



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MAYERLI GARCIA SAAVEDRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DA NANOEMULSÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL DAS RAÍZES DE *Philodendron fragrantissimum* (Hook.) G.Don
(ARACEAE) CONTRA *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) (DIPTERA: CULICIDAE)**

Macapá / AP
2018

MAYERLI GARCIA SAAVEDRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DA NANOEMULSÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL DAS RAÍZES DE *Philodendron fragrantissimum* (Hook.) G. Don
(ARACEAE) CONTRA *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) (DIPTERA: CULICIDAE)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), como requisito obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Ensaios biológicos.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto

Co-orientador: Prof. Dr. Caio Pinho Fernandes

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborado por Mara Patrícia Corrêa Garcia CRB-2/1248

615.321

G216a Garcia Saavedra, Mayerli

Avaliação da atividade larvicida da nanoemulsão do óleo essencial das raízes de *Philodendron fragrantissimum* (Hook) G.Don (Araceae) contra *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) (Diptera: Culicidae) / Mayerli Garcia Saavedra; orientador, Raimundo Nonato Picanço Souto. - Macapá, 2018.

82 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

1. Atividade larvicida. 2. Nanoemulsão. 3. Óleo essencial. 4. Vetores de doenças. I. Souto, Raimundo Nonato Picanço, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

MAYERLI GARCIA SAAVEDRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DA NANOEMULSÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL DAS RAÍZES DE *Philodendron fragrantissimum* (Hook.) G. Don
(ARACEAE) CONTRA *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) (DIPTERA: CULICIDAE)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), como requisito obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Ensaios biológicos.

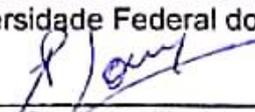
Orientador: Prof. Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto

Co-orientador: Prof. Dr. Caio Pinho Fernandes

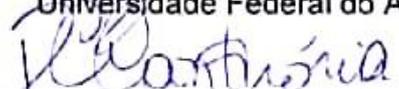
DATA DE APROVAÇÃO: 05/04/2018



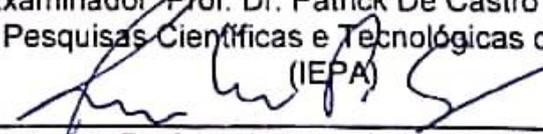
Examinador: Prof. Dr. Fernando Antonio De Medeiros
Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)



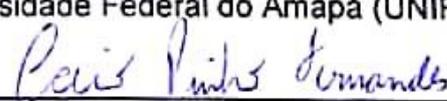
Examinador: Prof. Dr. Madson Ralide Fonseca Gomes
Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)



Examinador: Prof. Dr. Patrick De Castro Cantuária
Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá
(IEPA)



Orientador: Prof. Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto
Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)



Co-orientador: Prof. Dr. Caio Pinho Fernandes
Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)

“ Dedico esta obra às pessoas mais importantes para mim; meus pais e irmãos, por acreditar em mim e me dar todo seu amor e apoio durante este processo, amo muito a vocês. Deus os abençoe sempre. ”

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, meu refúgio, por sempre me conceder proteção e sabedoria para continuar o caminho, coragem para acreditar e força para não desistir.

À minha **mãe** e meu **pai**, porque sempre acreditarem em mim e por terem dedicado suas vidas em prol das realizações e da felicidade de seus filhos e por sempre nos apoiar de forma incondicional. Obrigada por tudo, pelo o amor, o carinho e pelas orações.

À meus irmãos **Richardo** e **Beto**, porque, junto com meus pais, sempre estiveram ao meu lado apoiando-me, por compartilhar angústias e alegrias; pelas palavras de incentivo nos momentos mais difíceis.

À meus sobrinhos **Julian** e **Martin**, porque as crianças sempre animaram nossa casa e eles são uma razão para continuar.

Aos demais familiares e amigos de toda a vida, mesmo estando a alguns quilômetros de distância, mantiveram-se incansáveis em suas manifestações de apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Nonato Souto**, pela ajuda, ensinamentos, orientações e contribuições.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. **Caio Fernandes**, por me receber em seu laboratório e oportunidade de compartilhar seus conhecimentos.

Ao laboratório de Arthrolab, em especial ao Prof. Dr.. **Nonato Souto** e **Ricardo Ferreira**. Ao Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica - NANOFITO em especial o Prof. Dr.. **Caio Pinho**, a Profa. Dra. **Anna Oliveira**, o Prof. Dr.. **Rodrigo Cruz** e **Jonatas Lobato**. Ao laboratório de Biocatálise e Biotransformação em Química Orgânica (BIORG) em especial o Prof. Dr. **Irlon Maciel**. Obrigada a todos pela orientação, por me ensinar, pela disponibilização de equipamentos, espaços e recursos.

À **Natalia**, minha amiga, uma irmã que encontrei nesta travessia; muito obrigada pela ajuda, pelas conversas, pelas risadas que amenizavam o stress diário; pelas angústias e alegrias compartilhadas.

Aos irmãos, minha família de estrangeiros: **Zonia, Karen, Victor, Omar, Bayron, Angelica, Lucio, Edith e Danel**, obrigada por sua ajuda, pelos momentos compartilhados e pela parceria.

Aos amigos: **Igor, Taires, Gabi, Ivan, Vivi, Erico, Jessica, Renato e Felipe**, pessoas inolvidáveis, pessoas maravilhosas e com um enorme coração. Sempre dispostos a ajudar e a compartilhar momentos. Muito obrigada! Foi um prazer enorme conhecer a todos vocês.

A meus colegas da turma do programa de Mestrado em Ciências da Saúde em especial **Olinda, Nell e Carlos**, pela amizade e ajuda.

A Universidade Federal do Amapá (**UNIFAP**), ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (**PPGCS**), À organização dos Estados Americanos (**OEA**), o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (**GCUB**). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**). Obrigada por a oportunidade de fazer o mestrado e pelo apoio financeiro.

Finalmente, o espaço limitado desta secção de agradecimentos, talvez não me permite agradecer, como devia, a todas as pessoas que, ao longo do tempo me ajudaram a chegar até aqui, mas agradeço a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si.

Muito obrigada!

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

O mosquito da espécie *Aedes aegypti* é o causador da transmissão de doenças como a dengue, febre amarela, chikungunya e zika. Provoca uma elevada taxa de mortalidade no mundo, principalmente em países tropicais, sendo um problema de saúde pública. Atualmente, existe um interesse crescente na busca por substâncias de origem natural para o controle de vetores. Os óleos essenciais de plantas, por exemplo, permitem diminuir os efeitos tóxicos no meio ambiente e a resistência que alguns insetos apresentam frente a produtos sintéticos. No entanto, os óleos são pouco solúveis em água e as nanoemulsões são alternativas viáveis, já que são capazes de se dispersarem em meio aquoso. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade larvicida da nanoemulsão do óleo essencial de *Philodendron fragrantissimum* (Hook.) G.Don sobre *A. aegypti*. O material vegetal foi identificado e a exsicata depositada no herbário amapaense (HAMAB). A extração do óleo da raiz de *P. fragrantissimum* foi feita por meio da técnica de hidrodestilação em aparato do tipo Clevenger. A identificação das substâncias presentes no óleo essencial foi feita por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa CG/EM. As nanoemulsões foram preparadas por um método de baixo aporte de energia. A massa final foi de 4 g e eram compostas por 2,5% (p/p) de óleo essencial de *P. fragrantissimum*; 2,5% (p/p) de tensoativo (s) e 95%(p/p) de água. Para realizar o teste larvicida, foram diluídas a 3,125ppm; 12,5ppm; 25ppm; 50ppm; 100ppm; e 150ppm. As larvas de *A. aegypti* (cepa Rockefeller) utilizadas nos experimentos foram oriundas do Insetário do Laboratório de Arthropoda da Universidade Federal do Amapá. Os bioensaios da atividade larvicida seguiram o protocolo padrão preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), realizados em quintuplicata com 10 larvas em cada repetição e a mortalidade foi verificada após 24 e 48 horas de exposição. A atividade anticolinesterásica foi realizada de acordo com o método descrito por Ellman e colaboradores (1961). O óleo essencial de *P. fragrantissimum* permitiu identificar 27 constituintes e as substâncias majoritárias foram o β -Bisaboleno (40,44%), α -Pinenos (23,69%), β -Pinenos (7,20%), α -Bisaboleno (6,59%) e β -Farneseno (5,29%). A nanoemulsão do óleo essencial de *P. fragrantissimum* apresentou baixo tamanho médio de gotículas e mostrou um potencial larvicida frente a espécie *A. aegypti*. Os valores da concentração letal estimados de CL₅₀ e CL₉₀ após 24h foram respectivamente 55,07ppm (42.44 - 75.36ppm) e 86,70ppm (68.73 - 129.87). O óleo essencial de *P. fragrantissimum* apresentou moderada atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase com o valor de CI₅₀ = 251,9 μ g/mL. As larvas da espécie estudada foram suscetíveis à composição do óleo essencial. Tais resultados poderão ser úteis na promoção de pesquisas para o controle vetorial de mosquitos baseado em compostos ativos oriundos de espécies vegetais como uma alternativa aos larvicidas sintéticos.

Palavras-chaves: Atividade larvicida, Nanoemulsão, Óleo essencial, Vetores de doenças.

ABSTRACT

The mosquito of the species *Aedes aegypti* is the cause of the transmission of diseases like dengue fever, yellow fever, chikungunya and zika. It causes a high mortality rate in the world, especially in tropical countries, and it is a public health problem. Currently, looking for substances that control the vector, is and increasing interest. The essential oils of plants, for example, reduce the toxic effects on the environment and the resistance that some insects present against synthetic products. However, the oils are poorly soluble in water and the nanoemulsions are viable alternatives, since they are able to disperse in aqueous medium. This study aimed to evaluate the larvicidal activity of the essential oil nanoemulsion of *Philodendron fragrantissimum* (Hook.) G. Don on *A. aegypti*. The plant material was identified and the exsiccata deposited in the amapaense herbarium (HAMAB). The extraction of the oil from the root of *P. fragrantissimum* was done by means of the hydrodistillation technique in Clevenger apparatus. The identification of the substances that are in the essential oil was made by gas chromatography coupled to a GC / MS mass spectrometer. The nanoemulsions were prepared by a low energy input method. The final mass was 4 g and were composed of 2.5% (w / w) of essential oil of *P. fragrantissimum*; 2.5% (w / w) surfactant (s) and 95% (w / w) water. To perform the larvicidal test, they were diluted to 3.125ppm; 12.5ppm; 25ppm; 50ppm; 100ppm; and 150ppm. The larvae of *A. aegypti* (Rockefeller strain) used in the experiments were taken from the Institute of Arthropoda Laboratory of the Federal University of Amapá. Bioassays of larvicidal activity followed the standard protocol recommended by the World Health Organization (WHO), performed in quintuplet with 10 larvae in each repetition, and mortality was verified after 24 and 48 hours of exposure. The anticholinesterase activity was performed according to the method described by Ellman et al. (1961). The essential oil of *P. fragrantissimum* allowed to identify 27 constituents and the major substances were β -Bisabolene (40.44%), α -Pinene (23.69%), β -Pinene (7.20%), α -Bisabolene (6.59%) and β -Farnesene (5.29%). The essential oil nanoemulsion of *P. fragrantissimum* showed a low average droplet size and showed a potential larvicide against *A. aegypti* species. The estimated lethal concentration values of CL50 and CL90 after 24h were 55.07ppm (42.44 - 75.36ppm) and 86.70ppm (68.73 - 129.87), respectively. The essential oil of *P. fragrantissimum* presented moderates inhibition of the acetylcholinesterase enzyme with the IC 50 = 251.9 μ g / mL. The larvae of the species studied were susceptible to the composition of the essential oil. Such results may be useful in promoting research for vector control of mosquitoes based on active compounds from plant species as an alternative to synthetic larvicides.

