência durante o período de 30 dias de

monitoramento dos nanosistemas, devido ao potencial zeta relativamente adequado indicando boa estabilidade físico-química ocasionando a repulsão entre as nanopartículas adjacentes, evitando agregação, além disso, as inexpressivas mudanças no pH também podem ter interagido para a estabilização dos nanosistemas (Rezende et al., 2003).

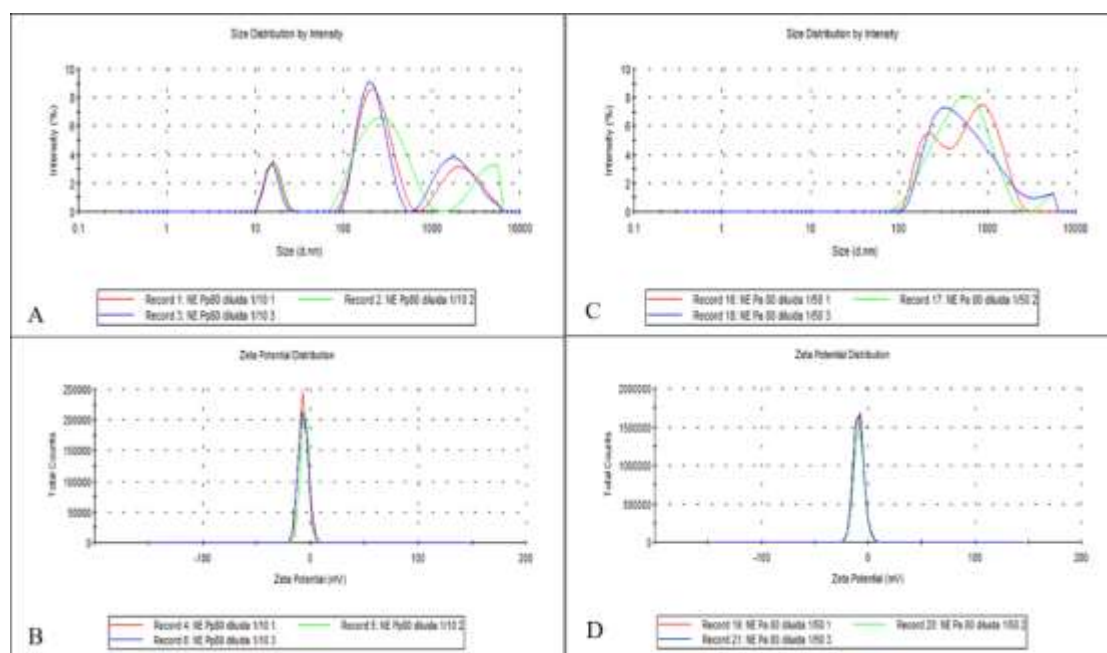
O potencial zeta negativo é provavelmente ocasionado pela presença do óleo essencial na síntese, enquanto baixo índice de polidispersão observado no estudo (PDI de 0,044 e 0,092) indica a homogeneidade no tamanho das nanopartículas (Domínguez et al., 2018; Adi et al., 2019). Em adição, o tamanho das partículas, o potencial zeta e o PDI são os primeiros parâmetros mensurados pois afetam significativamente a atividade biológica do princípio ativo (Montefuscoli et al., 2013).

Figura 68. Nanoemulsões desenvolvidas com Tween 20 (OEPa – 20 e OEPp – 20) e nanoemulsões desenvolvidas com Tween 80 (OEPa – 80 e OEPp – 80).



Fonte: Oliveira, A.C (2019).

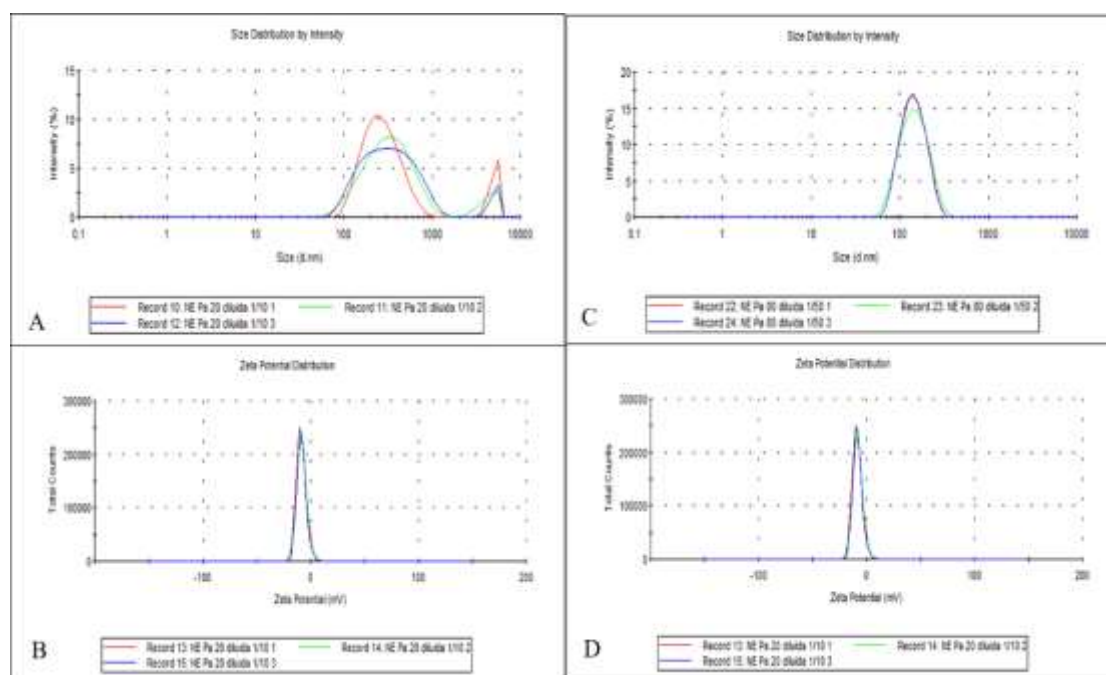
Figura 69. Imagens dos tamanhos médios das partículas e potencial Zeta das nanoemulsões carregadas com OE de *P. purusanum* (A, B) e OE de *P. alatipetiolatum* (C, D) sintetizadas com Tween 80.



Fonte: Laboratório de Inovação e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica (LIDETEF) (2019).

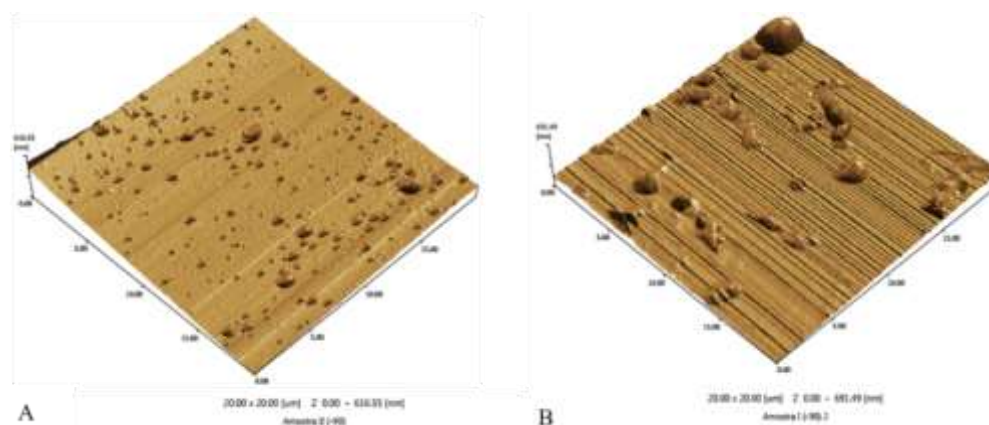
Na tentativa de mensurar a diferença entre os tamanhos das nanopartículas sintetizadas com Tween 20 e 80, foi realizada análise comparativa (ANOVA two-way) do tamanho das nanopartículas em relação ao surfactante e aos OEs. A análise permitiu identificar que a diferença nos tamanhos das partículas formuladas com Tween 80 é de 73% em comparação as nanopartículas formuladas com Tween 20 ($F = 213372,30$, $p < 0,0001$), enquanto 27% foram influenciados pelos óleos essenciais de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum*. Porém, a relação entre o tamanho das partículas e as características físico-químicas dos tensoativos necessitam de mais investigação (Chaiyana et al., 2010). Contudo, é conhecido que a interação do surfactante com o óleo essencial são alguns dos fatores que interferem no tamanho das partículas, podendo resultar em amostras com 25 a 500 nm, com morfologia esférica ou irregular, ademais partículas com tamanho > 400 nm apresentam instabilidade física e atividade biológica inexpressiva (Balasubramani et al., 2018).

Figura 70. Imagens dos tamanhos médios das partículas e potencial Zeta das nanoemulsões carregadas com OE de *P. alatipetiolatum* (A,B) e OE de *P. purusanum* (C,D) sintetizadas com Tween 20.



Fonte: Laboratório de Inovação e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica (LIDETEF) (2019).

Figura 71. Imagens das nanoemulsões carregadas com o OE de *P. alatipetiolatum* (A) e *P. purusanum* (B) obtidas pelo método de AFM.



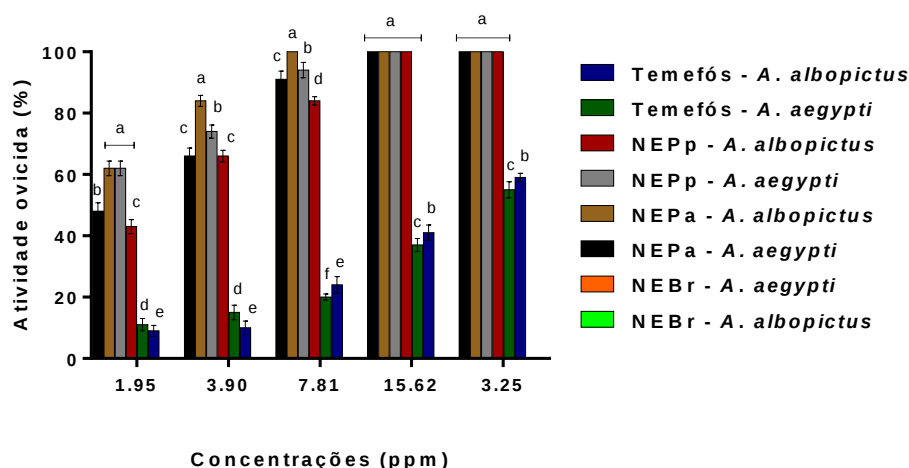
Fonte: Laboratório de Energia e Eletroquímica (2019)

4.3.2. Atividade ovicida das nanoemulsões contra ovos do gênero *Aedes*

Os percentuais de inibição dos ovos de *A. aegypti* e *A. albopictus* expostos às nanoemulsões carregadas com os OEs de *P. alatipetiolatum* (NEPa) e *P. purusanum* (NEPp) avaliadas nas concentrações de 1,95 a 31,25 ppm são apresentados na figura 72.

As nanoemulsões apresentaram atividade ovicida superior em todas as concentrações avaliadas em comparação ao temefós ($p < 0,05$). As análises dos percentuais médios das atividades ovicidas entre as nanoemulsões permitiram identificar que há diferenças significativa entre as atividades ($p < 0,05$), com a menor atividade ovicida registrada com NEPp avaliada contra ovos de *A. albopictus*, com percentuais de $43 \pm 2,3$ a $100 \pm 0,0\%$, enquanto a maior atividade foi registrada com NEPa testado contra *A. albopictus*, com percentuais de $62 \pm 2,4$ a $100 \pm 0,0\%$. Não houve atividade ovicida no controle negativo (NEBr) (Figura 73).

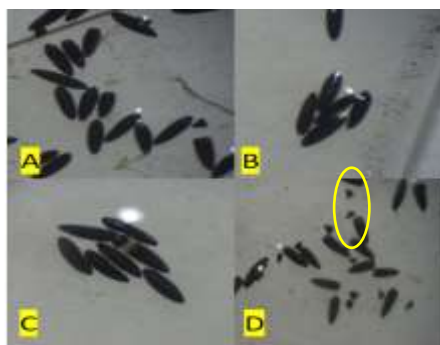
Figura 72. Percentuais das atividades ovicidas das nanoemulsões carregadas com óleos essenciais de *P. alatiptetiolatum* (NEPa) e *P. purusanum* (NEPp) avaliadas contra ovos de *A. aegypti* e *A. albopictus*.



Fonte: Oliveira, A.C (2019).

A atividade ovicida ocorre após os nanosistemas adentrarem nos ovos através das micrópilas, desencadeiam ação similar aos óleos essenciais com atividade ovicida (Mehlhorn et al., 2011). Entretanto, devido ao tamanho das nanopartículas, um volume maior do nanosistema é acumulado dentro dos ovos, resultando em atividade ovicida superior quando comparadas aos óleos essenciais *in natura*, como observado no estudo de Grando, (2015) que relataram que nanopartículas contendo o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) em concentrações de 100 a 350 ppm inibiram de 9,9 a 100% dos ovos de *Haemonchus contortus* (Trichostrongylidae), enquanto o óleo essencial *in natura* inibiu de 2 a 82%. Contudo, os estudos descrevendo claramente o mecanismo de ação dos nanosistemas com atividade ovicida ainda são escassos.