Key words: Activity larvicidal, Nanoemulsion, Essential oil, Vectors of diseases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição Geográfica de Araceae.....	21
Figura 2	Distribuição Geográfica de <i>Philodendron</i>	23
Figura 3	Foto da espécie <i>Philodendron fragrantissimum</i> (Hook.) G Don.....	26
Figura 4	Distribuição Geográfica de <i>P. fragrantissimum</i>	26
Figura 5	Representação esquemática mostrando os glóbulos das emulsões óleo / água (O/A) e água / óleo (A/O).....	29
Figura 6	Estágios de desenvolvimento do mosquito <i>A. aegypti</i>	31
Figura 7	Mapa global da distribuição prevista de <i>A. aegypti</i> .O mapa mostra a probabilidade de ocorrência.....	33
Figura 8	Raízes adventícias de <i>P. fragrantissimum</i>	47
Figura 9	Lugar de coleta de raiz adventícia de <i>P. fragrantissimum</i>	48
Figura 10	Exsicata de <i>P. fragrantissimum</i> depositada no Herbário Amapaense.....	49
Figura 11	Ensaio larvicida de nanoemulsão de <i>P fragrantissimum</i> frente as larvas de <i>A. aegypti</i>	52
Figura 12	Óleo essencial de <i>P. fragrantissimum</i>	55
Figura 13	Cromatograma do óleo essencial das raízes de <i>P. fragrantissimum</i> . Componentes majoritários: 1, α -pineno; 3, β -pineno; 15, β -Farneseno; 21, β -Bisaboleno.....	57
Figura 14	Estruturas químicas dos principais compostos encontrados no óleo de <i>P. fragrantissimum</i>	58
Figura 15	Nanoemulsões contendo Span 80 e Tween 80. A) Dia 1; B) Dia 3; C) Dia 30.....	61
Figura 16	Nanoemulsões contendo Triolato de sorbitano e Tween 80. A) Dia 1; B) Dia 3; C) Dia 30.....	62
Figura 17	Nanoemulsões contendo Tween 20 e Span 80. A) Dia 1; B) Dia 3; C) Dia 30.....	62
Figura 18	Nanoemulsões contendo Triolato de sorbitano e Tween 20. A) Dia 1; B) Dia 3; C) Dia 30.....	63
Figura 19	Nanoemulsões contendo diferentes tensoativos. A) Dia 1; B) Dia 3; C) Dia 30.....	63
Figura 20	Melhor nanoemulsão, mistura de Span 80 e Tween 20 (EHL: 15) apresenta aspecto azulado e sem cremagem.....	64
Figura 21	Distribuição do tamanho de partícula da nanoemulsão de <i>P. fragrantissimum</i> . Após Dia 0; 1; 7 e 30.....	67
Figura 22	Efeito da concentração do óleo essencial na porcentagem de inibição de AChE.....	70

LISTA DE QUADRO

Quadro 1	Aplicações na medicina popular para algumas espécies de	24
	<i>Philodendron</i>	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de casos prováveis de dengue, até a Semana Epidemiológica 3, por região e Unidade da Federação, Brasil, 2017 e 2018.....	36
Tabela 2	Número de casos prováveis de febre de chikungunya, até a Semana Epidemiológica 3, por região e Unidade da Federação, Brasil, 2017 e 2018.....	38
Tabela 3	Número de casos prováveis de febre pelo vírus Zika, por região e Unidade da Federação, até a Semana Epidemiológica 3, Brasil, 2017 e 2018.....	40
Tabela 4	Constituintes químicos do óleo essencial de <i>P. fragrantissimum</i>	56
Tabela 5	Comparação de constituintes químicos no estudo realizado por Castellar et al., (2013) e o presente estudo.....	59
Tabela 6	Análise macroscópica da nanoemulsão após 3 dias (72 horas)	61
Tabela 7	Tamanho gotícula e Índice de polidispersão da formulação de EHL 15. Dia 0; 1; 7 e 30.....	66
Tabela 8	Percentual de mortalidade (média \pm desvio padrão) de larvas de <i>A. aegypti</i> produzida por diferentes concentrações da nanoemulsão de <i>P. fragrantissimum</i> , em diferentes períodos (24 e 48 h)	68
Tabela 9	Estimativas das concentrações letais (CL50 e CL90) e seus respectivos intervalos de confiança, expressos como concentrações do óleo essencial de <i>P. fragrantissimum</i>	69
Tabela 10	Inibição de AChE em cada concentração testada de óleo	70

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>A. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
A/O	Água em Óleo
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de variância
CHIKV	Vírus Chikungunya
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
CL ₅₀	Concentração letal para a mortalidade de 50%
CL ₉₀	Concentração letal para a mortalidade de 90%
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DENV	Vírus Dengue
DTNB	5,5'-Ditiobis (2-Ácido nitrobenzóico)
EHL	Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo
EM	Espectrômetro de massa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de massas
h	Hora
HAMAB	Herbário Amapaense
IEPA	Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá
IR	Índices de retenção
L1, L2, L3, L4	Larva estágio 1, 2, 3 e 4
mg	Miligrama
mL	Mililitro
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NIST	National Institute of Standards and Technology
O/A	Óleo em Água
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>P. fragrantissimum</i>	<i>Philodendron fragrantissimum</i>
p/p	Peso por peso

ppm	Partes por milhão
rpm	Rotações por minuto
SE	Semana Epidemiológica
Tween® 20	Polisorbato 20
Tween® 80	Polisorbato 80
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
µL	Microlitro
µg	Micrograma
ZIKV	Vírus da Zika

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 DIVERSIDADE DE PLANTAS	20
2.2 FAMÍLIA ARACEAE	21
2.3 GÊNERO <i>Philodendron</i> Schott	22
2.3.1 <i>Philodendron fragrantissimum</i> (Hook.) G.Don	25
2.4 METABOLITOS SECUNDÁRIOS	27
2.5 ÓLEO ESSENCIAL	28
2.6 EMULSÃO E NANOEMULSÕES	29
2.7 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE <i>Aedes aegypti</i> (LINNAEUS, 1762)	31
2.8 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR <i>Aedes aegypti</i>	33
2.8.1 Dengue	34
2.8.2 Chikungunya	37
2.8.3 Zika	39
2.8.4 Febre amarela	41
2.9 O USO DE PLANTAS NO CONTROLE VETORIAL	42
2.10 INIBIDORES DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE	44
3 OBJETIVOS	46
3.1 OBJETIVO GERAL	46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 MATERIAL VEGETAL	47
4.2 EXTRAÇÃO DO OLEO ESSENCIAL	50
4.3 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA	50
4.4 MÉTODO DE NANOEMULSIFICAÇÃO	51
4.5. CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO	52
4.6. ENSAIO LARVICIDA	52
4.7. ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE	53
4.8. ANÁLISES DE DADOS	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
5.1. RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS RAÍZES FRESCAS	55
5.2. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA	55
5.3. NANOEMULSIFICAÇÃO	60

5.4. CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO	64
5.5. ATIVIDADE LARVICIDA DA NANOEMULSÃO DE <i>P. fragrantissimum</i>	68
5.6 INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE	70
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

Produtos naturais obtidos de matérias-primas vegetais, oferecem uma variedade de moléculas com grande diversidade estrutural e atividades biológicas diversas, como ações herbicidas, inseticidas, fungicidas e farmacológicas. A questão ambiental, atualmente, tem sido um dos principais incentivos à busca de novos pesticidas naturais mais seguros que os sintéticos. De uma forma geral, esses pesticidas não são persistentes, ou seja, degradam-se com maior velocidade que os sintéticos. Estas tendências têm criado grandes oportunidades para o desenvolvimento de pesticidas e repelentes naturais nos laboratórios de pesquisa de universidades e indústrias em todo o mundo. Para que sejam comercialmente viáveis, os produtos naturais precisam atender a uma série de critérios, dentre eles: seletividade contra inimigos naturais, baixa toxicidade em organismos não alvos, baixa toxicidade ambiental, biodegradabilidade, ausência de fitotoxicidade, matéria-prima abundante e baixo custo (FERREIRA et al., 2001).

O Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua flora e, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais. A Química de Produtos Naturais é, dentro da Química brasileira, a área mais antiga e a que, talvez ainda hoje, congregue o maior número de pesquisadores (PINTO et al., 2002). Atualmente é possível encontrar várias pesquisas em que o foco principal está em extrair, isolar, identificar e aplicar os produtos naturais obtidos, principalmente de fontes vegetais (BUENO et al., 2009).

A pesquisa fitoquímica tem por objetivo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre as espécies de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar o grupo de metabólitos secundários relevantes. Caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou às substâncias responsáveis por uma certa atividade biológica, a investigação deverá ser direcionada para o isolamento e a elucidação estrutural da mesma (SIMÕES et al., 1999).

Muitos metabólitos secundários estão presentes como defesa química da planta contra patógenos, estresse e outros fatores. Estas substâncias variam de acordo com a classificação taxonômica da planta, a sua localização geográfica, clima, composição do solo, entre outras. Esses fatores permitem obter-se uma variedade de substâncias fitoquímicas com diferentes propriedades biológicas e ecológicas. Na

última década, registrou-se um aumento expressivo no interesse em substâncias derivadas de espécies vegetais, evidenciado pelo crescimento de publicações dessa linha de pesquisa nas principais revistas científicas das áreas de química e farmacologia (CALIXTO, 2000).

Atualmente, o estudo fitoquímico e o uso da nanotecnologia são importantes na procura de novas substâncias ativas para fins terapêuticos e no controle de vetores de doenças. Os mosquitos são um dos grupos de insetos de maior importância médica e veterinária, pois atuam como vetores de patógenos. Dentro da entomologia médica, os mosquitos da família Culicidae são os que mais têm atraído a atenção da saúde pública e, em alguns casos, levando ao desenvolvimento de epidemias de difícil controle. A espécie de mosquito *A. aegypti*, por exemplo, desempenha importante papel na transmissão de doenças como febre amarela, dengue, chikungunya e vírus de zika, provocando uma elevada taxa de mortalidade. No entanto, o uso indiscriminado de larvicidas e inseticidas químicos no combate a mosquitos tem provocado danos à saúde do homem e ao meio ambiente, além de promover a seleção de resistência aos inseticidas comerciais (SANTIAGO et al., 2005). Em função de intervenções com inseticidas sintéticos no Brasil, o mosquito *A. aegypti* adquiriu resistência em alguns Estados, dentre eles Rio de Janeiro, Sergipe e Alagoas (BRAGA et al., 2004).