Figura 73. Ovos do gênero *Aedes* tratados com as NEPa (A), OEPp (B) e temefós (C). Os círculos aos redores dos opérculos indicando que houve eclosão dos ovos tratado com controle negativo: NEBr (D).



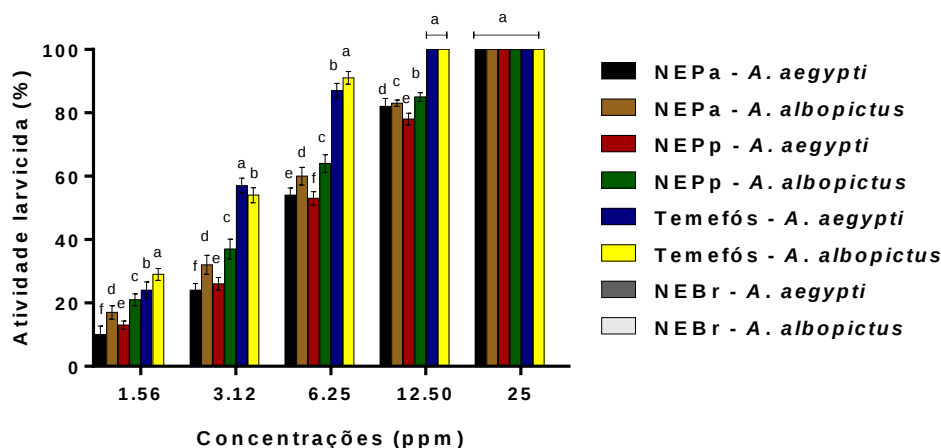
Fonte: Oliveira, A.C (2019).

4.3.3. Atividade larvicida das nanoemulsões contra larvas do gênero *Aedes*

Os resultados das atividades larvicidas das nanoemulsões carregadas com os OEs de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* avaliadas nas concentrações de 1,56 a 25 ppm contra larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* são apresentadas na figura 74. A menor atividade larvicida de 10 ± 2 a $100 \pm 0,0\%$ foi registrada contra larvas de *A. aegypti* tratadas com NEPa, ao mesmo tempo em que a maior atividade foi registrada contra larvas de *A. albopictus* tratadas com NEPp, com percentual de $21 \pm 1,9$ a $100 \pm 0,0\%$, respectivamente. Entretanto, as análises permitiram identificar que há diferença significativa nas atividades larvicidas entre NEPa e NEPa ($p < 0,05$) na concentração de 25 ppm. Ademais, a atividade larvicida do temefós foram de 24 ± 1 a $100 \pm 0,0\%$ de *A. aegypti* e $29 \pm 0,9$ a $100 \pm 0,0\%$ de *A. albopictus*, respectivamente.

As mortes das larvas provavelmente ocorreram devido ao significativo tamanho em escala nanométrica dos nanosistemas, características físico-químicas, concentração, interação do princípio ativo, bem como tempo de contato direto com a cutícula do inseto, permitindo uma melhor penetração no organismo (Nel et al., 2009; Sugumar et al., 2014; Volpato et al., 2016). Além disso, o tamanho das partículas permitem que os nanosistemas sejam facilmente ingeridos pelas larvas, havendo melhor distribuição e intensificação da atividade do OE em até 20 vezes, causando a morte em menor tempo (Abed, 2007; Okonogi et al., 2012; Bianco et al., 2013; Kabir et al., 2013; Pavela et al., 2019). O potencial inseticida de nanosistemas também foi demonstrado contra *C. quinquefasciatus* (Culicidae) (Anjali et al., 2012), *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera) (Volpato et al., 2016a), *Bemisia tabaci* (Aleyrodidae) (Christofoli et al., 2015).

Figura 74. Percentuais da atividade larvicida das nanoemulsões carregadas com os OEs e *P. alatipetiolatum* (NEPa) e *P. purusanum* (NEPp) contra larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus*.



Fonte: Oliveira, A.C (2019).

Em relação as concentrações letais, o método de Probit permitiu identificar que a NEPp avaliada contra *A. albopictus* apresentou a maior atividade larvicida, com CL_{50} de 4,01 ppm, enquanto que para *A. aegypti*, a NEPp exibiu a menor atividade, com CL_{50} de 5,40 ppm. Ademais, as análises das concentrações letais e seus respectivos intervalos de o confiança indicaram que há diferença entre todas as concentrações letais estimadas para as nanoemulsões em comparação ao controle positivo ($p < 0,05$) (Tabela 14).

Tabela 14. Comparação das concentrações letais das nanoemulsões para matar 50 e 90% das larvas do gênero *Aedes*.

Amostra	Mosquito	CL_{50} (ppm) (LCI-LCS)	CL_{90} (ppm) (LCI-LCS)	$\chi^2(g.l)$
NEPa	<i>A. aegypti</i>	5,34 ^e (4,041-7,025)	15,47 (10,928-28,328)	5,9(3)
	<i>A. albopictus</i>	4,51 ^d (2,831-5,417)	14,22 (9,637-29,070)	6,6(3)
NEPp	<i>A. aegypti</i>	5,40 ^f (4,113-7,048)	18,36 (12,814-33,672)	4,7(3)
	<i>A. albopictus</i>	4,01 ^c (2,831-5,417)	14,22 (9,637-29,070)	5,9(3)
Temefós	<i>A. aegypti</i>	2,66 ^b (2,368-2,970)	6,48 (5,598-7,857)	2,1(3)
	<i>A. albopictus</i>	2,36 ^a (2,079-2,638)	5,72 (4,943-6,949)	1,2(3)

CL – Concentrações letais estimada para matar 50 e 90% das larvas. LCI, LCS – limite de confiança inferior e superior de 95%. χ^2 - Chi quadrado ($p < 0,05$). GL – Grau de Liberdade. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

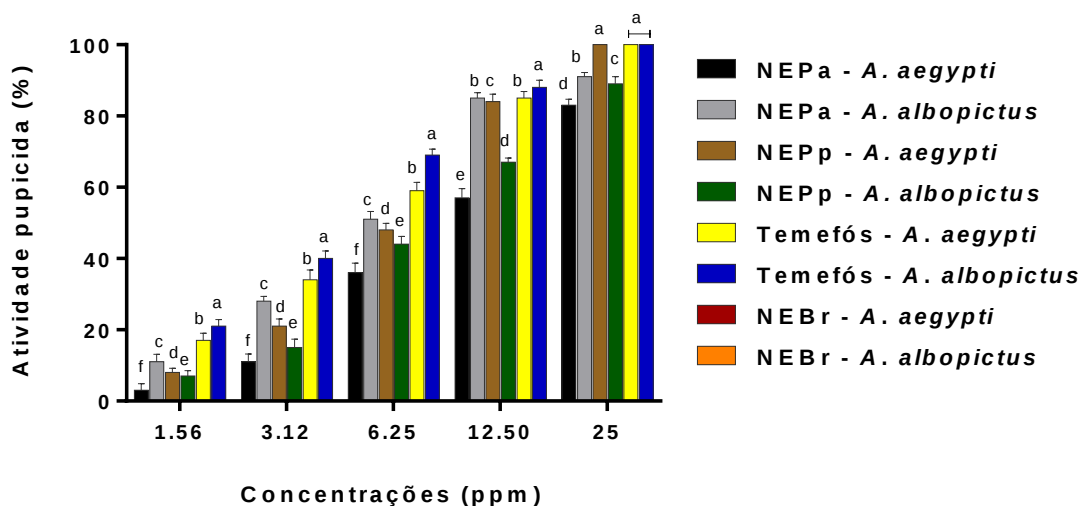
4.3.3. Atividade larvicida das nanoemulsões contra pupas de *Aedes*

As nanoemulsões carregadas com os OEs de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* avaliadas nas concentrações de 1,56 a 25 ppm apresentaram significativa atividade contra

pupas de *A. aegypti* e *A. albopictus*, respectivamente (Figura 75). Todavia, o menor percentual de mortalidade foi registrado com pupas de *A. aegypti* tratadas com NEPa, variando de $3 \pm 1,9$ a $83 \pm 1,7\%$. Entretanto, NEPa apresentou maior atividade contra pupas de *A. albopictus*, com mortalidade de $11 \pm 2,1$ a $91 \pm 1,2\%$.

Diferença entre os percentuais de mortalidades foi identificada entre pupas de *A. aegypti* tratadas com NEPa e pupas de *A. albopictus* tratadas com NEPp ($p < 0,05$). Não foi identificada pupas mortas no controle negativo: NEBr, corroborando a significativa atividade pupicida identificada nas nanoemulsões.

Figura 75. Percentuais da atividade de NEPa e NEPp avaliadas contra pupas de *A. aegypti* e *A. albopictus*.



Fonte: Oliveira, A.C (2019).

Entre as concentrações letais (Tabela 15), NEPa apresentou a maior toxicidade identificada contra *A. aegypti*, com CL_{50} de 5,34 ppm, enquanto que NEPp apresentou menor toxicidade contra a espécie *A. albopictus*, com CL_{50} de 7,69 ppm, respectivamente. Entre as amostras NEPa e NEPp avaliadas respectivamente contra *A. albopictus* e *A. aegypti*, não há diferença significativa entre os valores de CL_{50} de 5,53 e 5,68 ppm, respectivamente ($p > 0,05$). Os CL_{50} estimadas nas nanoemulsões foram diferentes quando comparadas ao temefós. Os resultados publicados por Suresh et al., (2018) descreveram que a atividade pupicida de um nanosistema carregado com extrato ativo obtido de *Suaeda maritima* (Chenopodiaceae) contra pupas de *A. aegypti* (CL_{50} de 17,97 ppm) e contra pupas de *Spodoptera litura* (Arctiidae) (CL_{50} de 46,89 ppm) foram correlacionadas às características ópticas, volume, tamanho e superfície de contato do nanosistema com as

cutículas das pupas. Fatores também descritos em outros estudos (Rajaganesh et al., 2016^a; Oliveira et al., 2017; Sugumar et al., 2019).

Tabela 15. Comparação das concentrações letais das nanoemulsões para matar 50 e 90% das pupas do gênero *Aedes*.

Amostra	Mosquito	CL ₅₀ (ppm) (LCI-LCS)	CL ₉₀ (ppm) (LCI-LCS)	$\chi^2(g.l)$
NEPa	<i>A. aegypti</i>	5,34 ^c (4,041-7,025)	15,47 (10,928-28,328)	5,9(3)
	<i>A. albopictus</i>	5,53 ^d (4,341-7,007)	20,20 (14,464-34,130)	3,5(3)
NEPp	<i>A. aegypti</i>	5,68 ^d (4,248-7,619)	15,36 (10,752-29,362)	7,1(3)
	<i>A. albopictus</i>	7,69 ^e (6,762-8,796)	27,65 (22,244-36,660)	1,5(3)
Temefós	<i>A. aegypti</i>	2,66 ^a (2,368-2,970)	6,48 (5,598-7,857)	2,1(3)
	<i>A. albopictus</i>	4,42 ^b (3,188-5,942)	12,52 (9,198 -20,498)	3,7(3)

CL – Concentrações letais estimada para matar 50 e 90% das pupas. LCI, LCS – limite de confiança inferior e superior de 95%. χ^2 - Chi quadrado ($p < 0,05$). GL – Grau de liberdade. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

4.3.4. Resultados dos bioensaios das nanoemulsões contra *Anopheles*

Os percentuais de larvas do gênero *Anopheles* mortas pela ação das nanoemulsões carregadas com os OEs de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* são apresentadas na tabela 16. A NEPa demonstrou atividade larvicida contra todos anofelinos estudados, ao qual o maior percentual de atividade foi registrado contra *An. darlingi*, (14 a 100%), seguido por *An. triannulatus* (7 ± 3 a $100 \pm 0\%$), *An. nuneztovari* (10 ± 2 a $100 \pm 0\%$) e *An. albitarsis* (5 ± 1 a $100 \pm 0\%$), respectivamente.

Em relação à NEPp, larvas de *An. nuneztovari* (12 ± 1 a $100 \pm 0\%$) foram mais sensíveis à ação da nanoemulsão, seguido por *An. darlingi* (9 ± 2 a $100 \pm 0\%$), *An. triannulatus* (11 ± 1 a $94 \pm 1\%$) e *An. albitarsis* (7 ± 0 a $88 \pm 3\%$), respectivamente, com diferença entre todas as concentrações (1,56 a 25 ppm) avaliadas. Há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações avaliadas (1,56 a 12,50 ppm). Não houve mortes no controle negativo (dados não apresentados).

Tabela 16. Percentuais de atividade larvicida registra do bioensaios do NEPa, NEPp e temefós contra larvas do gênero *Anopheles*.