Sendo assim, os produtos de origem vegetal são uma alternativa viável para serem usados como larvicidas. Os óleos essenciais, porém, possuem baixa solubilidade em água, dificultando o processo para ser usado como larvicida. Portanto, as nanoemulsões do tipo óleo em água seriam um caminho para o uso de produtos oleosos em água, uma vez que são sistemas dispersos em meio aquoso, além de causarem menos efeitos tóxicos ao meio ambiente.

Portanto, este trabalho teve a finalidade de procurar uma alternativa natural para controle das larvas da espécie *A. aegypti*. Surge como um questionamento norteador desse estudo: A nanoemulsão de óleo essencial de *P. fragrantissimum* possuem compostos químicos naturais com atividades larvicida sobre *A. aegypti*? Como hipótese alternativa, a nanoemulsão do óleo essencial de *P. fragrantissimum* apresentam atividades larvicida contra *A. aegypti*. Na hipótese de nulidade, a nanoemulsão do óleo essencial *P. fragrantissimum* não apresentam atividade larvicida na espécie *A. aegypti*.

Apesar de *P. fragrantissimum* ser uma espécie nativa do Brasil, presente na região Amazônica e na Mata Atlântica, poucos estudos foram encontrados em levantamento bibliográfico sobre ações biológicas desta espécie de planta. Diante disso, espera-se que esta pesquisa seja uma referência para incentivar outros estudos que suportam o impacto positivo na saúde humana, no controle de vetores das doenças, e no uso de produtos naturais que sejam não prejudiciais ao meio ambiente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DIVERSIDADE DE PLANTAS

Assume-se hoje que a maior parte dos produtos farmacêuticos foi desenvolvida a partir dos produtos naturais. A despeito deste fato, estima-se que diante da grande diversidade de espécies de plantas no mundo, apenas 15% delas tenham sido submetidas a algum estudo científico para avaliar suas potencialidades na preparação de novos produtos. Estima-se também, que 70% das plantas existentes no planeta ocorrem em apenas 11 países: Austrália, Brasil, China, Colômbia Equador, Índia, Indonésia, Madagascar, México, Peru e República Democrática do Congo (NOGUEIRA et al., 2010). As florestas tropicais concentram mais de 50% das espécies de plantas do mundo, mas a Floresta Amazônica não é a única região de vasta biodiversidade na América do Sul. A Mata Atlântica e o Cerrado são também considerados hotspots de biodiversidade, ou seja, estão incluídos entre os mais ricos e mais ameaçados reservatórios de vida animal e vegetal no planeta (CONSERVATION INTERNATIONAL, 2010).

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade (em torno de 15 a 20% do total mundial) com destaque para as plantas superiores, nas quais detém aproximadamente 24% da biodiversidade (BRASIL, 2006a). A inclusão brasileira decorre do fato de que o país possui a maior diversidade genética vegetal do mundo, com cerca de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies e, também, por possuir ampla tradição do uso das plantas medicinais, vinculada ao conhecimento popular, transmitido oralmente por gerações (BRASIL, 2006b). Entretanto, apesar da Amazônia ser a região de maior biodiversidade do planeta, apenas uma fração dessa biodiversidade é conhecida. Portanto, além da necessidade de mais inventários biológicos, um considerável esforço de amostragem também é necessário para se identificar os padrões e os processos ecológicos e biogeográficos (SILVA; OLIVEIRA; LIMA, 2015).

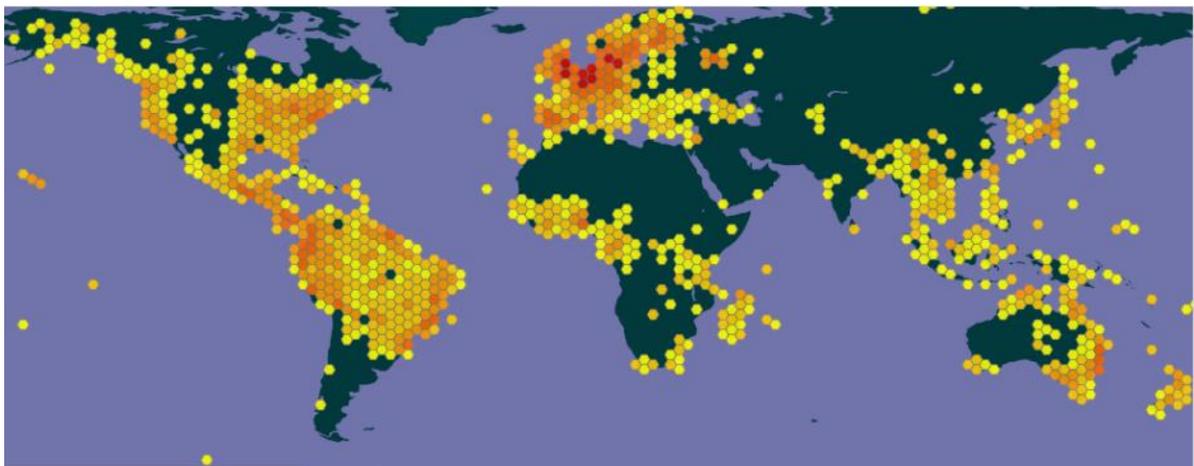
Entre os elementos que compõem a biodiversidade, as plantas são a matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos. Além de serem utilizadas como matéria-prima para a fabricação de medicamentos, as plantas são também utilizadas em práticas populares e tradicionais como remédios caseiros e comunitários, processo conhecido como medicina tradicional. Neste sentido,

compreende-se que o Brasil, com seu amplo patrimônio genético e sua diversidade cultural, tem em mãos a oportunidade para estabelecer um modelo de desenvolvimento próprio e soberano na área da saúde e uso de plantas medicinais e fitoterápicos, que prime pelo uso sustentável dos componentes da biodiversidade e respeite os princípios éticos e compromissos internacionais (BRASIL, 2006a).

2.2 FAMILIA ARACEAE

Araceae é uma família de monocotiledôneas herbáceas com 125 gêneros e cerca de 3750 espécies (IAS, 2016), amplamente distribuídas (Figura 1) especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, bem como nas regiões temperadas do hemisfério norte (ACOSTA, PÁTZCUARO, 2003).

Figura 1 - Distribuição Geográfica de *Araceae*



Fonte: GBIF (2018)

No Brasil, a família Araceae encontram-se distribuídas em todo território nacional, sendo representadas por 36 gêneros e aproximadamente 485 espécies com ocorrência de norte ao sul do Brasil: No norte: Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins; nonordeste: Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe; no Centro-oeste: Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso; e no Sul: Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina (COELHO et al., 2016). No Brasil, principalmente na área do bioma Cerrado, ainda é subestimada em número de espécies, já que poucos estudos

existem para colaborar com informações técnicas que permitam melhor conhecer esta família (SENA; RIBEIRO, 2006).

As espécies da família Araceae são pouco frequentes em regiões frias, desenvolvendo-se melhor em temperaturas entre 16 e 30°C, à exceção da *Zantedeschia aethiopica* (ex. gênero Calla), que resiste a temperaturas inferiores a 0°C. Elas apresentam-se em variadas formas: ervas, trepadeiras, geófitas (caule tuberoso e subterrâneo), epífitas (sobre plantas), rupícolas (sobre rochas), reófitas (plantas resistentes a correntes aquáticas) e helófitas (plantas que crescem ao longo ou as margens de rios). Muitas são cultivadas, sobretudo, para propósitos ornamentais (DOS SANTOS, 2011).

Na medicina popular são descritas diversas aplicações para o uso de algumas espécies, tais como contraceptivo, no tratamento de doenças reumáticas e da pele, contra vermes intestinais, mordidas de cobra e hemorroidas. Apesar disto, algumas subfamílias são citadas como responsáveis por acidentes tóxicos, inclusive letais.

A toxicidade é uma das principais características da família Araceae, apesar de que os constituintes químicos responsáveis pelos efeitos tóxicos ainda são, em sua maior parte, desconhecidos (DOS SANTOS, 2011; CORREA et al., 2005; SNITF, 2016).

De acordo com APG IV (2016), a classificação taxonômica de Araceae é a seguinte:

- Divisão: Magnoliophyta
- Classe: Liliopsida
- Ordem: Alismatales
- Família: Araceae

Dentre os gêneros com maior número de espécies se destacam *Anthurium* e *Philodendron*, com muitos representantes nativos do Brasil (OTTOBELLI et al., 2011).

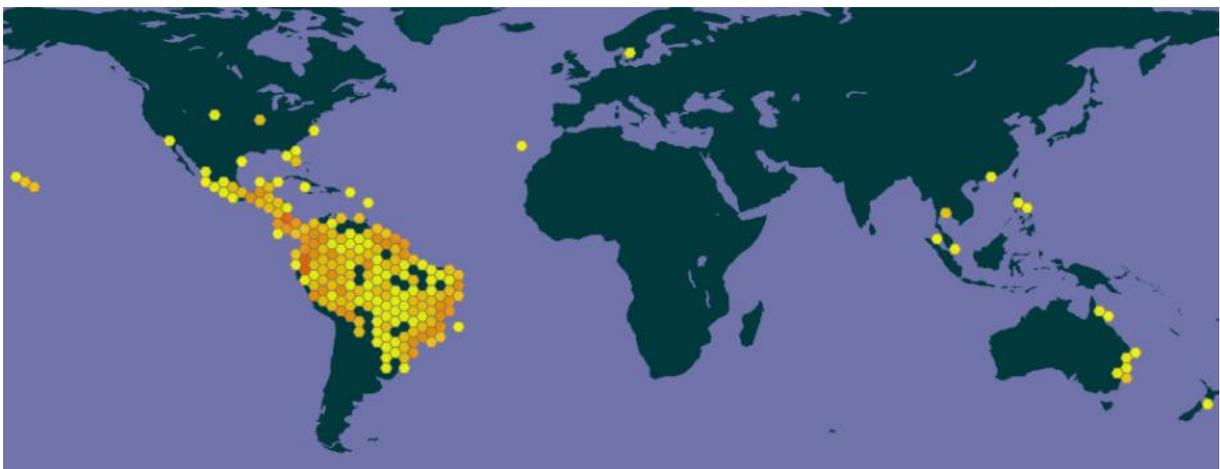
2.3 GÊNERO *Philodendron* Schott

O gênero neotropical *Philodendron* Schott é um dos mais importantes da família Araceae, sendo o segundo maior depois de *Anthurium* Schott. Possui cerca de 500 espécies e é utilizado na floricultura, como planta ornamental devido a beleza de sua folhagem. É principalmente um grupo de floresta tropical, mas podendo ocorrer em outros habitats. incluindo brejos, afloramentos rochosos e até regiões semiáridas

(COELHO; MAYO 1998). O gênero *Philodendron* Schott é constituído pelos subgêneros *Meconostigma* Schott, *Philodendron* Schotte *Pteromischum* Sail, e cada subgênero possui seu padrão morfológico, anatômico e distribuição geográfica (DOLABELA et al., 2015).