Amostra	ppm	Espécie animal			
		<i>An. nuneztovari</i>	<i>An. triannulatus</i>	<i>An. darlingi</i>	<i>An. albitarsis</i>
NEPa	1,56	10 ± 2 ^a	7 ± 3 ^b	14 ± 2 ^c	5 ± 1 ^d
	3,12	21 ± 2 ^a	26 ± 2 ^b	30 ± 2 ^c	14 ± 1 ^d
	6,25	52 ± 1 ^a	57 ± 1 ^b	61 ± 2 ^c	34 ± 2 ^d
	12,50	84 ± 1 ^a	89 ± 0 ^b	91 ± 1 ^c	59 ± 1 ^d
	25	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a
NEPp	1,56	12 ± 1 ^a	11 ± 1 ^b	9 ± 2 ^c	7 ± 0 ^d
	3,12	38 ± 3 ^a	29 ± 2 ^b	29 ± 3 ^b	17 ± 2 ^c
	6,25	41 ± 3 ^a	58 ± 2 ^c	58 ± 2 ^c	28 ± 3 ^d
	12,50	93 ± 2 ^a	81 ± 1 ^b	83 ± 1 ^c	57 ± 2 ^d
	25	100 ± 0 ^a	94 ± 1 ^b	100 ± 0 ^a	88 ± 3 ^c
Temefós	1,56	4 ± 1 ^a	8 ± 1 ^b	7 ± 2 ^c	6 ± 0,3 ^d
	3,12	29 ± 2,0 ^a	33 ± 1,5 ^b	35 ± 1,1 ^c	28 ± 2,1 ^d
	6,25	77 ± 1,9 ^a	70 ± 2,1 ^b	75 ± 1,3 ^c	73 ± 0,9 ^d
	12,50	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a
	25	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a	100 ± 0,0 ^a

As concentrações estão em ppm e os resultados são demonstrados em média (%) ± desvio padrão. Letras na mesma linha indicam diferença estatística (ANOVA two-way e Tukey $p < 0,05$).

Os valores estimados das concentrações letais (CL) das nanoemulsões são apresentados na tabela 17. As larvas da espécie *An. darlingi* (CL₅₀ de 4,43 ppm) foram mais susceptíveis a NEPa, seguido pelas espécies *An. triannulatus* (CL₅₀ de 5,04 ppm), *An. nuneztovari* (CL₅₀ de 5,44 ppm) e *An. albitarsis* (CL₅₀ de 9,8 ppm), respectivamente. Todavia, NEPp apresentou maior atividade foi registrada contra *An. nuneztovari* (CL₅₀ de 3,87 ppm), ao mesmo tempo que a menor atividade foi registrada contra *An. albitarsis* (CL₅₀ de 9,30 ppm), respectivamente.

Os valores das CL₅₀ registrados pelas nanoemulsões foram aproximados em comparação ao temefós. Esses dados são corroborados com os dados registrados por Osanloo et al., (2017) que identificou a eficiência de nanoemulsão carregada com óleo essencial de *Artemisia dracunculus* (Asteraceae) contra *An. stephensi* ao causar a mortalidade de 93% das larvas, com CL₅₀ de 11,36 ppm. Enquanto Kala et al., (2019) reporta 98% das larvas de *An. culicifacies* morreram em 24 h de experimento. Posteriormente, Kala et al., (2019) desenvolveu nanoemulsões com tamanho de 52 a 62 nm avaliadas contra *An. culicifacies* que resultaram em CL₅₀ de 1,4 e 18,1 mg/mL.

Tabela 17. Comparação entre as concentrações letais do OEPa, OEPp e temefós contra larvas de 3º ínstar de *Anopheles*.

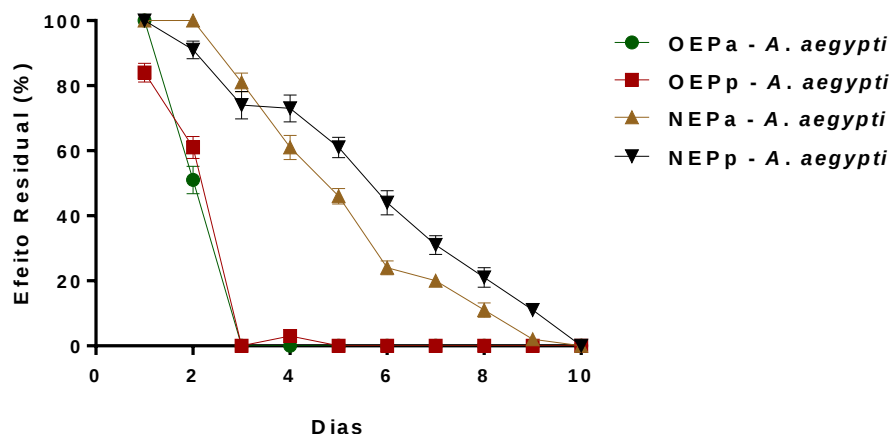
Amostra	Mosquito	CL ₅₀ (ppm) (LCI-LCS)	CL ₉₀ (ppm) (LCI-LCS)	$\chi^2(g.l)$
NEPa	<i>An. nuneztovari</i>	5,44 ^c (3,999-7,401)	15,19 (10,470-30,342)	7(3)
	<i>An. triannulatus</i>	5,04 ^b (4,532-5,610)	12,91 (11,090-15,638)	2(3)
	<i>An. darlingi</i>	4,43 ^a (3,382-5,716)	12,54 (9,070 -21,767)	5(3)
	<i>An. albitarsis</i>	9,81 ^d (8,270-12,405)	39,81 (27,139-71,858)	0(2)
NEPp	<i>An. nuneztovari</i>	3,87 ^a (3,479-4,328)	10,15 (8,503-12,821)	0(3)
	<i>An. triannulatus</i>	5,26 ^c (4,612-5,981)	18,65 (15,317-24,011)	0(03)
	<i>An. darlingi</i>	5,03 ^b (4,000-6,289)	14,53 (10,819-23,132)	4(3)
	<i>An. albitarsis</i>	9,30 ^d (6,650-14,038)	36,30 (21,469-60,785)	6(3)
Temefós	<i>An. nuneztovari</i>	4,08 ^c (3,743-4,462)	7,84 (6,948-9,162)	2(3)
	<i>An. triannulatus</i>	4,03 ^b (3,147-5,144)	8,76 (6,575-14,831)	6(3)
	<i>An. darlingi</i>	3,88 ^a (3,246-4,636)	8,11 (6,492-11,548)	3(3)
	<i>An. albitarsis</i>	4,15 ^d (3,408-5,060)	8,43 (6,630-12,608)	4(3)

CL – Concentrações letais estimada para matar 50 e 90% das larvas. LCI, LCS – limite de confiança inferior e superior de 95%. χ^2 - Chi quadrado ($p < 0,05$). GL – Grau de liberdade. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

4.3.5. Avaliação do efeito residual

Os resultados dos bioensaios do efeito residual dos OEs e nanoemulsões avaliados contra *A. aegypti* e *A. albopictus* são demonstrados nas figuras 76 e 77, respectivamente. Os registros demonstram que as atividades larvicidas dos OEs e das nanoemulsões diminuíram consideravelmente com o decorrer do tempo, porém, o efeito residual dos OEs fora menor em comparação com as nanoemulsões ($p < 0,05$). A exemplo disso, foi observado que no dia 1º, os OEs de *P. alatipetiolatum* e *P. purusanum* demonstraram 100 e 84% de atividade contra larvas de *A. aegypti*, decaindo para 3 e 0% no 5º. Enquanto os registros das atividades em NEPa e NEPp no 1º dia foram de 100%, decaindo para 24 e 2% no 10º, respectivamente (Figura 89).

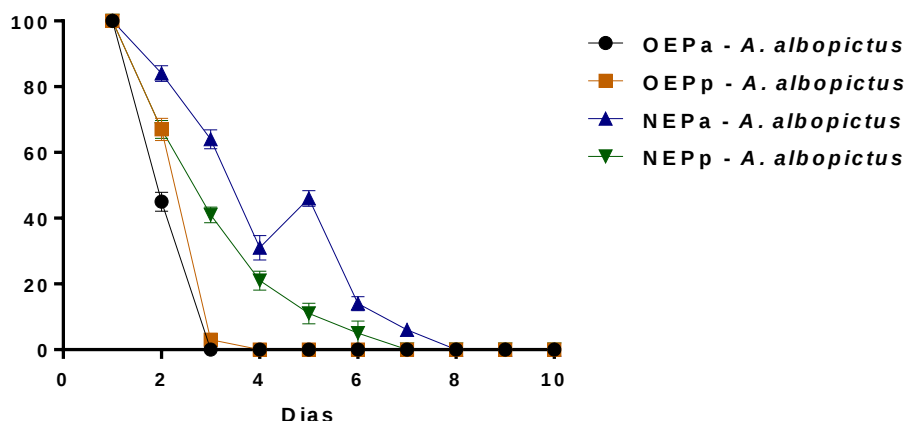
Figura 76. Resultado do efeito residual dos OEs e nanoemulsões avaliados contra larvas de *A. aegypti*.



Fonte: Oliveira, A.C (2019).

Com larvas de *A. albopictus*, o efeito residual dos OEs *P. alatispetiolatum* e *P. purusanum* registrados no 1º dia foram respectivamente de 100%, decaindo para 3% no 3º dia. Enquanto o efeito residual de NEPa e NEPp entre os dias 1 ao 7º foram de 100 a 6% ($p < 0,05$) (Figura 90). O decréscimo da atividade de OEs em relação ao tempo também foi reportado por Coitinho et al., (2006), ao identificar que as atividades larvicida dos OEs de *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Azadirachta indica* (Meliaceae) e *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) avaliadas contra *Sitophilus zeamais* (Curculionidae) foram consideradas inexpressivas após 60 dias de experimento. Posteriormente, Coitinho et al., (2010) impregnou grãos de milho com os OEs de *P. hispidum* e *P. marginatum* (Piperaceae) e os usou como alimento inseticida contra *S. zeamais* (Curculionidae), os resultados demonstraram que a atividade dos OEs caíram para 0 e 53% após 60 dias de análise. Esses resultados também foram corroborados por Treichel et al., (2015) ao registrar o decréscimo de 83,7 para 38,9% da atividade do OE de *Baccharis trimera* (Asteraceae) entre os dias 1 e 90 avaliado contra *S. zeamais* (Curculionidae). Enquanto que os efeitos residuais dos OEs de *Cinnamomun zeylanicum* (Lauraceae), *Laurus nobilis* (Lauraceae), *Brassica napus* (Brassicaceae) e *Zea mays* (Poaceae) contra ovos, larvas e adultos de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera) foram considerados significativos os períodos iniciais do experimento, obtendo de 100% de atividade, decaindo para 19,99 ao final do estudo (Lopes et al., 2010).

Figura 77. Resultado do efeito residual dos OEs e nanoemulsões avaliados contra larvas de *A. albopictus*.



Fonte: Oliveira, A.C (2019).

O emprego de substâncias naturais como OEs com ação inseticida são uma alternativa na substituição aos inseticidas sintéticos cujo os efeitos negativos são o desenvolvimento da resistência, bem como a poluição ambiental e risco à saúde humana (Kordali et al., 2007a), devido aos OEs não deixarem resíduo no ambiente por serem biologicamente voláteis (Costa et al., 2005). Entretanto, a rápida degradação é um fator negativo quando se trata de efeito residual, pois é necessário que sejam realizadas aplicações da substância inseticida em curtos intervalos de tempo, uma vez que, substâncias com prolongado efeito residual permitem maior controle e monitoramento da população de um determinado inseto, além de reduzirem o custos do processo de obtenção da substância biológica (Silva et al., 2010).

As nanoemulsões tem como finalidade, proteger a substância ativa de degradação que pode ser desencadeados pela temperatura ou luz, afetando a atividade inseticida, além disso, a nanoemulsão melhora a solubilidade e estabilidade que é realizada por uma camada de surfactante ou camadas de surfactantes (Assis et al., 2012), enquanto o efeito residual prolongado das nanoemulsões em comparação aos OEs é explicada pela liberação lenta do princípio ativo (OE) no habitat aquático, desse modo a biodisponibilidade do princípio ativo na água mantem a toxicidade letal para as larvas, prolongando o tempo para que seja realizada uma nova aplicação do inseticida. Em condições favoráveis de temperatura, umidade e alimento, o ciclo de vida do *Aedes* pode ocorrer em até cinco dias e considerando os resultados ovicidas, larvicida e pupicidas, além do efeito residual demonstrados, as nanoemulsões aplicadas em campo poderiam manter reduzidas a densidade populacional

do vetor durante 10 dias, até que seja realizada uma nova aplicação (Abirami et al., 2016; Volpato et al., 2016a; Oliveira et al., 2017).

5. CONCLUSÕES

A análise de CG-EM permitiu classificar que os óleos essenciais de *P. purusanum* e *P. alatipetiolatum* são constituídos principalmente por sesquiterpenos contendo majoritariamente as substâncias ishwarone e β -cariofileno. Além disso, os OEs demonstraram importante atividade contra as formas imaturas (ovo, larva e pupa) do *A. aegypti* e *A. albopictus*, vetores primário e secundário da dengue no mundo, respectivamente. Além de atividade larvicida contra *An. darlingi*, *An. nuneztovari*, *An. triannulatus* e *An. albitarsis*, principais vetores da malária no Amazonas, com posterior atividade na inibição da AChE, correlacionado que o mecanismo de ação dos OEs ocorrera no sistema nervoso central dos animais. Ademais, a segurança toxicológica dos OEs para futura aplicação em ambiente natural foi identificada após testes contra *A. salina* demonstrarem $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$. Os ensaios microbiológicos também demonstraram significativa atividade contra as bactérias *S. aureus* e *E. faecalis*.