A riqueza de espécies de *Philodendron* é especialmente significativa na América Latina (Figura 2), especialmente no Brasil, onde 168 espécies foram descritas até o momento, sendo distribuídas no Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima) Nordeste (Alagoas, Bahia, Pernambuco, Sergipe) e Sudeste (Espírito Santo) (Figura 1) (COELHO et al., 2016). Em um estudo realizado por Neto et al. (2009), visando as angiospermas epífitas de três áreas de altitude no sudeste de Minas Gerais, *Philodendron* se encontrava entre os cinco gêneros mais diversos. Irume et al., (2013) descreveu os 15 gêneros de epífitas mais diversos registrados no bosque de terra firme da bacia de Urucu, centro da Amazônia, Brasil, sendo *Philodendron* um dos mais diversos e abundantes.

Figura 2 - Distribuição Geográfica de *Philodendron*.



Fonte: GBIF (2018)

Existem registros na literatura relatando que espécies do gênero *Philodendron* apresentam constituintes químicos ativos contra *Trypanossoma cruzi* e *Trichomonas vaginalis*, dentre as quais se destaca *P. bipinnatifidum* Schott (MUELAS et al., 2000). Frausin et al., (2015) relataram que os gêneros neotropicais *Philodendrom* schotte *Anthurium* Schott foram os melhores representados, e mais úteis para o tratamento da malária, febres, problemas hepáticos e dores de cabeça. Além disso, ao gênero *Philodendron* se atribuem muitas propriedades na medicina popular (Quadro 1).

Quadro 1 -Aplicações na medicina popular para algumas espécies de *Philodendron*

Espécie	Parte da Planta	Uso
<i>P. acutatum</i>	Planta inteira	Aplica o exsudado às feridas causadas por larvas de mosca e flechas envenenadas.
<i>P. brevipathum</i>	Caule	Usado para tratar a mordida de escorpião.
<i>P. deflexum</i>	Raiz	Usado para mordidas de formiga.
	Raízes adventícias	É usado contra as picadas de insetos e mordidas de cobra.
	Pecíolo	Usado para aliviar dores de dente e preparados para aliviar a coceira do corpo.
<i>P. goeldii</i>	Tallo	A água é gotejada em feridas causadas por flechas envenenadas.
<i>P. grandifolium</i>	Raiz aérea	Um segmento é cozido em água e usado para inflamações da boca.
<i>P. hylaeae</i>	Raiz	Ralado e colocado em ferida mordida de verme Oestridae para matar a larva.
	Folha	Um pedaço de folha é colocado na cavidade dentária para aliviar a dor de dente.
<i>P. linnaei</i>	Planta inteira	Decocção para curar farpas e como lavagem para malária e falta de ar.
	Exsudado	Usado para fungos de pele.
	Raiz	Quebrada e esfregada em ferida causada pelo verme de mosca.
	Folha	Usado para tratar o inchaço no noroeste da Guiana.
<i>P. pedatum</i>	Planta inteira	Para tratar a mordida de cobra e a seiva é gotejada em um pedaço de algodão que é colocado para aliviar a dor de dente.
		Folha: usado para dor nas costas no noroeste da Guiana.
<i>P. riedelianum</i>	Folha	Espremer as folhas para a seiva, que é uma revulsiva (contra-irritante) usada em inchaço.
<i>P. rudgeanum</i>	Folha	Espremer as folhas para a seiva, que é uma revulsiva (contra-irritante) usada em inchaço. Beber uma infusão de folhas trituradas para expulsar os vermes estomacais (provavelmente ascaris).
<i>P. scandens</i>	Folha	São fervidas e a decocção derramada sobre feridas causadas pelo verme mosca. Usado para tratar a mordida de munuri formiga (<i>Pariponera clavata</i>), mordida de cobra, dor de olhos, feridas e cortes.
<i>P. solimoesense</i>	Folha	São fervidas e a decocção derramada sobre feridas causadas pelo verme botou o mosca.

Continua..

Quadro 1 -Aplicações na medicina popular para algumas espécies de *Philodendron*

Espécie	Parte da Planta	Uso
<i>P. tessmannii</i>	Planta inteira	Decocção como tratamento para gonorréia.
	Folha	Beber uma infusão de folhas trituradas para prevenir ou reduzir o vômito.
<i>P. spp.</i>	Raiz aérea	A infusão é bebida para tratar a sífilis, reumatismo e doenças da pele.
<i>p. fragrantissimum</i>	Usa raiz	Afrodisíaco líquido e chá
	Caule e folha	Decocção para febrífugas, diurético, emoliente
	Folha	Para reduzir a dor e a inflamação do reumatismo, aquecido e esfregado em áreas edematosas

Fonte: Adaptado de Defilipps et., al (2004) e López, (2006)

Muitas das espécies que pertencem ao gênero *Philodendron* são popularmente conhecidas em diversas partes do Brasil como “imbés”. Morfologicamente podem ser caracterizadas pela presença de lâmina foliar em geral oval a oval-triangular a orbicular, raramente oblonga; base cordada ou sagitada, raramente truncada, cuneada ou arredondada; lóculos do ovário com um a poucos óvulos e apresentando placentação basal ou sub-basal. (SAKURAGUI, 2008)

2.3.1 *Philodendron fragrantissimum* (Hook.) G.Don

P. fragrantissimum (Hook.) G.Don (Figura 3) é uma planta epífita de tronco, trepadeira, catáfilos persistentes, em fibras castanhas avermelhadas. Folhas com pecíolo, plana ou amplamente côncava acima. Inflorescências, espata com o tubo vermelho intenso para purpura internamente e externamente, a folha esbranquiçada, espádice. Frutos maduros cor vermelhos (Figura 3). *P. fragrantissimum* se distribui, principalmente na América Latina, Belice e Guatemala, Perú, Brasil, Cuba e as Guianas. Na Costa Rica é conhecida em climas muito úmidos de toda a encosta do Caribe e do declive do Pacífico (Figura 4) (FLORURA, 2013).

Figura 3 – Foto da espécie *P. fragrantissimum* (Hook.) G.



Fonte: Da Silva (2014).

Figura 4 - Distribuição Geográfica de *P. fragrantissimum*.



Fonte: Discover (2018)

No Brasil, *P. fragrantissimum* é nativa, mas não é endêmica. Está presente na região Amazônica, bem como na Mata Atlântica. Até agora, foi descrita no Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima) no Nordeste (Alagoas, Bahia, Pernambuco, Sergip) e no Sudeste (Espírito Santo). *Philodendron fragrantissimum* é o nome aceito para a espécie, mas possui oito sinônimos: *Philodendron accrescens* Simmonds, *Philodendron brevilaminatum* Schott, *Philodendron clementis* Griseb, *Philodendron demerarae* Gleason, *Philodendron latipes* K. Koch & Augustin, *Philodendron poeppigii* Schott, *Caladium fragrantissimum* Hook. e *Arosma obtusifolia* Raf (FLORA DO BRASIL, 2018).

2.4 METABOLITOS SECUNDÁRIOS

O conceito de metabolismo secundário em biologia foi descrito por Kossel (1891), que foi o primeiro autor a definir os metabólitos secundários como opostos aos metabólitos primários. Os metabólitos secundários têm sido sumariamente definidos como compostos pouco abundantes, com uma frequência inferior a 1% do carbono total, ou pelo fato de sua estocagem ocorrer em órgãos ou células específicas (FUMAGALI et al., 2008). Portanto, os metabólitos primários possuem função estrutural e de armazenamento de energia, enquanto que os metabólitos secundários, aparentemente, não possuem relação com crescimento e desenvolvimento da planta (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Os metabólitos secundários, geralmente de estrutura complexa e baixo peso molecular, possuem atividades biológicas marcantes e diferentemente dos metabólitos primários. Apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (BERG; LUBERT, 2008). Embora os produtos secundários possuam uma variedade de funções nas plantas, é provável que a sua importância ecológica tenha alguma relação com potencial efeito medicinal (VIZZOTO; KROLOW; BRUCH 2010).

Cada família, gênero e espécie produz uma categoria química característica ou uma mistura delas e podem ser utilizadas como caracteres taxonômicos na classificação das plantas. A biossíntese de metabólitos secundários é realizada por rotas metabólicas específicas do organismo, ocorrendo estreita relação entre essas rotas e aquelas responsáveis pela síntese de metabólitos primários (CASTRO et al., 2004). A síntese de metabólitos secundários é influenciada por diversos fatores:

sazonalidade; ritmo circadiano e desenvolvimento; temperatura; disponibilidade hídrica; radiação ultravioleta; nutrientes; altitude; poluição atmosférica; indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos, alterando a sua quantidade e muitas vezes, até a natureza dos constituintes ativos presentes no tecido (GOBBO; LOPES, 2007).

São inúmeros os metabólitos secundários que as plantas desenvolveram ao longo de sua existência para garantir a sua sobrevivência. Podem ser divididos em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados, todos derivados do metabolismo da glicose, via ácido chiquímico e acetato. Os compostos terpenóides são derivados de isoprenóides (via mevalonato), sintetizados a partir do acetil coenzima A. Os compostos fenólicos são derivados das rotas do ácido chiquímico e mevalônico, mas principalmente do primeiro. Do ácido chiquímico derivam o triptofano, fenilalanina, tirosina e ácido gálico, moléculas base para a construção de cumarinas, ligninas, taninos e flavonóides. Os compostos nitrogenados são sintetizados a partir de lisina, tirosina e triptofano dando origem aos alcalóides. As principais funções nos vegetais são para proteção contra viroses, bacterioses, infecções fúngicas, herbivoria e também atuam para atrair ou repelir outros organismos e para resistir ao estresse ambiental (TAIZ; ZEIGER, 2006).

2.5 ÓLEO ESSENCIAL

Óleos essenciais são resultantes do metabolismo secundário das plantas, normalmente formados em células ou grupos de células especializadas, geralmente encontradas nos caules e folhas (HILI; EVANS e VENESS, 1997). Os óleos essenciais são extraídos de diversas plantas aromáticas que na maioria das vezes estão localizadas em países de clima temperado a quente, como nos países tropicais e na da região do Mediterrâneo, onde representam uma parte importante da farmacopeia (BURT, 2004).

O óleo essencial é uma mistura de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas (SIMÕES; SPITZER, 2004). Quimicamente podem ser constituídos por hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpenos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos contendo enxofre, apresentando diferentes concentrações (TAIZ e ZEIGER, 2006). Os terpenos e fenólicos, dentre os compostos químicos citados, os

principais responsáveis pelas aplicações medicinais, culinárias e flavorizantes (DORMAN; DEANS, 2000).

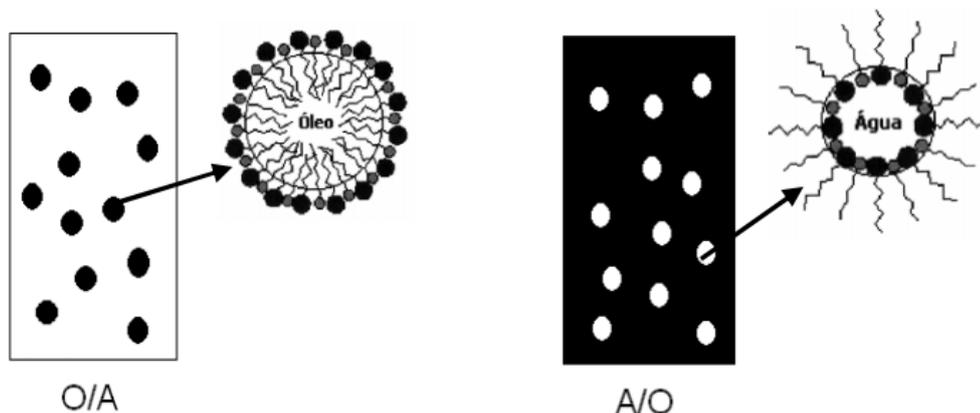
Os óleos essenciais são constituídos por complexas misturas naturais que podem conter 20-60 compostos em concentrações bastante diferentes. Porém existem na maioria das vezes 2 ou 3 componentes em concentrações mais elevadas que são denominados majoritários, podendo estar presente em concentrações de até 70%. As plantas utilizam os óleos essenciais na natureza para fins de proteção, exercendo diversas ações biológicas de acordo com as necessidades do vegetal, dentre elas, atividade bactericida, antifúngica, antiviral, efeitos em herbívoros através da redução da palatabilidade, atração ou repelência de insetos (BAKKALI et al., 2008).

2.6 EMULSÃO E NANOEMULSÕES

Emulsão é um sistema coloidal termodinamicamente instável constituído por duas fases líquidas imiscíveis, sendo uma dispersa na outra (HOLMBERG et al., 2002). As emulsões, em geral, contêm três componentes: água, óleo e emulsificantes (MORRISON; ROSS, 2002), sendo que os últimos são usualmente tensoativos (TADROS et al., 2004).

As emulsões simples podem ser classificadas em água em óleo (A/O), quando as gotículas da fase aquosa estão dispersas numa fase contínua oleosa; ou óleo em água (O/A), quando as gotículas da fase oleosa estão dispersas numa fase contínua aquosa (FORGIARINI et al., 2001) (Figura 5).

Figura - 5. Representação esquemática mostrando os glóbulos das emulsões óleo / água (O/A) e água / óleo (A/O).



Fonte: Oliveira (2008).

Os agentes tensoativos, ou emulsificantes, são moléculas com características anfífilas que adsorvem na interface entre a fase dispersa e a dispersante, durante o processo de emulsificação e podem prontamente prevenir fenômenos de instabilidade e, conseqüentemente, uma possível separação de fases (LOCHHEAD, 1994). Os tensoativos foram classificados numericamente segundo suas características de hidrofília e lipofília, conhecida como escala de Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo (EHL). Substâncias de EHL muito baixo, ou menor que três, são lipofílicas, apresentando apenas propriedades antiespumantes. Substâncias de EHL entre três e nove já apresentam propriedades emulsificantes dando origem a emulsões do tipo A/O. Substâncias de EHL entre oito e dezesseis já começam a apresentar características hidrofílicas dando origem a emulsões do tipo O/A. Substâncias de EHL acima de dezesseis já apresentam características hidrofílicas atuando como solubilizantes (PRISTA et al., 1991). Esse sistema permite que se conheça a ideal composição de uma emulsão para que ela apresente a estabilidade requerida (GRIFFIN, 1949).

O prefixo “nano” está relacionado a uma escala de medida em que um nanômetro representa um bilionésimo do metro ou um milionésimo do milímetro. Estruturas nessa escala apresentam propriedades funcionais únicas não encontradas na escala macro (CHAU; WU; YEN, 2007).

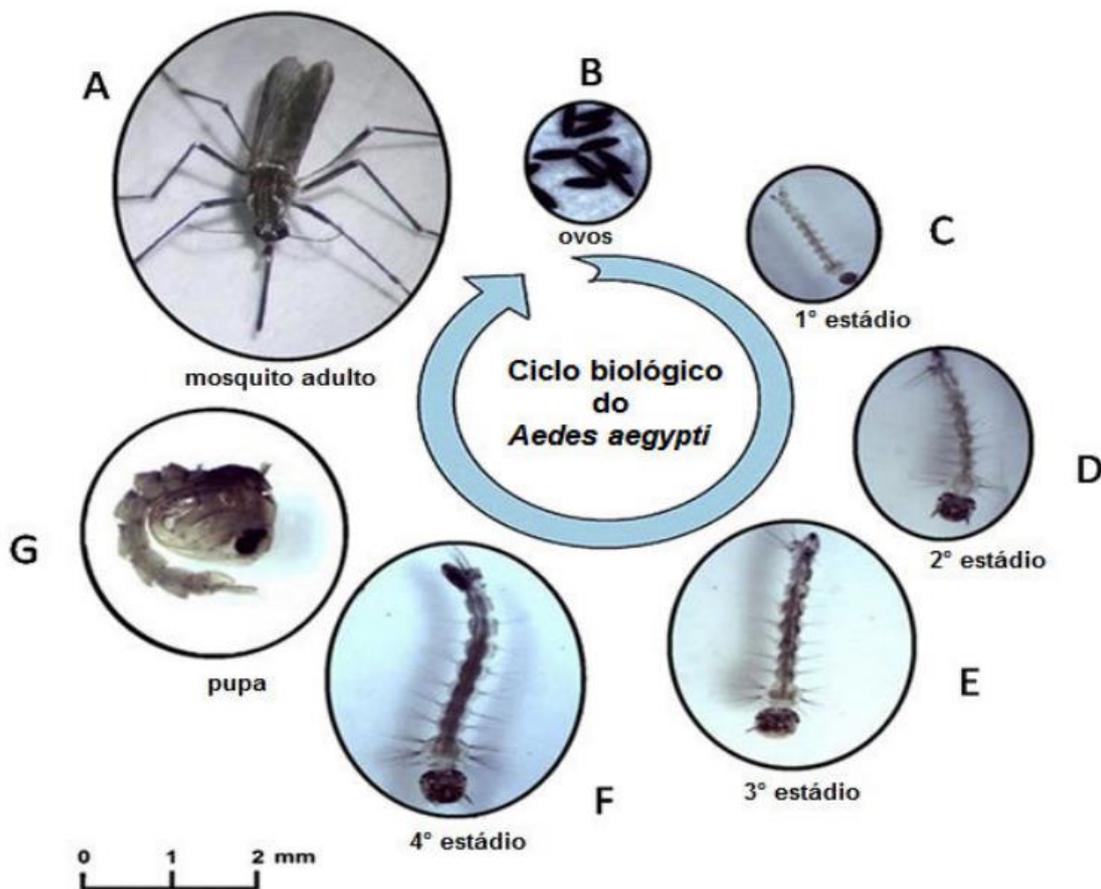
As nanoemulsões são sistemas constituídos de glóbulos de tamanho reduzido, variando de 20 a 500 nm, podem ter uma aparência translúcida quando apresentam granulometria menor que 200nm e de aparência leitosa acima de 200nm. As nanoemulsões são cineticamente estáveis, ou seja, estáveis, por um longo período de tempo. O tamanho reduzido dos glóbulos dificulta a deformação, diminuindo ainda mais a instabilidade por coalescência (FORGIARINI et al., 2001; FERNANDEZ et al., 2004; TADROS et al., 2004; CAPEK, 2004)

A obtenção de nanoemulsões pode envolver alta ou baixa energia de emulsificação. As técnicas que fazem uso de alta energia recorrem à energia por meio de alta tensão de cisalhamento, geralmente por meio de homogeneizadores de alta pressão ou geradores de ultrassom (FERNANDEZ et al., 2004). As técnicas de baixa energia de emulsificação, como a temperatura de inversão de fases, utilizam as propriedades físicoquímicas dos sistemas para obter emulsões com gotas muito pequenas (TADROS et al., 2004).

2.7 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762)

O *A. aegypti* é originário da África e se espalhou para outros países através dos navios negreiros (FIOCRUZ, 2016). Ele apresenta duas fases evolutivas: fase larvária ou imatura (fase aquática) e fase adulta ou alada (fase aérea). O *A. aegypti* é uma espécie holometabólica (metamorfose completa) que passa por quatro estágios distintos: ovo, larva, pupa e adulto. O estágio de larva acontece em quatro estádios (1º ao 4º), e o estágio de pupa é o último do ciclo aquático do inseto (REGAZZI, 2003) (Figura 6).

Figura 6 - Estágios de desenvolvimento do mosquito *A. aegypti*.



Fonte: GERIS et al (2015)

O ciclo começa quando uma fêmea adulta deposita seus ovos nas paredes dos reservatórios com água limpa e parada onde em cerca de 30 minutos elas se desenvolvem. Em condições favoráveis de umidade e temperatura, o

desenvolvimento do embrião do mosquito é concluído em 48 horas. Os ovos dos mosquitos podem permanecer por mais de um ano em locais secos, sendo portanto, resistentes à dessecação. Uma fêmea pode dar origem a 1.500 mosquitos durante a sua vida. Se a fêmea estiver infectada pelo vírus da dengue quando realizar a postura de ovos, há a possibilidade de as larvas filhas já nascerem com o vírus, no processo chamado de transmissão vertical (CONSOLI; LOURENÇO, 1998; FUNASA, 2001; OLIVEIRA, 2015; FIOCRUZ, 2017).

Após a eclosão dos ovos, emergem as larvas que apresentam quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4). As larvas de *A. aegypti* apresentam um aspecto alongado e vermiforme, corpo definido em cabeça, tórax e abdômen. De aspecto globoso e mais robusto, a cabeça e o tórax têm uma maior quantidade de quitina, já o abdômen fino, liso, flexível e dividido por nove segmentos garante grande mobilidade (ABED et al., 2007).

As larvas de *A. aegypti* passam todo o período de sua vida se alimentando de detritos orgânicos, bactérias, leveduras, vitaminas e sais minerais. O desenvolvimento completo ocorre entre 5^o e 7^o dia após a eclosão dos ovos, podendo variar também de acordo com as condições de temperatura, densidade populacional e a quantidade de suplementação alimentar presente no ambiente. Enquanto a fase larval passa todo o período da vida se alimentando (NATAL, 2002).