As sínteses desenvolvidas com Tween 20 e 5 mg dos OEs de *P. purusanum* e *P. alatipetiolatum* permitiram o desenvolvimento de nanopartículas esféricas estáveis com tamanho médio de 135 e 315,6 nm, respectivamente. As quais demonstraram atividades ovicidas, larvicidas e pupicidas superiores em comparação aos OEs. Essa eficiência também foi identificada no ensaio residual, demonstrando que os nanosistemas permanecem ativos por um período de 10 dias em relação aos OEs, possibilitando maior controle das populações do vetor, redução de custos e tempo de aplicação do inseticida.

Fatores bióticos e abióticos encontrados no habitat natural dos anofelinos influenciaram negativamente no desenvolvimento das larvas. Devido a isso, as coletas foram drasticamente prejudicadas. Esses eventos aliados à complexa especificidade de ambientalização e manutenção das larvas em condições de laboratório, prejudicaram a realização dos testes ovicidas, pupicidas e efeito residual. Considerando que a malária é uma das enfermidades com grande relevância na região amazônica, os prováveis resultados positivos obtidos desses testes serviriam de fomento para elaboração ou adequação de metodologias mais específicas considerando a biologia de cada vetor.

Diante dos significativos resultados obtidos, as nanoemulsões carregadas com os OEs extraídos das espécies *P. purusanum* e *P. alatipetiolatum* podem ser considerados uma ferramenta segura nos controles dos vetores da dengue e malária. O estudo possibilita que

novos estudos sejam realizados contra outros insetos vetores de endemias característicos da região amazônica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abed, R.A., Gvasin, G.M., Silva, H.H.G., Silva, I.G., 2007. Morphohistoleogic changes in larvae of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) caused by larvicidal activity of the plant oleo-resina medicinal *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae). *Revista de Patologia Tropical* 36, 75–86.

Abirami, D., Vijayan, P., Govindarajan, M., Benelli, G., 2016. Green-synthesized silver nanoparticles using *Psychotria nilgiriensis*: toxicity against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and impact on the predatory efficiency of the non-target organism *Poecilia sphenops* (Cyprinodontiforme: Poeciliida). *Journal of Asia-Pacific Entomology*. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2016.09.001>

Aciole, 2009. Avaliação da atividade inseticida dos óleos essenciais das plantas Amazônicas Annonaceae, Boraginaceae e de Mata Atlântica Myrtaceae como alternativa de controle às larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Dissertação. Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências. Departamento de Biologia Animal. 86p.

Adams, R.P., 2017. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th Edition Allured Publishing Corporation, Carol Stream. 809p.

Adi, A.C., Christanto, C., Rachmawati, H., Adlia, A., 2019. Vitamin E-based folic acid nanoemulsion: Formulation and physical evaluation for oral administration. *Pharmaceutical Nanotechnology*. 1-10. doi.org/10.2174/2211738507666190717154040

Aguirre-Obando, O.A., Pietrobon, A.J., Bona, A.C.D., Navarro-Silva, M.A., 2016. Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (*kdr*) in *Aedes aegypti* populations from Jacarezinho (Brazil) after a dengue outbreak. *Revista Brasileira de Entomologia* 60, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2015.11.009>

Alencar Filho, J.M.T. de, Araújo, L. da C., Oliveira, A.P., Guimarães, A.L., Pacheco, A.G.M., Silva, F.S., Cavalcanti, L.S., Lucchese, A.M., Almeida, J.R.G. da S., Araújo, E.C. da C., 2017. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropiifolius* in different seasons of the year. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 27, 440–444. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.02.004>

Alexandre, A. da S., 2017. Perfil cromatográfico por TLC do óleo e dos extratos das folhas e caule de andiroba, *Carapa guianensis* Aubl. Scientia Amazonia. 6: 117–125.

Ali, B.E.H., 2015. Chemical composition and antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. Industrial Crops and Products 77, 631–639. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.046>

Al-Mehmadi, R.M.; Al-Khalaf, A.A. 2010. Larvicidal and histological effects of *Melia azedarach* extracts on *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). Journal of King Saud University. 22: 77-85.

Almeida, R.R.P., Souto, R.N.P., Bastos, C.N., da Silva, M.H.L., Maia, J.C.S., 2009. Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. Chemistry and Biodiversity. 6, 1427-1437.

Amezcu, J.M.E.R. 2016. *Piper commutatum* (Piperaceae), the correct name for a widespread species in Mexico and Mesoamerica. Acta Botanica Mexicana. 116: 9-19.

Andemo, A.; Yewhalaw, D.; Alemayehu, B.; Ambelu, A. 2014. Evaluation of the mosquitocidal effect of Birbira (*Mellitia ferrugínea*) seed extract against *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) from Ethiopia. Acta Tropica.136: 68-73.

Andrade, E.H.A., Alves, C.N., Guimarães, E.F., Carreira, L.M.M., Maia, J.G.S., 2011. Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* L.C. Rich. Biochemical Systematics and Ecology 39, 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.05.021>

Andrade, E.H.A., Carreira, L.M.M., da Silva, M.L., da Silva, J.D., Bastos, C.N., Souza, P.J., Guimarães, E.F., Maia, J.G.S., 2008. Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. Chemistry and Biodiversity 5, 197–208.

Andrade, E.H.A., Guimarães, E.F., Maia, J.G.S., 2009. Chemical variability in essential oils of *Piper* species from the Amazon. Faculty of Chemical Engineering - Federal University of Pará. ISBN: 978-85-63005-00-7, 448p.

Anjali, C., Sharma, Y., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., 2012. Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsion-a potent larvicidal agent against *Culex quinquefasciatus*. Pest Management Science 68, 158–163. <https://doi.org/10.1002/ps.2233>

Araujo, C.A. De, Camara, C.A.G., Moraes, M.M. De, José, G., Vasconcelos, N. De,

Pereira, M.R., Zartman, C.E., 2019. Chemical compositions of essential oil of *Piper* species from atlantic forest of amazonia, Brazil. *Records of Natural Products*. 4, 324–332.

Assis, A.L., 2012. Secagem, embalagem e armazenamento de folhas de pitangueira. Universidade Federal do Paraná 74. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Assis, L.M. de, Zavareze, E. da R., Prentice-Hernández, C., Souza-Soares, L.A. de, 2012. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology* 15, 99–109. <https://doi.org/10.1590/s1981-67232012005000004>

Autran, E.S.; Neves, I.A.; Silva, C.S.B.; Santos, G.K.N.; Câmara, C.A.G.; Navarro, D.M.A.F. 2009. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* essential oil from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). *Bioresource technology*. 100: 2284-2288.

Balasubramani, S., Moola, A.K., Vivek, K., Kumari, B.D.R., 2018. Microbial pathogenesis formulation of nanoemulsion from leaves essential oil of *Ocimum basilicum* L. and its antibacterial, antioxidant and larvicidal activities (*Culex quinquefasciatus*) 125, 475–485. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.10.017>

Baldissera, M.D., Souza, C.F., Aleksandro, S., Velho, M.C., Ourique, A.F., Baldisserotto, B., 2020. Dietary supplementation with nerolidol-loaded nanospheres increases survival rates, reduces bacterial loads and prevents oxidative damage in brains of *Nile tilapia* experimentally infected by *Streptococcus*. *Microbial Pathogenesis* 141, 103989. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.103989>

Baranitharan, M., Dhanasekaran, S., Kovendan, K., Murugan, K., Gokulakrishnan, J., Benelli, G., 2017. *Coleus aromaticus* leaf extract fractions: A source of novel ovicides, larvicides and repellents against *Anopheles*, *Aedes* and *Culex* mosquito vectors? *Process Safety and Environmental Protection* 106: 23-33.

Barreto, C.F., Cavasin, G.M., Garcia da Silva, H.H., Da Silva, I.G., 2007. Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico *Desapindus saponaria* Lin (Sapindaceae). *Revista de Patologia Tropical* 35, 37–57. <https://doi.org/10.5216/rpt.v35i1.1891>

Barros, R.A., Santos, G.K.N., Dutra, K.A., Câmara, C.A.G., Lira, D.D., Gusmão, N.B.,

Navarro, D.M.A.F., 2012. Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): Chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. *Industrial Crops and Products* 40: 254-260.

Bastos, R.M. de P.B., 2006. Nanotecnologia: Uma revolução no desenvolvimento de novos produtos. *Quimica Nova* 35, 1872–1878. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000900030>

Belo, M.; Barbosa, J.C.; Pereira, P.S.; Bertoni, B.W.; Zingaretti, S.M.; Beleboni, R.O. 2009. Evaluation of the bioinsecticidal effect of extracts of *Tabernaemontona catharinensis* A.DC. (Apocynaceae) and *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae) on *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) (Gupta, 1970). *Brazilian Journal of Biosciences*. 7: 235-239

Benelli, G., Caselli, A., Canale, A., 2017. Nanoparticles for mosquito control: Challenges and constraints. *Journal of King Saud University - Science* 29, 424–435. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.08.006>

Bezerra, J.W.A., Costa, A.R., da Silva, M.A.P., Rocha, M.I., Boligon, A.A., da Rocha, J.B.T., Barros, L.M., Kamdem, J.P. 2017. Chemical composition and toxicological evaluation of *Hyptis suaveolens* (L.) Poiteau (Lamiaceae) in *Drosophila melanogaster* and *Artemia salina*. *South African Journal of Botany*. 113: 437-442.

Bianco, E.M., Pires, L., Santos, G.K.N., Dutra, K.A., Reis, T.N.V., Vasconcelos, E.R.T.P.P., Cocentino, A.L.M., Navarro, D.M.A.F., 2013. Larvicidal activity of seaweeds from northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene against the dengue mosquito (*Aedes aegypti*). *Industrial Crops and Products* 43, 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.032>

Braga, I.A., Valle, D., 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 16, 279–293. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742007000400006>

Branquinho, L.S.; Santos, J.A.; Cardoso, G.A.L.; Mota, J.S.; Junior, U.L.; Kassuya, C.A.L.; Arena, A.C. 2017. Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from *Piper glabratum* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 198: 372-378.

Burci, L.M. 2011. Evaluation of the gastroprotective potential of the dichloromethane and piplartin fraction obtained from fruits of *Piper tuberculatum* Jacq. in rats. Dissertation. Federal University of Parana. 121p.

Cadavid-Restrepo, G., Sahaza, J., Orduz, S., 2012. Treatment of an *Aedes aegypti* colony with the Cry11Aa toxin for 54 generations results in the development of resistance. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 107, 74–79.

Cardoso, C.T., Silva, M.A., Luiz, H.S., 2012. Evaluation of larvicidal activity of the methanolic extracts of *Piper alatabaccum* branches and *P. tuberculatum* leaves and compounds isolated against *Anopheles darlingi*. 22: 979–984.

Carneiro, S.B., Oliveira, A.C., Silva, W.C. 2014. Caracterização química e bioatividade do óleo essencial de *Piper alatipetiolatum* sobre o crescimento micelial do fitopatógeno *Mycospharella fijiensis*. II Semana Acadêmica do Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Amazonas.

Carolina, B., Porto, Z., Carolina, B., Porto, Z., 2016. Atividade ovicida e larvica de óleos essenciais em *Sarconesia chlorogaster* (Diptera: Calliphoridae). Dissertação. Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciência da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. RS, Brasil. 87p.

Carreño Otero, A.L., Palacio-Cortés, A.M., Navarro-Silva, M.A., Kouznetsov, V. V., Duque L., J.E., 2018. Behavior of detoxifying enzymes of *Aedes aegypti* exposed to girsensohnine alkaloid analog and *Cymbopogon flexuosus* essential oil. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology* 204, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.11.002>

Carreño, A.L., Vargas, L.Y., L., J.E.D., Kouznetsov, V. V, 2014. Design, synthesis, acetylcholinesterase inhibition and larvicidal activity of girsensohnine analogs on *Aedes aegypti*, vector of dengue fever. *European Journal of Medicinal Chemistry* 78, 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.067>

Carvalho, S., Magalhães, M. de A.F.M., Medronho, R. de A., 2017. Analysis of the spatial distribution of dengue cases in the city of Rio de Janeiro, 2011 and 2012. *Revista de Saúde Pública* 51, 79. <https://doi.org/10.11606/S1518-8787.2017051006239>

Casanova, J., Cavalli, J.F., Tomi, F., Lizzani-Cuvelier, L., 2005. Isolation and structure

elucidation of ishwarol B. Magn. Resom. Chem. 43: 492-493.

Cerqueira, C., Barradas, T. 2013. Nanoemulsões: princípios e aplicações em cosmetologia. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano. 46p.

Chaiyana, W., Saeio, K., Hennink, W.E., Okonogi, S., 2010. Characterization of potent anticholinesterase plant oil based microemulsion. International Journal of Pharmaceutics 401, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.005>

Che-mendoza, A., Penilla, R.P., Rodríguez, D.A., 2009. Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: A review. African Journal of Biotechnology 8, 1386–1397.