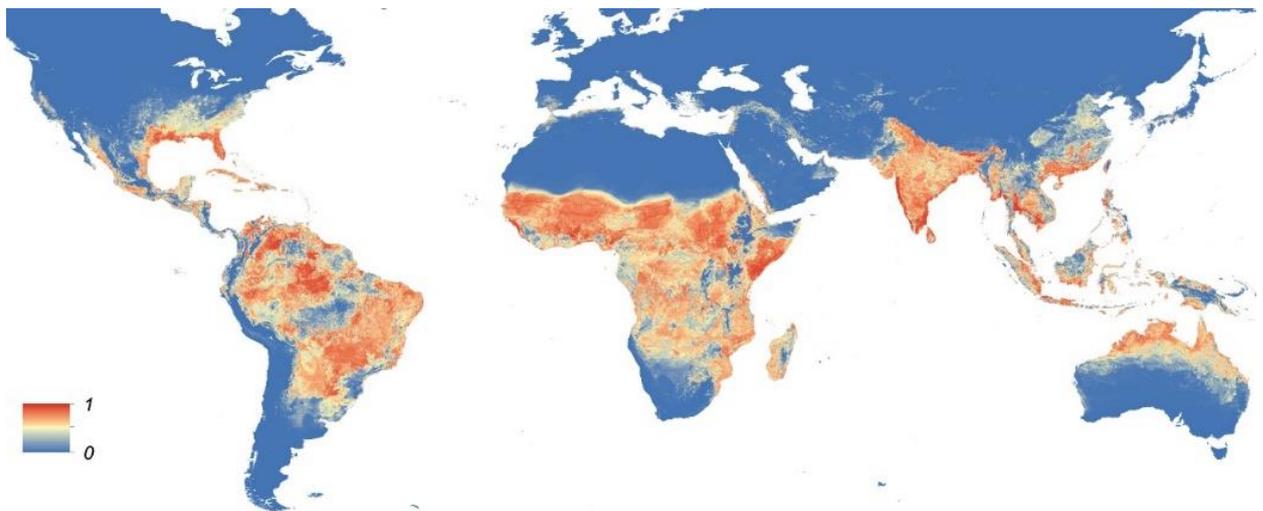
Após o quarto e último estágio larval, ocorre a primeira metamorfose e a passagem para a fase de pupa. Nesta fase, os indivíduos não mais se alimentam e utilizam as reservas energéticas, armazenadas durante o estágio larval para a realização da segunda metamorfose. Após 48 a 72 h da pupa emerge a forma alada do mosquito (BESERRA et al., 2009).

Na forma de mosquitos adultos, machos e fêmeas, buscam por fontes de carboidratos, adquiridos na alimentação de seivas vegetais, essenciais ao seu metabolismo básico. Além disso, as fêmeas também necessitam de alimentação sanguínea para a produção de ovos. A maturidade sexual é alcançada aproximadamente 24 horas após a passagem para a fase adulta (OLIVEIRA, 2015).

Apesar de *A. aegypti* conseguir manter uma população considerável durante as estações menos chuvosas, reproduzindo-se em criadouros semipermanentes e independentes das chuvas, como caixas de água, cisternas e tonéis, é na estação chuvosa que a abundância aumenta significativamente (CONSOLI; LOURENÇO, 1998).

A. aegypti ocorre principalmente nos trópicos e subtropicais, com concentrações no norte do Brasil e no sudeste da Ásia, incluindo toda a Índia, mas com relativamente poucas áreas de adequação na Europa (apenas na Espanha e na Grécia) (Figura 7) (KRAEMER et al., 2015).

Figura 7 - Mapa global da distribuição prevista de *A. aegypti*. O mapa mostra a probabilidade de ocorrência (de 0 azul para 1 vermelho).



Fonte: Kraemer et al., 2015

2.8 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR *Aedes aegypti*

As arboviroses são doenças causadas pelos chamados arbovírus, vírus que é essencialmente transmitido por artrópodes como os mosquitos. Estas doenças ocupam destaque nos países tropicais e subtropicais (ALENCAR et al., 2008). A expressão "vírus transmitido por artrópodes" foi introduzida em 1942 para descrever um grupo de vírus que se espalham por artrópodes e transmissíveis biologicamente a vertebrados hospedeiros. Duas décadas depois, o International Committee on the Nomenclature of Viruses, oficialmente recomendou o termo arbovírus para se referir aos vírus mantidos através de ciclos envolvendo vetores de artrópodes hematófagos e hospedeiro vertebrado. Também é importante saber que a região amazônica é o maior reservatório de arbovírus em todo o mundo. Até o ano de 2014, 196 de ao menos 200 tipos de arbovírus encontrados no Brasil foram identificados na Amazônia

brasileira, onde a maior variedade tem sido isolados, enquanto muitas das cepas virais não foram encontrados em nenhum outro local (CASSEB, 2014).

O mosquito *A. aegypti* tornou-se na atualidade um dos maiores inimigos do homem por ser vetor de diversas doenças, como a febre amarela, dengue, Zika e a chikungunya. Estas doenças tornaram-se um grande problema para a saúde pública e podem se apresentar na forma branda, ou na forma mais severa, que levam a consequências gravíssimas, como exemplos, a encefalopatia, síndrome de Guillian-Barré, síndrome de Reye, síndrome cerebelar, paresias, paralisias, neuropatias, hepatite, nefrite, insuficiência renal aguda, trombocitopenia e muitas outras. Atualmente, existe vacina apenas contra a febre amarela e a única forma de prevenir as demais é controlando a população do mosquito transmissor (FLORENTINO et al., 2016). A transmissão do vírus ocorre através da picada de uma fêmea adulta infectada, sendo que uma única fêmea de *A. aegypti* é capaz de transmitir o vírus até 12 vezes ou mais, ao longo de sua vida (MARÇAL; SANTOS, 2004).

Epidemiologicamente, até o ano de 2013 a Dengue (DENV) foi consolidada como a única doença arboviral de real preocupação em termos de morbidade e mortalidade desse grupo na América Latina. Foi então quando os primeiros casos de outros arbovírus como Chikungunya (CHIKV) no Caribe e mais tarde Zika (ZIKV) (que aparentemente entraram no Brasil nesse ano) começaram a ser registrados (PATIÑO; RODRIGUEZ, 2017).

2.8.1 Dengue

A dengue (DENV) é um flavivírus da família Flaviviridae, dos quais existem quatro sorotipos distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Ao nível global, a dengue é consolidada como Arbovirose mais comum, com 40% da população mundial vivendo em áreas suscetíveis à transmissão do vírus (PATIÑO; RODRIGUEZ, 2017).

A febre da dengue reapareceu como um grande desafio para a saúde pública no mundo, com 2,5 bilhões de pessoas em risco de infecção, mais de 100 milhões de casos e 25 mil mortes relatadas anualmente. Até agora, acreditava-se que as infecções por dengue eram causadas por quatro serótipos antigênicamente distintos, vírus da dengue DENV -1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, cada um gerando uma resposta imune ao hospedeiro exclusivo infecção, estes quatro serótipos são

geneticamente similares e compartilham aproximadamente 65% de seus genomas. No entanto, a quinta e última adição aos serótipos existente do vírus da dengue é DENV-5, foi anunciada em outubro de 2013. DENV-5 como se conhece, foi detectado durante a detecção de amostras virais de um agricultor de 37 anos na Malásia em 2007. Inicialmente, pensou-se que a infecção no agricultor era um caso comum de dengue da selva causada pelo DENV-4, mas quando uma sequência genética completa foi feita, observou-se que o vírus era filogeneticamente distinto das três formas anteriores da selva DENV-4 e tinha alguma semelhança com DENV-2.3. Como não havia sido relatado nos últimos 50 anos, nenhum serótipo novo foi inicialmente acreditado que o novo vírus poderia ser uma variante do serótipo da dengue 4. No entanto, quando os macacos rhesus foram pré-infectados com os outros quatro serótipos e já foram se recuperaram da infecção infectadas com DENV-5, produziram um conjunto significativamente diferente de anticorpos. Isto indubitavelmente demonstrou que o novo vírus era, de fato, um novo serótipo e não uma variante do DENV-4 (MUSTAFA et al., 2015).

Em 2018, até a Semana epidemiológica (SE) #3, (31/12/2017 a 20/01/2018) a região Sudeste apresentou o maior número de casos prováveis (4.066 casos; 43,3%) em relação ao total do país. Em seguida aparecem as regiões Centro-Oeste (2.481 casos; 26,4%), Norte (1.056 casos; 11,2%), Nordeste (914 casos; 9,7%) e Sul (882 casos; 9,4%) (Tabela 1) (Brasil, 2018a).

Tabela 1 – Número de casos prováveis de dengue, até a SE # 3 de 2017 e 2018, (31/12/2016 a 20/01/2017 e igual período do ano de 2018) por região e Unidade da Federação, Brasil.

Região/ Unidade da federação	Casos prováveis (n)	
	2017	2018
Norte	2.156	1.056
Rondônia	425	97
Acre	183	395
Amazonas	337	209
Roraima	10	15
Pará	756	129
Amapá	103	4
Tocantins	342	207
Nordeste	4.020	914
Maranhão	271	69
Piauí	96	24
Ceará	1.320	326
Rio Grande do Norte	344	101
Paraíba	123	62
Pernambuco	356	227
Alagoas	110	102
Sergipe	50	2
Bahia	1.350	91
Sudeste	5.818	4.066
Minas Gerais	3.235	1.243
Espirito Santo	838	233
Rio de Janeiro	1.071	290
São Paulo	674	2.330
Sul	330	882
Paraná	263	775
Santa Catarina	28	49
Rio Grande do Sul	39	58
Centro-Oeste	4.536	2.481
Mato Grosso do Sul	166	187
Mato Grosso	816	397
Goiás	3.433	1.805
Distrito Federal	121	92
Brasil	16.860	9.399

Fonte: Adaptado de Brasil (2018a).

2.8.2 Chikungunya

O vírus Chikungunya é um vírus do gênero *Alphavirus*, pertencente à família *Togaviridae*. Historicamente, sua apresentação tem sido em grandes epidemias que ocorreram em países da África, Ásia, Europa e especialmente em ilhas dos Oceanos Índico e Pacífico, a infecção por CHIK, descrita há mais de meio século, não afetou a Continente americano, até chegar no final de 2013 às ilhas do Caribe através de casos importados que, graças à presença de seus vetores e, principalmente, *A. aegypti*, desenvolveram casos autóctone que, até 2014, conseguiram distribuir-se por todo o continente americano, tornando-se em uma nova endemia nos países tropicais do continente, incluindo a transmissão autóctone da Flórida nos Estados Unidos da América para o Brasil (PATIÑO; RODRIGUEZ, 2017).

O vírus Chikungunya (CHIKV, *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*), transmitido aos humanos pela mordida de *Aedes spp.* mosquito, leva a uma febre aguda associada a uma síndrome de artromialgias. Até recentemente, o mosquito *A. aegypti* foi amplamente aceito como o principal vetor urbano de CHIKV (GRANDADAM et al., 2011).

Em 2018, até a SE # 3 (31/12/2017 a 20/01/2018) no Brasil na região Centro-Oeste apresentou o maior número de casos prováveis de febre de Chikungunya (603 casos; 40,1%) em relação ao total do país. Em seguida aparecem as regiões Sudeste (440 casos; 29,2%), Nordeste (292 casos; 19,4%), Norte (128 casos; 8,5 %) e Sul (42 casos; 2,8%) (Tabela 2) (Brasil, 2018a).

Tabela 2 – Número de casos prováveis de febre de Chikungunya, até a SE # 3 de 2017 e 2018, (31/12/2016 a 20/01/2017 e igual período do ano de 2018) por região e Unidade da Federação, Brasil.