Chen, J., Wang, T., Xu, S., Lin, A., Yao, H., Xie, W., Zhu, Z., Xu, J., 2017. Novel hybrids of natural β -elemene bearing isopropanolamine moieties: Synthesis, enhanced anticancer profile and improved aqueous solubility. Fitoterapia 120, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.05.002>

Cheng, S., Liu, J., Huang, C., Hsui, Y., 2009. Insecticidal activities of leaf essential oils from *Cinnamomum osmophloeum* against three mosquito species. Bioresource Technology 100, 457–464. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.030>

Cheng, S.S., Lin, C.Y., Chung, M.J., Liu, Y.H., Huang, C.G., Chang, S.T., 2013. Larvicidal activities of wood and leaf essential oils and ethanolic extracts from *Cunninghamia konishii* Hayata against the dengue mosquitoes. Industrial Crops and Products 47, 310315. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.03.016>

Christ, J.A., Sarnaglia-Junior, V.B., Barreto, L.M., Guimarães, E.F., Garbin, M.L., Carrijo, T.T., 2016. The genus *Piper* (piperaceae) in the mata das flores state park, Espírito Santo, Brazil. Rodriguesia 67, 1031–1046. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201667413>

Christofoli, M., Costa, E.C.C., Bicalho, K.U., de Cássia Domingues, V., Peixoto, M.F., Alves, C.C.F., Araújo, W.L., de Melo Cazal, C., 2015. Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae) in *Bemisia tabaci* populations. Industrial Crops and Products 70, 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.025>

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras; norma aprovada - Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

Coelho, W.M.D., de Carvalho Apolinário Coelho, J., Bresciani, K.D.S., Buzetti, W.A.S., 2017. Biological control of *Anopheles darlingi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae using shrimps. *Parasite Epidemiology and Control* 2, 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2017.05.002>

Coitinho, R. L. B. C.; Oliveira, J. V.; Gondim Junior, M. G. C.; Câmara, C. A. G. Efeito residual de inseticidas naturais no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. em milho armazenado. *Revista Caatinga*, v.19, n.2, p.183-191, 2006.

Coitinho, R. L. B. C.; Oliveira, J. V.; Gondim Junior, M. G. C.; Câmara, C. A. G. Persistência de óleos essenciais em milho armazenado, submetido à infestação de gorgulho do milho. *Revista Ciência Rural*. v.40, n.7, 201

Conde-hernández, L.A., Espinosa-victoria, J.R., Guerrero-beltrán, J.Á., 2017. Supercritical extraction of essential oils of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. *The Journal of Supercritical Fluids* 127, 97–102.

Conde-Hernández, L.A., Guerrero-Beltrán, J.Á., 2014. Total phenolics and antioxidant activity of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. *Food Chemistry* 142, 455–460. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.078>

Consoli, R.A.G.B., Oliveira, R.L. De, 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora FIOCRUZ, 228p. ISBN 85-85676-03-05.

Costa, E.V., Teixeira, S.D., Marques, F.A., Duarte, M.C.T., Delarmelina, C., Pinheiro, M.L.B., Trigo, J.R., Maia, B.H.L.N.S., 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatteropsis* species. *Phytochemistry*. 69:

1895-1899. doi:10.1016/j.phytochem.2008.03.005

Costa, L.C.D.B., Corrêa, R.M., Cardoso, J.C.W., Pinto, J.E.B.P., Bertolucci, S.K.V., Ferri, P.H., 2005. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. *Horticultura Brasileira* 23, 956–959. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362005000400019>

Crucho, C.I.C., Barros, M.T., 2017. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering C* 80, 771–784. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.06.004>

Da Silva, J.K.R., Pinto, L.C., Burbano, R.M.R., Montenegro, R.C., Guimarães, E.F., Andrade, E.H.A., Maia, J.G.S., 2014. Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Industrial Crops and Products* 58, 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.04.006>

Da Silva, M.F.R., Bezerra-Silva, P.C., de Lira, C.S., de Lima Albuquerque, B.N., Agra Neto, A.C., Pontual, E.V., Maciel, J.R., Paiva, P.M.G., Navarro, D.M. do A.F., 2016. Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae). *Experimental Parasitology* 165, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.03.017>

Dahham, S.S., Tabana, Y.M., Iqbal, M.A., Ahamed, M.B.K., Ezzat, M.O., Majid, A.S.A., Majid, A.M.S.A., 2015. The Anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules* 11808–11829. <https://doi.org/10.3390/molecules200711808>

Davis, E.M., Tsuji, J.U.N., Davis, G.D., Pierce, M.L., Essenberg, M., 1996. Purification of (+)- δ -cadinene synthase, a sesquiterpene cyclase from bacteria-inoculated cotton foliar tissue. *Phytochemistry* 41, 1047–1055.

Davies, N.W., 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *J. Chromatogr. A* 503: 1-24 [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)81487-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)81487-4)

de Almeida Vaucher, R., Giongo, J.L., Bolzan, L.P., Côrrea, M.S., Fausto, V.P., Alves, C.F. dos S., Lopes, L.Q.S., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Moreira, A.P., Brandelli, A., Raffin, R.P., Santos, R.C.V., 2015. Antimicrobial activity of nanostructured Amazonian

oils against *Paenibacillus* species and their toxicity on larvae and adult worker bees. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 18, 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2015.01.004>

de Castro, F.P., Martins, W.F.S., de Lucena Filho, M.L., de Almeida Almeida, R.P., Beserra, E.B., 2013. Ciclos de vida comparados de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) do semiárido da Paraíba. *Iheringia - Serie Zoologia* 103, 118–123. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212013000200006>

de Souza, M.A., da Silva, L., Macêdo, M.J.F., Lacerda-Neto, L.J., dos Santos, M.A.C., Coutinho, H.D.M., Cunha, F.A.B., 2019. Adulticide and repellent activity of essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) – A review. *South African Journal of Botany* 124, 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.05.007>

Dechtawewat, T., Paemanee, A., Roytrakul, S., Songprakhon, P., Limjindaporn, T., Yenchitsomanus, P. thai, Saitornuang, S., Puttikhunt, C., Kasinrer, W., Malasit, P., Noisakran, S., 2016. Mass spectrometric analysis of host cell proteins interacting with dengue virus nonstructural protein 1 in dengue virus-infected HepG2 cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1864, 1270–1280. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.04.008>

Devi, U., Bora, D., 2017. Growth inhibitory effect of phenolic extracts of *Ziziphus jujuba* Mill. in dengue vector *Aedes aegypti* (L) in parent and F1 generation. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 10, 787–791. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.08.003>

Dias, L.B.A., Almeida, S.C.L., Haes, T.M., Mota, L.M., Roriz-Filho, J.S., 2010. Dengue: transmission, clinical features, diagnosis and treatment. *Medicina* 43: 143-152.

Ding, F., Fu, J., Hao, M., Lin, G., 2018. Mapping the spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Acta Tropica* 178, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.020>

Do Nascimento, M.E., Zoghbi, M. das G.B., Brasil Pereira Pinto, J.E., Vilela Bertolucci, S.K., 2012. Chemical variability of the volatiles of *Copaifera langsdorffii* growing wild in the Southeastern part of Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology* 43, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.02.003>

Domínguez, J.A., Pascual-pineda, L.A., Azuara, E., Jim, M., Beristain, C.I., 2018. Elaboration and characterization of O / W cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and black

pepper (*Piper nigrum*) emulsions 77, 902–910.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.037>

Dris, D., Tine-Djebbar, F., Bouabida, H., Soltani, N., 2017. Chemical composition and activity of an *Ocimum basilicum* essential oil on *Culex pipiens* larvae: Toxicological, biometrical and biochemical aspects. South African Journal of Botany 113, 362–369.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.09.013>

Ebi, K.L., Nealon, J., 2016. Dengue in a changing climate. Environmental Research 151, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.07.026>

Elga, C.T., 2018. Atividade larvica de *Piper alatipetiolatum* e *Piper purusum* contra *Aedes albopictus* SKUSE, 1894 (Diptera: Culicidae). Dissertação. Universidade do Estado do Amazonas. Escola Normal Superior. Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas. 49p.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

Epidemiol, B., 2019. Boletim Epidemiológico 50, 1–18.

Espirito, A., Pereira, S., Mayara, P., Luis, J., Caixeta, H., Fernandes, L., 2017. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Chitosan nanoparticles as carrier systems for the plant growth hormone gibberellic acid 150, 141–152.

Etchepare, E., Alicia, J., Walter, W., 2015. Culicidae (Diptera) community structure, spatial and temporal distribution in three environments of the province of Chaco, Argentina. Acta Tropica. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.002>

European Center for Disease Prevention and Control (ECDC). 2014. Rapid risk assessment: Zika virus infection outbreak French Polynesia, 14 February 2014. Stockholm.

Fa Xua, Dongyu Gu, Miao Wang, Lin Zhub, Tingting Chu, Yuna Cui, Jing Tian, Yi Wang, Y.Y., 2017. Screening of the potential α -amylase inhibitor in essential oil from *Cedrus deodora* cones. Industrial Crops and Products 103, 251–256.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.006>

Fang, Y., Kang, Y., Zou, H., Cheng, X., Xie, T., Shi, L., 2018. Fitoterapia β -elemene

attenuates macrophage activation and inflammatory factor production via crosstalk with β -catenin signaling pathway. *Fitoterapia* 124, 92-102.

Ferreira, F.T.R.; Vendramim, J.D.; Forin, M.R. 2012. Bioactivity of neen nanoformulations on tomato noth. *Rural Science*. 43: 1347-1353.

Ferreira-Mansur, J., Moreira, M.F., Mansur, J.F., 2012. Resistência e inseticidas: Estratégias, desafios e perspectivas no controle dos insetos. Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Entomologia Molecular. 12p.

Filho, J.D.E.M., 2019. Desenvolvimento de nanoemulsão de geraniol e óleo essencial da palmarosa (*Cymbopogon martinii*) e sua ação inibitória sobre linhagens de *Cutibacterium*. *Brazilian Journal of Natural Sciencies* 2, 643-651.

Forgiarini, A., Esquena, J., González, C., Solans, C., 2001. Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature. *Langmuir* 17, 2076–2083. <https://doi.org/10.1021/la001362n>

Fornari, T., Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, M.R., Reglero, G., 2012. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A* 1250, 34–48. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.051>

Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), 2017. Research improves the vaccine against yellow fever. Available in: <<https://portal.fiocruz.br/en/node/1596#main-content>: Access in: 29/06/2017.

Furtado, I., Cristhina, P., Xavier, N., Venhofen, L., Tavares, M., Alves, F., 2014. Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis in blood of newborns with suspected nosocomial infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 56, 77–80. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000100012>

Furtado, R.F.; Lima, M.G.A.; Neto, M.A.; Bezerra, J.N.S.; Silva, M.G. 2005. Larvicidal activity of essential oils against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*. 34: 843-847.

Ganguly, A.K., Gopinath, K.W., Govindachari, T.R., Nagarajan, K., Parthasarathy, P.C., 1936. Ishwarone, a novel tetracyclic sesquiterpene. *Tetrahedron Letters*. 3: 133-136

Gasparin, P.P., Christ, D., Coelho, S.R.M., 2017. Secagem de folhas *Mentha piperita* em

leito fixo utilizando diferentes temperaturas e velocidades de ar. *Revista Ciencia Agronomica* 48, 242–250. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20170028>

Geromini, K.V.N.; Roratto, F.B.; Ferreira, F.G.; Polido, P.B.; Souza, S.G.H.; Valle, J.S.; Colauto, N.B.; Linde, G.A. 2012. Antimicrobial activity of essential oils of medicinal plants. *Archives of Veterinary Sciences*. 15: 127-131.

Girard, E.A., 2007. Essential oil, volume, biomass and yield from *Pseudocaryophyllus landrum*. *Revista Acadêmica* 5, 147–165.

Gogosz, A.M.; Boeger, M.R.T.; Negrelle, R.R.B.; Bergo, C. 2012. Comparative leaf anatomy of nine species of the genus *Piper* (Piperaceae). *Rodriguésia*. 63: 405-417.

Gokulakrishnan, J., Kuppusamy, E., Shanmugam, D., Appavu, A., Kaliyamoorthi, K., 2013. Chemical compounds against medically important human vector mosquitoes pupicidal and repellent activities of *Pogostemon cablin* essential oil. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 3, 26–31. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(13\)60006-7](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(13)60006-7)

Gouvea, C.A.K., 2013. Determinação do Teor de Umidade em Folhas de Tabaco através da Técnica de Micro-Ondas. 4th International workshop advances in cleaner production. São Paulo, Brazil.

Gouvêa, M.M., 2017. Time-spatial model on the dynamics of the proliferation of *Aedes aegypti*. *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation* 44, 130–143. <https://doi.org/10.1016/j.cnsns.2016.07.025>

Govindarajan, M., Benelli, G., 2016a. Eco-friendly larvicides from Indian plants: Effectiveness of lavandulyl acetate and bicyclogermacrene on malaria, dengue and Japanese encephalitis mosquito vectors. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 133, 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.07.035>

Govindarajan, M., Benelli, G., 2016b. α -Humulene and β -elemene from *Syzygium zeylanicum* (Myrtaceae) essential oil: highly effective and eco-friendly larvicides against *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus*, and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research* 115, 2771–2778. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5025-2>

Govindarajan, M., Mathivanan, T., Elumalai, K., Krishnappa, K., Anandan, A., 2011. Ovicidal and repellent activities of botanical extracts against *Culex quinquefasciatus*,

Aedes aegypti and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 1, 43–48. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60066-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60066-X)

Govindarajan, M., Rajeswary, M., Hoti, S.L., Bhattacharyya, A., Benelli, G., 2016. Eugenol, α -pinene and β -caryophyllene from *Plectranthus barbatus* essential oil as eco-friendly larvicides against malaria, dengue and japanese encephalitis mosquito vectors. Parasitology Research 115, 807–815. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4809-0>

Govindarajan, M., Rajeswary, M., Senthilmurugan, S., Vijayan, P., Alharbi, N.S., Kadaikunnan, S., Khaled, J.M., Benelli, G., 2018. Larvicidal activity of the essential oil from *Amomum subulatum* Roxb. (Zingiberaceae) against *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae), and non-target impact on four mosquito natural enemies. Physiological and Molecular Plant Pathology 101, 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.01.003>

Grando, T.H., 2015. Ação in vitro ovicida e larvicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, livre e nanoestruturado, e terpinen-4-ol sobre o *Haemonchus contortus*. Dissertação. Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências Rurais. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. 53p.

Grob, J., Achenbach, H., Portecop, J., 1984. Ishwarol, the main sesquiterpene in *Piper amalago*. Planta Med. 50: 528-9 doi: 10.1055/s-2007-969793

Guerrini, A., Sacchetti, G., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Andreotti, E., Tognolini, M., Maldonato, M.E., Bruni, R., 2009. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. Toxicol. Pharmacol. 27, 39-48. doi:10.1016/j.etap.2008.08.002

Guimarães, L.G.D.L., Cardoso, G., Zacaroni, L.M., Morais, A.R. De, 2008. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim limão *Cymbopogon citratus*. Química Nova 31, 1476–1480.

Gupta, J., Ali, M., Pillai, K.K., Velasco-Negueruela, A., Pérez-Alonso, M.J., Contreras, F., 1997. The occurrence of ishwarane and ishwarone in the root oil of *Corallacarpus epigaeus* Benth. ex Hook. f. J. Essent. Oil Res. 9: 667-672 10.1080/10412905.1997.9700808

Gusmão, N.M.S.; Oliveira, J.V.; Navarro, D.M.A.F.; Dutra, K.A.; Silva, W.A.; Wanderley, M.J.A. 2013. Contact and fumigant toxicity and repellency of *Eucalyptus citriodora* Hook.,

Eucalyptus staigeriana F., *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Foeniculum vulgare* Mill. Essential oils in the management of *Collosobruchus maculatus* (FABR.) (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae). Journal of Stored Products Research. 54: 41-47

Guterres, S.S., Alves, M.P., Pohlmann, A.R., 2007. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. Drug Target Insights 2, 117739280700200. <https://doi.org/10.1177/117739280700200002>

Habid, M. 2003. Fisiologia de insetos. UNICAMP. 168p.

Haddi, K., Tomé, H.V. V, Du, Y., Valbon, W.R., Nomura, Y., Martins, G.F., Dong, K., Oliveira, E.E., 2017. Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: a potential challenge for mosquito control. Nature Publishing Group 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep46549>

Harapan, H., Anwar, S., Setiawan, A.M., Sasmono, R.T., 2016. Dengue vaccine acceptance and associated factors in Indonesia: A community-based cross-sectional survey in Aceh. Vaccine 34, 3670-3675. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.05.026>

Hernández-Morales, A., Arvizu-gómez, J.L., Carranza-álvarez, C., Gómez-luna, B.E., Alvarado-sánchez, B., Ramírez-chávez, E., Molina-torres, J., 2015. Larvicidal activity of affinin and its derived amides from *Heliopsis longipes* A . Gray Blake against *Anopheles albimanus* and *Aedes aegypti*. Journal of Asia-Pacific Entomology 18, 227–231. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2014.09.004>

Honório, N.A., Câmara, D.C.P., Calvet, G.A., Brasil, P., 2015. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. Cadernos de Saúde Pública 31, 906–908. <https://doi.org/10.1590/0102-311XPE020515>

Ioos, S., Mallet, H.P., Leparc Goffart, I., Gauthier, V., Cardoso, T., Herida, M., 2014. Current zika virus epidemiology and recent epidemics. Medecine et Maladies Infectieuses 44, 302–307. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.04.008>

Jin, L., Liu, X., Bian, C., Sheng, J., Song, Y., Zhu, Y., 2019. Fabrication linalool-functionalized hollow mesoporous silica spheres nanoparticles for efficiently enhance bactericidal activity. Chinese Chemical Letters.

Kabir, K.E., Choudhary, M.I., Ahmed, S., Tariq, R.M., 2013. Growth-disrupting, larvicidal

and neurobehavioral toxicity effects of seed extract of *Seseli diffusum* against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 90, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.12.028>

Kala, S, Sogan, N., Verma, P., Naik, S.N., Agarwal, A., Patanjali, P.K., Kumar, J., 2019. Nanoemulsion of cashew nut shell liquid bio-waste: Mosquito larvicidal activity and insights on possible mode of action. *South African Journal of Botany* 127, 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.10.006>

Kala, S., Naik, S.N., Patanjali, P.K., Sogan, N., 2019. Neem oil water dispersible tablet as effective larvicide, ovicide and oviposition deterrent against *Anopheles culicifacies*. *South African Journal of Botany* 123, 387–392. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.03.033>

Kerdudo, A., Gonnot, V., Ellong, E.N., Boyer, L., Chandre, F., Adenet, S., Rochefort, K., Michel, T., Fernandez, X., 2016. Composition and bioactivity of *Pluchea carolinensis* (Jack.) G. essential oil from Martinique. *Industrial Crops and Products* 89, 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.076>

Kordali, S., Kesdek, M., Cakir, A., 2007b. Toxicity of monoterpenes against larvae and adults of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Industrial Crops and Products* 26, 278–297. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.03.009>

Kothandan, S.; Swaminathan, R. 2014. Evaluation of *in vitro* antiviral activity of *Vitex negundo* L. *Hyptis suaveolens* (L) poit., *Decalepis hamiltonii* Wight & Arn., to chikungunya virus. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4: s111-s115.

Kovendan, K., Murugan, K., Vincent, S., Barnard, D.R., 2012. Mosquito larvicidal properties of *Orthosiphon thymiflorus* (Roth) Sleesen. (Family: Labiatae) against mosquito vectors, *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 5, 299–305. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60043-1](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60043-1)

Krishnappa, K., Dhanasekaran, S., Elumalai, K., 2012. Larvicidal, ovicidal and pupicidal activities of *Gliricidia sepium* (Jacq.) (Leguminosae) against the malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Culicidae: Diptera). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 5, 598–604. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60124-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60124-2)

- Kweka, E.J., Lima, T.C., Marciele, C.M., Souza, D.P., 2016. Larvicidal efficacy of monoterpenes against the larvae of *Anopheles gambiae*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 6: 290-294. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.03.001>
- Lago, J.H.G., Oliveira, A., Guimarães, E.F., Kato, M., 2007. 3-ishwarone and 3-ishwarol, rare sesquiterpenes oil from leaves of *Peperomia oreophila* Hensch. J. Braz. Chem. Soc. 18: 638-642 doi.org/10.1590/S0103-50532007000300022
- Let, A., Zavareze, R., 2012. Revisão : Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos Review: Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. Brazilian Journal of Food Technology 15, 99–109.
- Liss, J.G.B., Brito, L.P., Garcia, G.A., Araki, A.S., Bruno, R.V., Lima, J.B.P., Valle, D., Martins, A.J., 2014. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys *Kdr* mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. Parasites & Vectors 7: 25.
- Lo Presti, A., Cella, E., Angeletti, S., Ciccozzi, M., 2016. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of Chikungunya virus: An updating review. Infection, Genetics and Evolution 41, 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.006>
- Lobato, A.K.S.; Santos, D.G.C.; Oliveira, F.C.; Gouvea, D.D.S.; Torres, G.I.O.; Júnior, J.A.L.; Neto, C.F.O.; Silva, M.H.L. 2007. Action of essential oils of *Piper aduncum* L. used as a natural fungicide in the treatment of seeds of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Brazilian Journal of Biosciences. 5: 915-917.
- Lopes, A.C.R., Oliveira, J.V. Silva, M.A.L. 2010. Efeito residual de óleos essenciais e fixo no controle preventivo e curativo de *Callosobruchus maculatus* (Fabri.) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi armazenados. Universidade Federal de Pernambuco. 8p.
- Machado, L.A.; Silva, V.B.; Oliveira, M.M. 2007. Use of plants extracts in pest control in horticulture crops. Biological. 69: 103-106.
- Machado, M.P.; Bergo, C.L.; Deschamps, C.; Bizzo, H.R.; Biasi, L.A. 2013. Effect of the natural and artificial drying of the leaf biomass of *Piper hispidinervum* on the chemical composition of the essential oil. Semina: Agrarian Sciences. 34: 265-270.

Machado, N.S.O.; Pereira, F.G.; Santos, P.R.D.; Costa, C.G.; Guimarães, E.F. 2015. Comparative anatomy of the leaves of *Piper lepturum* (Kunth) C. DC. var. *lepturum* and *Piper lepturum* var. *angustifolium* (C.DC) Yunk. Hoehnea. 42: 1-8.

Machado, T., Silva, D.A., 2018. Estudos taxonômicos em peperomia Ruiz & Pav. (Piperaceae) no estado do Paraná, Curitiba. Dissertação. Universidade Federal de Paraná. 175p.

Maciel, D.S.A.; Freitas, V.P.; Conserva, G.A.A.; Alexander, T.R.; Purisco, S.U.; Tempone, A.G.; Melhem, M.C.; Kato, M.J.; Guimarães, E.F.; Lago, J.H.G. 2016. Bioactivity guided isolation of laevicarpin, an antitrypanosomal and anticryptococcal lactam from *Piper larvicarpum* (Piperaceae). Phytoterapy. 111: 24-28

Magalhães, L.A.M.I., Da Paz Lima, M., Marques, M.O.M., Facanali, R., Da Silva Pinto, A.C., Tadei, W.P., 2010. Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae of essential oils from four *Guarea* species. Molecules 15, 5734–5741. <https://doi.org/10.3390/molecules15085734>

Mao, L., Xu, D., Yang, J., Yuan, F., Gao, Y., Zhao, J., 2009. Effects of small and large molecule emulsifiers on the characteristics of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization. Food Technology and Biotechnology 9862, 336–342.

Masaninga, F., Muleba, M., Masendu, H., Songolo, P., Mweene-Ndumba, I., Mazaba-Liwewe, M.L., Kamuliwo, M., Ameneshewa, B., Siziya, S., Babaniyi, O.A., 2014. Distribution of yellow fever vectors in Northwestern and Western Provinces, Zambia. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 7, S88–S92. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60210-8](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60210-8)

Matasyoh, J.C., Wathuta, E.M., Kariuki, S.T., Chepkorir, R., 2011. Chemical composition and larvicidal activity of *Piper capense* essential oil against the malaria vector, *Anopheles gambiae*. Journal of Asia-Pacific Entomology 14, 26–28. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2010.11.005>

Mathalaimuthu, B., Shanmugam, D., Kovendan, K., Kadarkarai, M., Jayapal, G., Benelli, G., 2017. *Coleus aromaticus* leaf extract fractions: A source of novel ovicides, larvicides and repellents against *Anopheles*, *Aedes* and *Culex* mosquito vectors? Process Safety and Environmental Protection 106, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.12.003>

McSweegan, E., Weaver, S.C., Lecuit, M., Frieman, M., Morrison, T.E., Hrynkow, S., 2015. The Global Virus Network: Challenging chikungunya. *Antiviral Research* 120, 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.003>

Mehlhorn, H., Abdel-ghaffar, F., Semmler, M., 2011. Ovicidal effects of a neem seed extract preparation on eggs of body and head lice. *Parasitology Reports* 109, 1299–1302. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2374-8>

Melo-Santos, M.A.V., Varjal-Melo, J.J.M., Araújo, A.P., Gomes, T.C.S., Paiva, M.H.S., Regis, L.N., Furtado, A.F., Magalhaes, T., Macoris, M.L.G., Andrighetti, M.T.M., Ayres, C.F.J., 2010. Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Tropica* 113, 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.10.015>

Mendes, L.A., Martins, G.F., Valbon, W.R., da Silva de Souza, T., Menini, L., Ferreira, A., da Silva Ferreira, M.F., 2017. Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of *Guava* on *Aedes aegypti* L. *Industrial Crops and Products* 108, 684–689. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.034>

Mevy, J.P., Bessiere, J.M., Pelissier, Y., Masotti, V., Ruzzier, M., Rabier, J., Viano, J., 2004. Composition of the volatile constituents of the aerial parts of endemic plant of Ivory Coast, *Monanthotaxis capea* (E.G. & A. Camus) Verdc. *Flavour Fragr. J.* 19: 526-528. DOI: 10.1002/ffj.1329

Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnan, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., Aughlin, J. 1982. A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medical Plant Research*. 45, n.1, p. 31-34.

Ministério da Saúde (MS), 2020a. Malária: o que é, causas, sintomas, tratamento e diagnóstico e prevenção. <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria>. Acessado em 28 01 2020b.

Ministério da Saúde (MS), 2020b. Casos de malária no Brasil. iabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2019-04/casos-de-malaria-no-brasil-tem-queda-de-38. Acessado em 28 01 2020c.

Ministério da Saúde, 2016. Critérios para orientar o processo de decisão para introdução da vacina contra a dengue no Programa Nacional de Imunizações (PNI). Relatório técnico

Nº. 01/2016/CGPNI/DEVIT/SVS/MS. 20p.

Ministério da Saúde, 2020c. Monitoramentodos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 21, 2020. Boletim Epidemiológico 22, volume 51.