Região/ Unidade da federação	Casos prováveis (n)	
	2017	2018
Norte	1.269	128
Rondônia	34	13
Acre	10	10
Amazonas	27	2
Roraima	16	2
Pará	905	74
Amapá	13	0
Tocantins	264	27
Nordeste	2.814	292
Maranhão	191	30
Piauí	27	7
Ceará	901	132
Rio Grande do Norte	105	36
Paraíba	41	19
Pernambuco	114	47
Alagoas	74	3
Sergipe	54	1
Bahia	1.307	17
Sudeste	870	440
Minas Gerais	362	228
Espirito Santo	57	15
Rio de Janeiro	375	92
São Paulo	76	105
Sul	24	42
Paraná	15	26
Santa Catarina	6	11
Rio Grande do Sul	3	5
Centro-Oeste	158	603
Mato Grosso do Sul	7	12
Mato Grosso	121	567
Goiás	21	21
Distrito Federal	9	3
Brasil	5.135	1.505

Fonte: Adaptado de Brasil (2018a)

2.8.3 Zika

ZIKV é um membro da família Flaviviridae, gênero Flavivirus, e transmitido entre humanos por espécies de mosquitos *Aedes*, como *A. aegypti*, *A. albopictus* e *A. africanus*. O vírus foi primeiro isolado em 1947 de um macaco sentinela Rhesus na floresta Zika em Uganda. É classificado por análise de sequência em dois genótipos, africanos e asiáticos. Em maio de 2015, Zika foi informada no Brasil e depois em vários países da América Central e do Sul e do Caribe. No caso do Brasil, 30.0000 casos de infecção por ZIKA foram relatados antes de 30 de janeiro de 2016, a maioria dos casos no Brasil foram relatados no estado da Bahia. Entre novembro de 2015 e 30 de janeiro de 2016, 4783 casos suspeitos de microcefalia foram comunicados eletronicamente ao banco de dados (FARIA, 2016).

O vírus Zika foi relatado pela primeira vez no Brasil em maio de 2015, até 9 de fevereiro de 2016, a transmissão local da infecção havia sido relatada em 26 países ou territórios nas Américas. A infecção geralmente é assintomática e, quando os sintomas ocorrem, normalmente são uma doença leve, que se resolve espontaneamente, com sintomas como febre, erupção cutânea, artralgia e conjuntivite. No entanto, houve um aumento no número de crianças nascidas com microcefalia em regiões do Brasil com alta prevalência de casos suspeitos de doença do vírus Zika. Mais de 4 700 casos suspeitos de microcefalia foram relatados de meados de 2015 a janeiro de 2016, embora mais pesquisas possam resultar em um número menor. Em resposta, o Ministério da Saúde do Brasil estabeleceu um grupo operacional para investigar ainda mais possíveis conexões entre o vírus e anormalidades cerebrais em lactentes. (MARTINES, 2016).

Em 2018, até a SE 3, foram registrados 131 casos prováveis de febre pelo vírus Zika no país (tabela 3), com taxa de incidência de 0,1 casos/100 mil hab. destes, 19 (14,5%) foram confirmados (BRASIL, 2018a).

Tabela 3 – Número de casos prováveis de febre pelo vírus Zika, até a SE # 3 de 2017 e 2018, (31/12/2016 a 20/01/2017 e igual período do ano de 2018) por região e Unidade da Federação, Brasil.

Região/ Unidade da federação	Casos prováveis (n)	
	2017	2018
Norte	292	18
Rondônia	24	3
Acre	9	2
Amazonas	46	2
Roraima	5	0
Pará	178	0
Amapá	2	0
Tocantins	28	11
Nordeste	474	40
Maranhão	35	4
Piauí	1	1
Ceará	96	0
Rio Grande do Norte	36	10
Paraíba	9	3
Pernambuco	3	5
Alagoas	17	4
Sergipe	3	1
Bahia	274	12
Sudeste	409	26
Minas Gerais	62	6
Espirito Santo	34	4
Rio de Janeiro	285	0
São Paulo	28	16
Sul	12	12
Paraná	6	7
Santa Catarina	3	2
Rio Grande do Sul	3	3
Centro-Oeste	453	35
Mato Grosso do Sul	0	0
Mato Grosso	130	4
Goiás	315	28
Distrito Federal	8	3
Brasil	1640	131

Fonte: Adaptado de Brasil (2018a).

2.8.4 Febre amarela

A febre amarela é uma doença viral hemorrágica com alta taxa de mortalidade que reapareceu como uma ameaça para a saúde pública global, apesar de ter uma vacina segura e eficaz, ainda existem novas epidemias em vários países da África e da América do Sul (PATIÑO; RODRIGUEZ, 2017).

Sabendo que o Brasil tem uma população aproximada de 176 milhões e é importante notar que aproximadamente 30 milhões de pessoas vivem em uma área endêmica de febre amarela, 18 milhões em zonas de emergência e 128 milhões ao longo da costa livre da costa atlântica (VASCONCELOS et al., 2004).

Entre janeiro de 2016 e janeiro de 2018, sete países e territórios da região das Américas registraram casos confirmados de febre amarela: Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru e Suriname. Durante esse período, o maior número de casos humanos e epizooticos registrados na Região das Américas foi relatado em várias décadas. Durante as primeiras quatro semanas de 2018, foi observado um aumento exponencial no número de casos confirmados de febre amarela e os casos notificados nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro superaram significativamente o que foi relatado no período sazonal anterior. Além disso, casos confirmados de febre amarela (em dois cidadãos europeus) foram relatados para viajantes não vacinados, com histórico de permanência em municípios no Brasil considerados de risco para febre amarela e onde a circulação do vírus foi previamente evidenciada (OMS, 2018)

No período de monitoramento (de 1º de julho/2017 a 6 de fevereiro de 2018), foram confirmados 353 casos de febre amarela no Brasil, sendo que 98 vieram a óbito. Ao todo, foram notificados 1.286 casos de febre amarela suspeitos, sendo que 510 foram descartados e 423 permanecem em investigação, neste período. Já há um programa nacionalmente estabelecido de controle do *A. aegypti* em função de outras arboviroses (dengue, zika, chikungunya), que consegue manter níveis de infestação abaixo daquilo que os estudos consideram necessário para sustentar uma transmissão urbana de febre amarela. Além disso, há boas coberturas vacinais nas áreas de recomendação de vacina e uma vigilância muito sensível para detectar precocemente a circulação do vírus em novas áreas para adotar a vacinação oportunamente (BRASIL, 2018b)

2.9 O USO DE PLANTAS NO CONTROLE VETORIAL

Atualmente os métodos de combate aos insetos vetores são baseados na utilização de compostos químicos que possuem alta eficácia, rápida ação e custo acessível, no entanto as desvantagens do uso dessas substâncias ainda são muitas. Podemos citar, os riscos à saúde humana e os impactos ambientais como os principais problemas gerados pela utilização dos mesmos, sem contar os efeitos adversos em organismos não-alvos e a indução de resistência em populações de vetores. Apesar dos riscos supracitados em se utilizar os inseticidas convencionais, não podemos deixar de citá-los como parte importante no controle integrado de insetos nocivos. Dá-se o nome de “inseticidas” àqueles compostos que são utilizados contra as formas adultas de mosquitos e “larvicidas”, às formas imaturas (FORATTINI, 2002).

Os inseticidas e repelentes derivados de plantas constituíram uma das primeiras estratégias para controle dos mosquitos. Várias plantas têm sido investigadas em relação às suas propriedades inseticidas, tendo em vista o controle especificamente de mosquitos vetores, objetivando assim a redução de acúmulo de resíduos tóxicos no meio ambiente (SUKUMAR et al., 1991).

O primeiro registro do uso de extratos de plantas no controle de larvas de culicídeos foi feito por Campell et al. (1933). Os autores isolaram de uma erva da Rússia, *Anabasis aphylla* L. (Chenopodiaceae), alcalóides semelhantes à nicotina, com atividade letal em larvas de *Culex pipens*, *C. territans*, e *C. quinquesfasciatus*.

Sukumar et al.(1991) apresentaram ampla revisão sobre a bioatividade de 344 espécies vegetais em mosquitos, em diferentes estágios biológicos. Os autores relatam alguns trabalhos importantes que mostram a atividade larvicida de óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas, frente a mosquitos dos gêneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*.

Heal et al. (1950), relataram que 2.500 espécies de plantas de todo o mundo já foram testadas quanto às suas propriedades inseticidas. Em larvas de *A. aegypti*, compostos de plantas das famílias Annonaceae, Araceae, Asteraceae, Chenopodiaceae, Convolvulaceae, Flacourtiaceae, Fabaceae, Liliaceae e Simaroubaceae apresentaram atividade letal na faixa de 50 ppm a 200 ppm.

As plantas têm sido utilizadas como matérias-primas na fabricação de inseticidas e, com isto, várias delas entraram para a agricultura econômica no Brasil,

e principalmente na Amazônia. As primeiras referências sobre a aplicação destes inseticidas registram o uso de pó de raízes de *Derris elliptica*, conhecida por tuba, toeba ou Timbo. Os estudos demonstraram que *Derris elliptica* e *Derris uliginosa* se revelaram realmente ativas como inseticidas. Na região Amazônica, antes de 1945, os Estados do Amapá e do Pará eram produtores e exportadores do inseticida natural Timbó (*Derris*). Este foi introduzido na Europa e América do Norte na forma de um pó fino de casca de raiz e era usado em hortas (PIRES, 1978).

O timbó foi muito utilizado como inseticida natural antes do advento dos inseticidas sintéticos, desapareceu e está retornando para utilização na agricultura orgânica, mas em bases racionais. Antes da Segunda Guerra Mundial, os Estados do Amazonas e do Pará eram grandes exportadores de raiz de timbó, utilizada como inseticida. A descoberta da utilização do DDT pelo químico suíço Paul Hermann Müller (1899–1965), em 1939, para controle de insetos transmissores de doenças, acabou com o mercado de inseticidas naturais. O sucesso no combate às doenças fez com que, em 1948, recebesse o Prêmio Nobel de Medicina. Em 1967, com o uso dos organoclorados, as populações de *A. aegypti* foram erradicadas do Brasil, tendo sua reintrodução no estado do Pará anos mais tarde. Acredita-se que essa reintrodução, muito provavelmente, teria ocorrido devido a não erradicação do mosquito em países vizinhos. Com o reaparecimento desta espécie em várias regiões do Brasil, o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) começou a ser utilizado de forma indiscriminada, o que contribuiu com o aparecimento de populações resistentes (HOMMA, 2004).

Existe uma preocupação ambiental em relação ao uso de inseticidas sintéticos existentes para controle vetorial e maior risco de desenvolvimento de resistência generalizada aos inseticidas no vetor da doença; podem contribuir para que ocorra resistência dos mosquitos por estes apresentarem grande plasticidade genética. Os inseticidas e repelentes derivados de plantas constituíram uma das primeiras estratégias para controle dos mosquitos. Várias plantas têm sido investigadas em relação às suas propriedades inseticidas, tendo em vista o controle especificamente de mosquitos vetores, objetivando assim a redução de acúmulo de resíduos tóxicos no meio ambiente, já que os inseticidas naturais são rapidamente degradáveis e são obtidos de recursos renováveis. Assim, tem ocorrido um crescente interesse no desenvolvimento de métodos alternativos para o controle de mosquitos, que sejam menos perigosos para o médio ambiente, os seres humanos e outros organismos (SUKUMAR et al., 1991; EIRAS, 2011; ROEL, 2001; GARCEZ, et al. 2009).

2.10 INIBIDORES DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima do grupo de hidrolases que está presente na maioria dos seres vivos, principalmente em vertebrados - incluindo humanos -, mas também em invertebrados como insetos. Está localizado no sistema nervoso e nos músculos e é responsável por regular a concentração de acetilcolina (ACh), um neurotransmissor envolvido na sinapse colinérgica no sistema nervoso, permitindo a transmissão do sinal nervoso no sistema nervoso central e periférica (WIESNER et al., 2007).