Montefuscoli, A.R., Omar, J., González, W., Palma, S.D., Ferrero, A.A., 2013. Design and development of aqueous nanoformulations for mosquito control. Parasitology Reports <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3710-y>

Morais, L.A.S. 2009. Influence of abiotic factors on the chemical composition of essential oils. Brazilian horticulture. 27: 110-117.

Mullally, M.; Cayer, C.; Muhammad, A.; Walshe-Roussel, B.; Ahmed, F.; Sanchez-Vindas, P.E.; Rojas, M.O.; Merali, Z.; Cal, V.; Durst, T.; Trudeau, V.L.; Arnason, J.T. 2016. Anxiolytic activity and active principles of *Piper amalago* (Piperaceae), a medicinal plant used by the Q'eqchi Maya to treat susto, a culture-bound illness. Journal of Ethnopharmacology. 185: 147-154.

Munusamy, R.G., Appadurai, D.R., Kuppusamy, S., Michael, G.P., Savarimuthu, I., 2016. Ovicidal and larvicidal activities of some plant extracts against *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Asian Pacific Journal of Tropical Disease 6, 468–471. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(16\)61070-8](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(16)61070-8)

Musso, D., Roche, C., Nhan, T.X., Robin, E., Teissier, A., Cao-Lormeau, V.M., 2015. Detection of Zika virus in saliva. Journal of Clinical Virology 68, 53–55. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.04.021>

Myszka, K., Schmidt, M.T., Majcher, M., Juzwa, W., Czaczyk, K., 2017. β -Caryophyllene-rich pepper essential oils suppress spoilage activity of *Pseudomonas fluorescens* KM06 in fresh-cut lettuce. LWT - Food Science and Technology 83, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.012>

Natascha, O., Correia, R.S., Håkansson, M., Stockmann, J., Sander, D., Bandow, J., Senges, C.H.R., Logan, D.T., Kourist, R., 2019. Discovery of three novel sesquiterpene synthases from *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882 and crystal structure of an α - eudesmol synthase. Journal of Biotechnology 297, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.03.006>

National Institute of Standards and Technology (NIST), 2011. Standard reference database 69. NIST Chemistry WebBook. <http://webbook.nist.gov/chemistry>. Accessed 21. January 2016.

Nel, A.E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M. V, Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., Thompson, M., 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. Nature Publishing Group 8, 543–557. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>

Nogueira, A.J.A., Domingues, I., Agra, A.R., Monaghan, K., Amadeu, M.V.M., 2010. Critical Review: Cholinesterase and glutathione-S-transferase activities in freshwater. Environmental Toxicology and Chemistry 29, 5–18. <https://doi.org/10.1002/etc.23>.

Novaes, A.S.; Mota, J.S.; Barros, M.E. 2010. A bibliographic study the possível antilithiasic activity of *Piper amargo* (Piperaceae). III Symposium Brazil-Japan Interchange in sustainability: A challenger of humanity. Campo Grande-MS, 08 a 12 de outubro de 2010. 4p.

Nyamoita, M.G., Ester, I., Zakaria, M.H., Wilber, L., Bwire, O.J., Ahmed, H., 2013. Comparison of the effects of extracts from three *Vitex* plant species on *Anopheles gambiae* (Diptera : Culicidae) larvae. Acta Tropica 127, 199–203. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.05.003>

Nyari, N., Mann, H.S., Sharma, S., Pandey, S.N., Dhole, T.N., 2016. Identification and genetic characterization of chikungunya virus from *Aedes* mosquito vector collected in the Lucknow district, North India. Acta Tropica 158, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.02.019>

Okonogi, S., Chaiyana, W., 2012. Enhancement of anti-cholinesterase activity of *Zingiber cassumunar* essential oil using a microemulsion technique. Drug Discov. Ther. 6:249–255 6, 249–255. <https://doi.org/10.5582/ddt.2012.v6.5.249>

Oliveira, A.C., Nunomura, R.C.S., Roque, R.A., 2017b. Potencial larvicida do extrato de *Piper alatiptetiolatum* contra formas imaturas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). II Encontro de Química da Região Norte - SBQNorte.

Oliveira, A.C., Sá, I.S., Mesquita, R.S., Pereira, B.L., Pocrifka, L.A., Souza, T.P., Amado, J.R.R., Sanches, E.A., Azevedo, S.G., Roque, R.A, Tadei, W.P., Nunomura, R.C.S. 2019b.

Nanoemulsion loaded with *Piper* oil (Piperaceae): Alternative method in the control *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1972) (Diptera: Culicidae). Latin American Society of Vector Ecology - LASOVE

Oliveira, A.C., Simões, R.C., Benchimol, T.M., Lima, G. Figueira, E.A.C., Roque, R.A., Tadei, W.P., Nunomura, R.C.S. 2019a. Larvicidal activity of essential oil of *Piper alatipetiolatum* (Piperaceae) against malaria vectors. Latin American Society of Vector Ecology - LASOVE.

Oliveira, A.C.; Brito, R.S.; Roque, R.A.; Tadei, W.P.; Nunomura, R.C.S. Atividade biológica do extrato metanólico de *Piper alatipetiolatum* (Piperaceae) contra larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). In: Anais do Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2017a.

Oliveira, A.C.; Brito, R.S.; Roque, R.A.; Tadei, W.P.; Nunomura, R.C.S. 2017c. Avaliação de do extrato metanólico de *Piper purusum* (Piperaceae) contra *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). In: Anais do Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Oliveira, A.C.; Carneiro, S.B.; Pinheiro, C.C.S. Identificação química e atividade inseticida do pau d'angola (*Piper alatipetiolatum*) sobre *Aedes aegypti*. I Encontro de Química do Norte – SBQNorte, 2014.

Oliveira, A.E.M.F.M., Bezerra, D.C., Duarte, J.L., Cruz, R.A.S., Souto, R.N.P., Ferreira, R.M.A., Nogueira, J., Edemilson, C., 2017. Essential oil from *Pterodon emarginatus* as a promising natural raw material for larvicidal nanoemulsions against a tropical disease vector. Sustainable Chemistry and Pharmacy 6, 1–9.

Oliveira, G.L., Cardoso, S.K., Júnior, C.R.L., 2013. Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae) 85, 1227–1234.

Oliveira, J.D., Alves, C.C.F., Miranda, M.L.D., Martins, C.H.G., Silva, T.S., Ambrosio, M.A.L.V., Alves, J.M., Silva, J.P., 2016. Rendimento, composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. Revista Brasileira de Plantas Medicinais 18, 502–510. https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_206

Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), 2019a. Zika Vírus: Microcefalia, Sintomas

e Tratamentos. <https://opas.org.br/zika-virus-microcefalia-sintomas-e-tratamentos>. acessado em 03 10 2019b.

Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), 2019b. O ano em que o vírus zika evoluiu de uma emergência para um desafio de saúde pública em longo prazo. https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5326:o-o-em-que-o-virus-zika-evoluiu-de-uma-emergencia-para-um-desafio-de-saude-publica-m-longo-prazo&Itemid=812 acessado em 03 01 2020a.

Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), 2020. Casos de malária aumentam na região amazônica. Acessado em 28 01 2020. Disponível em: www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5591:casos-de-malaria-aumentam-na-regiao-das-americas&Itemid=812.

Osanloo, M., Amani, A., Sereshti, H., Reza, M., Esmaeili, F., 2017. Preparation and optimization nanoemulsion of *Tarragon* (*Artemisia dracunculus*) essential oil as effective herbal larvicide against *Anopheles stephensi*. Industrial Crops & Products 109, 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.037>

Patil, S. V., Patil, C.D., Salunkhe, R.B., Salunke, B.K., 2010. Larvicidal activities of six plants extracts against two mosquito species, *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. Tropical Biomedicine 27, 360–365.

Paula, H.C.B., Matoso, F., Freitas, R. De, Abreu, F.O.M.S., Paula, R.C.M. De, 2011. Preparation and characterization of chitosan / cashew gum beads loaded with *Lippia sidoides* essential oil. Materials Science & Engineering C 31, 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.08.013>

Pavela, R., Benelli, G., Pavoni, L., Bonacucina, G., Cespi, M., Cianfaglione, K., Bajalan, I., Reza, M., Lupidi, G., Romano, D., Canale, A., Maggi, F., 2019. Microemulsions for delivery of Apiaceae essential oils — Towards highly effective and eco-friendly mosquito larvicides ? Ind. Crop. Prod. 129, 631–640. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.073>

Perdomo-Celis, F., Salgado, D.M., Narváez, C.F., 2017. Magnitude of viremia, antigenemia and infection of circulating monocytes in children with mild and severe dengue. Acta Tropica 167, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.12.011>

Pereira, A.C.R.L., Olivera, J.V., Gondim Junior, M.G.C., Camara, C.A.G., 2008. Atividade

inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (FABR., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]. Ciência e Agrotecnologia. 32: 717-724.

Pingen, M., Schmid, M.A., Harris, E., Mckimmie, S., 2017. Mosquito biting modulates skin response to virus infection. Trends in Parasitology xx. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.04.003>

Pinto, A.C.S.; Nogueira, K.L.; Chaves, F.C.M.; Silva, L.V.S. Pohlit, A.M. 2012. Adulticidal activity of dillapiol and semi-synthetic derivatives of dillapiol against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Journal of Mosquito Research. 2: 1-7.

Pontes, R.J.S., Regazzi, A.C.F., Lima, J.W.O., Kerr-Pontes, L.R.S., 2005. Residual effect of commercial applications of larvicides temefos and *Bacillus thuringiensis israelensis* on *Aedes aegypti* larvae in recipients with water renewal. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 38: 316-321.

Pretto, I., Evaldt, G., Machado, A., Paulo, S., Michel, P., Antônio, L., Brittes, M., Mário, R., Vargas, F., Cassel, E., Lino, G., Poser, V., 2012. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. Industrial Crops & Products 40, 292–295. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.025>

Prosser, I., Phillips, A.L., Gittings, S., Lewis, M.J., Hooper, A.M., Pickett, J.A., Beale, M.H., 2002. (+) - (10 R) - Germacrene A synthase from goldenrod, *Solidago canadensis*; cDNA isolation , bacterial expression and functional analysis. Phytochemistry § 60, 691–702.

Quin, W.; Huang, S.; Li, C.; Chen, S.; Peng, Z. 2010. Biological activity of the essential oil from leaves of *Piper sarmentosum* Roxb. (Piperaceae) and its chemical constituents on *Brontispa longissima* (Gestro) (Coleoptera: Hispididae). Pesticide Biochemistry and Physiology. 96: 132-139.

Rafael, J., Amado, R., Lafourcade, A., Lobato, J., Keita, H., Rivero, H., Maciel, A., Hernandez, E., Carlos, J., Carvalho, T., 2017. Development , stability and in vitro delivery profile of new loratadine-loaded nanoparticles. Saudi Pharmaceutical Journal 25, 1158–1168.

Rajaganesh, R., Murugan, K., Panneerselvam, C., Jayashanthini, S., Aziz, A.T., Roni, M.,

- Suresh, U., Trivedi, S., Rehman, H., Higuchi, A., Nicoletti, M., Benelli, G., 2016a. Fern-synthesized silver nanocrystals: Towards a new class of mosquito oviposition deterrents? *Research in Veterinary Science* 109, 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.09.012>
- Rajaganesh, R., Murugan, K., Panneerselvam, C., Jayashanthini, S., Aziz, A.T., Roni, M., Suresh, U., Trivedi, S., Rehman, H., Higuchi, A., Nicoletti, M., Benelli, G., 2016b. Fern-synthesized silver nanocrystals: Towards a new class of mosquito oviposition deterrents? *Research in Veterinary Science* 109, 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.09.012>
- Rajeswary, M.; Govindarajan, M. 2014. Adulticidal proprieties of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. (Family: Fabaceae) against dengue vector, *Aedes aegypti* (Linn.) (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropic Disease*. 4: 449-452.
- Ramanibai, R., Parthiban, E., Boothapandi, M., 2016. Effect of seed kernel aqueous extract from *Annona squamosa* against three mosquito vectors and its impact on non-target aquatic organisms. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 6, 741–745. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(16\)61121-0](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(16)61121-0)
- Raveton, M., Ravanel, P., Se, J., Lempe, G., 2006. Do herbicide treatments reduce the sensitivity of mosquito larvae to insecticides? *Chemosphere* 65, 721–724. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.02.032>
- Razmy, A.M., 2014. Clinical features of chikungunya infection in Sri Lanka. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4, 131–134. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60329-7](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60329-7)
- Rebelo, R.A.; Santos, T.G.; Dalmarco, E.M.; Guedes, A.; Gasper, A.L.; Cruz, A.B.; Schmit, A.P.; Cruz, R.C.B.; Steindel, M.; Nunes, K. 2012. Chemical composition and evaluation of the antimicrobial activity of the essential oil of the leaves of *Piper malacophyllum* (C.PRESL.) C.DC. *New Chemistry*. 35: 477-481.
- Reegan, A.D., Gandhi, M.R., Paulraj, M.G., Balakrishna, K., Ignacimuthu, S., 2014. Effect of niloticin, a protolimonoid isolated from *Limonia acidissima* L. (Rutaceae) on the immature stages of dengue vector *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica* 139, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.07.002>
- Rezende, S., Stanisçuaski, S., Lucca, L. De, Raffin, A., 2003. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*. 26, 726–737.

Rhee, I.K., Van De Meent, M., Ingkaninan, K., Verpoorte, R., 2001. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A* 915, 217–223. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00624-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00624-0)

Rolfs, A.P.H., Lamego, A.A., 2012. Rendimento extrativo de cumarina de fohas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) submetidas a diferentes temperaturas de secagem. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 1, 453–457.

Ruiz-Guerrero, R., Rodríguez-Perez, M.A., Norzagaray-Campos, M., 2015. Toxicidade de extratos de plantas nativas mexicanas contra larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 5:287-291. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(15\)30347-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(15)30347-6)

Rukunga, G.M., Muregi, F.W., Omar, S.A., Gathirwa, J.W., Muthaura, C.N., Peter, M.G., Heydenreich, M., Mungai, G.M., 2008. Anti-plasmodial activity of the extracts and two sesquiterpenes from *Cyperus articulatus*. *Fitoterapia* 79, 188–190. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.11.010>

Santos, A.L.M., 2014. Estudo químico e biológico de *Cyperus rotundus* aclimatada no Amazonas. Tese. Universidade Federal do Amazonas. Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. 152p.

Santos, D.O., Leal, B., Ferreira, A., Rodrigues, C.R., Castro, H.C., 2007. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia Medicinal* 43, 413–423.

Santos, F.A. V, Serra, C.G., Bezerra, R.J.A.C., Figueredo, F.G., Matias, F.F., Menezes, I.R.A., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M., 2016. Antibacterial activity of *Plectranthus amboinicus* Lour (Lamiaceae) essential oil against *Streptococcus mutans*. *European Journal of Integrative Medicine* 8, 293–297. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2015.11.021>

Santos, M.R.A.; Lima, R.A.; Silva, A.G.; Teixeira, C.A.D.; Alpirez, I.P.V.; Facundo, V.A. 2013. Chemical composition and insecticidal activity of the acetone extract of *Piper alatabacum* Trel & Yuncker (Piperaceae) on *Hypothenemus hampei* Ferrari. *Brazilian Journal of Medicinal Plants*. 15: 332-336.

Santos, M.S.; Poser, G.V.; Bordignon, S.; Ribeiro, V.L.S.; Ferraz, A.B.F. 2010. Chemical analysis and evaluation of the acaricidal activity of leaves of *Piper amargo*, *P. mikanianum* and *P. xylosteoides* in larvae of *Rhipicephalus* (Boophilus) *micropluis*. Journal of Scientific Initiation of ULBRA. 4: 65-71.

Santos, R.P., Nunes, E.P., Nascimento, R.F., Santiago, G.M.P., 2006. Composição química e atividade inseticida de óleos essenciais de *Cordia leucomalloides* e *Cordia curassavica* from the nordeste do Brasil 17, 1027–1030.

Santos, T.G.; Rabelo, R.A.; Dalmarco, E.M.; Guedes, A.; Gasper, A.L.; Cruz, A.B.; Cruz, R.C.; Schmit, A.P. 2012. Chemical composition and evaluation of the antimicrobial activity of the essential oil of the leaves of *Piper malacophyllum* (C.PRESL.) C.DC. New Chemistry. 3: 477-481.

Sarma, R., Adhikari, K., Mahanta, S., Khanikor, B., 2019. Insecticidal activities of *Citrus aurantifolia* essential oil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Toxicology Reports 6, 1091–1096. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.10.009>

Sawicki, R., Sieniawska, E., Swatko-ossor, M., Golus, J., Ginalska, G., 2018. The frequently occurring components of essential oils beta elemene and R-limonene alter expression of dprE1 and clgR genes of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Food and Chemical Toxicology 112, 145–149. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.052>

Shafi, P.M., Rosamma, M.K., Jamil, K., Reddy, P.S., 2002. Antibacterial activity of the essential oil from *Aristolochia indica*. Fitoterapia 73: 439-441. [doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00130-2](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00130-2)

Shafiq, S., Shakeel, F., 2010. Stability and self-nanoemulsification efficiency of ramipril nanoemulsion containing labrasol and plurol oleique. Clinical Research and Regularoty Affair 27, 7–12. <https://doi.org/10.3109/10601330903571691>

Sheikh, T.M.E.; Al-Fifi, Z.I.; Alabboud. M. 2012. Larvicidal and repellent effect of some *Tribulus terrestris* L., (Zygophyllaceae) extracts against the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Journal of Saudi Chemical Society. 5: 403-408

Silva, F.G., Nascimento, V.E., Pinto, J.E.B.P., Oliveira, C.B.A., Santos, M.R., Ferri, P.H., 2010. Influência do processamento pós-colheita e armazenamento na composição química da droga vegetal e do óleo essencial de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.]. Revista

Brasileira de Plantas Medicinais 12, 436–442. <https://doi.org/10.1590/s1516-05722010000400006>

Silva, M.F.R.; Bezerra-Silva, P.C.; Lira, C.S.; Albuquerque, B.N.L.; Neto, A.C.A.; Pontual, E.V.; Maciel, J.R.; Paiva, P.M.G.; Navarro, D.M.A.F. 2016. Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae). *Experimental Parasitology*. 165: 64-70

Singh, S.R., Luse, R.A., Leuschner, K., Nangsu, D. 1978. Groundnut oil treatment for control of *Callosobruchus maculatus* for during cowpea storage. *J.Stored Prod.Res.*, 14:77-80..

Sobral-Souza, C.E., Leite, N.F., Cunha, F.A.B., Pinho, A.I., Albuquerque, R.S., Carneiro, J.N.P., Menezes, I.R.A., Costa, J.G.M., Franco, J.L., Coutinho, H.D.M. 2013. Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam. *Arabian Journal of Chemistry* 7, 165-170.

Sonntag, F., Kroner, C., Lubuta, P., Peyraud, R., Horst, A., Buchhaupt, M., Schrader, J., 2015. Engineering *Methylobacterium extorquens* for de novo synthesis of the sesquiterpenoid α -humulene from methanol. *Metabolic Engineering* 32, 82–94. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.09.004>

Soonwera, M., Phasomkusolsil, S., 2017. Adulticidal, larvicidal, pupicidal and oviposition deterrent activities of essential oil from *Zanthoxylum limonella* Alston (Rutaceae) against *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 7, 967–978. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.09.019>

Sperotto, A.R.M., Moura, D.J., Péres, V.F., Damasceno, F.C., Caramão, E.B., Henriques, J.A.P., Saffi, J., 2013. Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. *Food and Chemical Toxicology* 57, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.013>

Sugumar, S., Clarke, S.K., Nirmala, M.J., Tyagi, B.K., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., 2019. Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. *Bulletin of Entomological Reserarch* 104, 393–402. <https://doi.org/10.1017/S0007485313000710>

Sugumar, S., Clarke, S.K., Nirmala, M.J., Tyagi, B.K., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N.

2014. Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. Bull. Entomol. Res. 104, 393–402. doi:10.1017/S0007485313000710

Sugumar, S., Nirmala, J., Anjali, H., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., 2012. Bio-based nanoemulsion formulation, characterization and antibacterial activity against food-borne pathogens. Journal of Basic Microbiology 52, 1–10. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200060>

Suresh, U., Murugan, K., Panneerselvam, C., Rajaganesh, R., Roni, M., Thabiani, A., Ahmed, H., Al-aoh, N., Trivedi, S., Rehman, H., Kumar, S., Higuchi, A., Canale, A., Benelli, G., 2018. Suaeda maritima based herbal coils and green nanoparticles as potential biopesticides against the dengue vector *Aedes aegypti* and the tobacco cutworm *Spodoptera litura*. Physiological and Molecular Plant Pathology 101, 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.01.002>

Tadei, W.P., 1998. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the brazilian amazon. Am. J. Trop. Med 59, 325–335.

Tadei, W.P., 2002. Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus, Amazonas State, Brazil. Caderno de Saúde Pública 18, 1529–1536.

Taylor, P., Don, J.G., Pino, J.A., Perera, W.H., Sarduy, R., Oviedo, R., Clara, E., Pino, J.A., 2009. Essential oil from flowers of *Pluchea carolinensis* essential oil from. Journal of Essential Oil Research 21, 41–44. <https://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700105>

Thiberville, S.D., Moyen, N., Dupuis-Maguiraga, L., Nougairede, A., Gould, E.A., Roques, P., de Lamballerie, X., 2013. Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. Antiviral Research 99, 345–370. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.06.009>

Thomas, R.E., Spragins, W., Lorenzetti, D.L., 2013. How many published cases of serious adverse events after yellow fever vaccination meet Brighton Collaboration diagnostic criteria? Vaccine 31, 6201–6209.

Tomasello, D., Schlagenhauf, P., 2013. Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007–2012. Travel Medicine and Infectious Disease 11, 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2013.07.006>

Tretyakova, I., Nickols, B., Hidajat, R., Jokinen, J., Lukashevich, I.S., Pushko, P., 2014. Plasmid DNA initiates replication of yellow fever vaccine in vitro and elicits virus-specific immune response in mice. *Virology* 468–470, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.07.050>

Trevizan, L.F.N., Nascimento, K.F., Santos, J.A., Kassuya, C.A.L., Cardoso, C.A.L., Vieira, M.C., Moreira, F.M.F., Croda, J., Formagio, A.S.N., 2016. Anti-inflammatory, antioxidant and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of viridiflorol: the major constituent of *Allophylus edulis* (A. St-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk. 192: 510-515. doi.org/10.1016/j.jep.2016.08.053

Ventorim, F., Paula, R. De, Caldeira, I., Alvarenga, A., Kelly, S., Bertolucci, V., Alves, A., Alvarenga, D., Eduardo, J., Pereira, B., 2016. Essential oil of monkey-pepper (*Piper aduncum* L.) cultivated under different light environments. *Industrial Crops & Products* 85, 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.016>

Vila, R.; Santana, A.I.; Péres-Rosés, R.; Valderrama, A.; Castelli, M.V.; Mendonça, S.; Zacchino, S.; Gupta, M.P.; Cañigual, S. 2010. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampanensis*, a new source of α -bisabolol. *Bioresource Technology*. 101: 2510-2514

Villamizar, L.H.; Cardoso, M.G.; Andrade, J.; Teixeira, M.L.; Soares, M.J. 2017. Linalool, a *Piper aduncum* essential oil component, has selective active against *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms at 4°C. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 112: 131-139.

Villarreal-Treviño, C., Vásquez, G.M., López-sifuentes, V.M., Escobedo-vargas, K., Huayanay-repetto, A., Linton, Y., Flores-mendoza, C., Lescano, A.G., Stell, F.M., 2015. Establishment of a free-mating, long-standing and highly productive laboratory colony of *Anopheles darlingi* from the Peruvian Amazon. *Malaria Journal* 6, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0733-0>

Vital, W.D.E.O., 2006. Metabolismo de glicose durante a embriogênese do mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Dissertação. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 51p.

Volpato, A., Baretta, D., Zortéa, T., Campigotto, G., Galli, G.M., Glombowsky, P., Santos, R.C.V., Quatrin, P.M., Ourique, A.F., Baldissera, M.D., Stefani, L.M., Da Silva, A.S.,

2016. Larvicidal and insecticidal effect of *Cinnamomum zeylanicum* oil (pure and nanostructured) against mealworm (*Alphitobius diaperinus*) and its possible environmental effects. Journal of Asia-Pacific Entomology 19, 1159–1165. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2016.10.008>

World Health Organization (WHO), 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Health Organization Communicable Disease Control, Prevention and Eradication Who Pesticide Evaluation Scheme 1–41. <https://doi.org/Ref:WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.11>

World Health Organization (WHO), 2016. Global capacity for vector control and product testing 10.

World Health Organization (WHO), 2018. Zika virus. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus> acesso em 27/01/2020.

World Health Organization, n.d. WHO, 1975. Manual of practical entomology in malaria part 2.pdf. Colocar em ordem alfabética

Xie, Q., Li, F., Fang, L., Liu, W., Gu, C., 2020. Review Article The Antitumor Efficacy of β -Elemene by Changing Tumor Inflammatory Environment and Tumor Microenvironment. BioMed Research International 20, 11-15 <https://doi.org/10.1155/2020/6892961>

Xuewei, W., Zhengtang, L., Xinbing, S., Qibiao, W., Jue, W., Cong, X., 2019. Phytomedicine Elemene injection as adjunctive treatment to platinum-based chemotherapy in patients with stage III / IV non-small cell lung cancer: A meta-analysis following the PRISMA guidelines 59. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.12.010>

Yoo, H., Jwa, S., 2018. Archives of Oral Biology Inhibitory effects of β -caryophyllene on *Streptococcus mutans* biofilm 88, 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.01.009>

Yu, K., Wong, C., Ahmad, R., Jantan, I., 2015. Aberration induced by seaweed extracts in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 8, 1006–1012. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.11.011>

Zamora Perea, E., Balta Leán, R., Palomino Salcedo, M., Brogdon, W.G., Devine, G.J.,

2009. Adaptation and evaluation of the bottle assay for monitoring insecticide resistance in disease vector mosquitoes in the Peruvian Amazon. *Malaria Journal* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-208>

Zanluca, C., De Melo, V.C.A., Mosimann, A.L.P., Dos Santos, G.I.V., dos Santos, C.N.D., Luz, K., 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 110, 569–572. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150192>