Os inibidores de AChE (AChEI) envolvem um grande número de compostos com estruturas amplamente variáveis, que na presença de AChE conduzem à inibição da enzima, alterando assim as sinapses colinérgicas (KHAN, 2009). Estes compostos interagem de diferentes maneiras com a cavidade do sítio ativo da enzima e, em função deles.

Segundo Pohanka, (2011) são classificados em três grupos: 1. Compostos que interagem com o site ativo: os compostos gerais são prejudiciais, mesmo toxinas fatais pela formação de ligações covalentes com a serina, causando perda parcial ou total da atividade enzimática. 2. Compostos que interagem com a cavidade aromática: Em geral, esses tipos de compostos também interagem com o site ativo. No entanto, não se pode dizer que a cavidade aromática seja um alvo terapêutico para inibidores da colinesterase; sem embargo, compostos como a galantamina e decametônio (obtidos por síntese) têm interações com essa cavidade e são usados como medicamentos. 3. Compostos que interagem com o subsídio periférico aniônico: é um dos principais objetivos estudados para a busca e o design de medicamentos contra a doença de Alzheimer, graças à formação de placas amilóides em redes neurais.

Por outro lado, os compostos órgão-fosforados e os carbamatos são úteis como pesticidas, sua toxicidade torna seu uso atualmente restrito, então novas alternativas devem ser buscadas para substituí-los, os metabolitos secundários das plantas sendo uma das alternativas mais exploradas para obter inseticidas mais seguros, uma vez que alguns deles apresentam propriedades tóxicas e repelentes contra pragas de insetos (LÓPEZ; PASCUAL, 2010). Entre os produtos naturais com atividade insecticida estão alguns dos monoterpenoides, que apresentaram propriedades anticolinesterásicas, pois apresentam efeitos semelhantes aos apresentados por inibidores de AChE do tipo órgão-fosfórico ou carbamato, sem ser tão tóxico

(HOUGHTON et al., 2006). Estes terpenos demonstraram ser ativos contra insetos da ordem Coleoptera (LÓPEZ, PASCUAL, 2010) e Diptera (DOU et al., 2013)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudos da atividade larvívica da nanoemulsão do óleo essencial de *P. fragrantissimum* sobre *A. aegypti*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e realizar a caracterização química do óleo essencial de *P. fragrantissimum*;
- Obter e caracterizar a nanoemulsão do óleo essencial de *P. fragrantissimum*;
- Avaliar a atividade larvívica das diferentes concentrações das nanoemulsões de *P. fragrantissimum* sobre *A. aegypti*;
- Estimar as concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀ da nanoemulsão do óleo essencial de *P. fragrantissimum* sobre *A. aegypti*;
- Determinar a ação inibitória do óleo essencial *P. fragrantissimum* frente a enzima da acetilcolinesterasa

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal (raízes adventícias) de *P. fragrantissimum* (Figura 8) foi coletado em outubro (período menos chuvoso) de 2016 em uma área de mata de galeria ambiente de ocorrência natural da espécie (Figura 9), na localidade de São José do Mata Fome, município de Macapá, Amapá, as coordenadas geográficas são: N 0°12' 49.44" W 50° 58' 26.15". Foi amostrado material fértil para fins de identificação taxonômica, que foi realizada por um botânico, no Herbário Amapaense (HAMAB) do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA), encontra-se depositada uma exsicata da espécie em estudo, sob o número 10734 (Figura 10). O material vegetal foi armazenado a 4°C para seu posterior uso.

Figura 8 - Coleta das raízes adventícias de *P. fragrantissimum*..



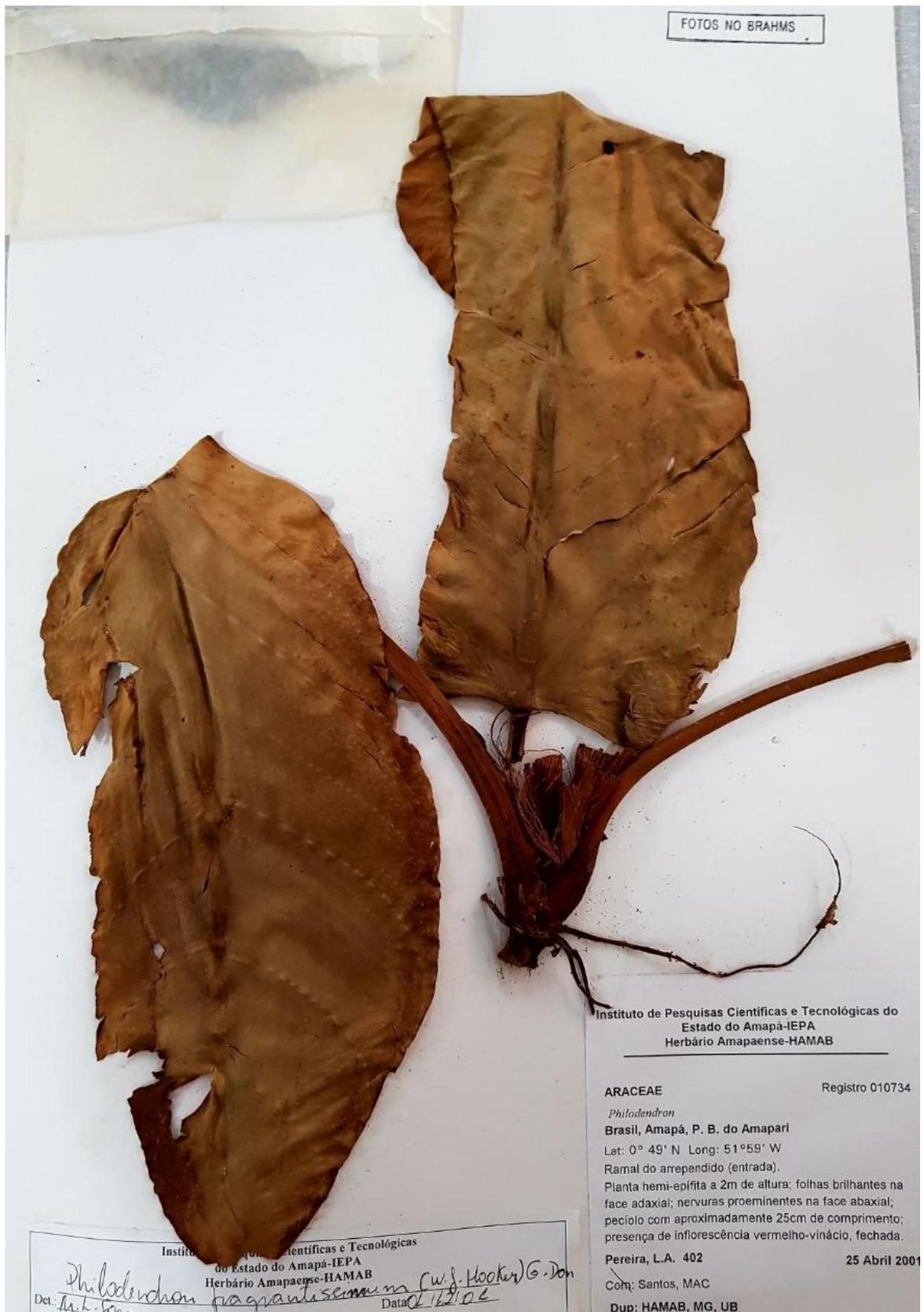
Fonte: Autor

Figura 9 – Lugar de coleta da raiz adventícia de *P. fragratissimum*



Fonte: Autor

Figura 10 – Exsicata de *P. fragrantissimum* depositada no HAMAB



Fonte: Autor

4.2 EXTRAÇÃO DO OLEO ESSENCIAL

A extração do óleo essencial foi feita no Laboratório Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica-NANOFITO da UNIFAP, utilizando-se uma amostra de 3587,55 g da raiz adventícia fresca de *P. fragrantissimum*, dividida em seis extrações. Para o processo de extração de óleo se utilizou a técnica de hidrodestilação. Primeiramente, as raízes foram cortadas e turbolizadas com água destilada. Depois o material vegetal foi colocado num balão de fundo redondo de 5 L e submetido a hidrodestilação durante 3 horas em um aparelho de tipo Clevenger. O óleo foi filtrado com sulfato de sódio (Na_2SO_4). No final, o óleo foi recolhido e armazenado a 4 ° C para posterior análise. Também se realizou a coleta de hidrolato e decocto para avaliação da atividade larvicida (Fernandes et al., 2013).

4.3 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

A caracterização do óleo essencial da raiz *P. fragrantissimum* foi realizada no laboratório de Pesquisa em Fármacos e no laboratório Biocatálise e Biotransformação da UNIFAP, onde se realizou a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) utilizando: Cromatógrafo gasoso Shimadzu system/GC 2010 equipado com um espectrômetro de massa (Shimadzu MS2010 Plus). Temperatura do injetor, 250°C; temperatura do detector (MS), 250°C; gás de arraste, Hélio; taxa de fluxo, 1 mL/min e taxa de injeção 1:20. A temperatura inicial foi de 60°C a uma taxa aquecimento de 3°C/min até 290°C. Um microlitro da amostra foi dissolvida em clorofórmio (1:100 mg/ μL) injetado no equipamento que contem uma coluna DB-5MS (Agilent Advanced J & W; 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm). As condições do espectrofotômetro de massas (EM) foram: ionização por impacto de eletrons (70 eV), taxa de scan (1 scan/s). O tempo total de análise foi de 76,67 minutos. Os índices de retenção (IR) foram calculados através da interpolação aos tempos de retenção de uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos (C9-C30) sobre condições idêntica. A identificação das substâncias foi realizada comparando os índices de retenção e espectros de massa, com dados da biblioteca do equipamento e os relatados na literatura (ADAMS, 2007). O padrão de fragmentação de EM dos compostos foi também comparado com bibliotecas de espectro de massa NIST (National Institute of Standards and Technology).

4.4 MÉTODO DE NANOEMULSIFICAÇÃO

As nanoemulsões foram preparadas por um método de baixo aporte de energia. A massa final foi de 4 g e os sistemas eram compostos por de 2,5% (p/p) de óleo essencial de *P. fragrantissimum*; 2,5% (p/p) de tensoativo (s) e 95%(p/p) de água. Para isso, o óleo essencial e os tensoativos foram reunidos e submetidos a agitação intensa (800 rpm) no Vortex (mod AP59 – Phoenix) durante 2 minutos. Após, adicionou-se o volume de água destilada gota a gota sob agitação e, depois disso, agitou-se por mais 2 minutos (Ostertag et al., 2012).

A fase oleosa foi constituída pelo óleo essencial em diferentes pares de tensoativos:

- Monooleato De Sorbitán (Span® 80) / Polisorbato (Tween® 80)
- Trioleato de sorbitano/ Tween® 80,
- Polisorbato (Tween® 20) /Span® 80
- Trioleato de sorbitano/Tween® 20

Para o cálculo do EHL dos pares de tensoativos, aplicou-se a seguinte equação:

$$\text{EHL} = \frac{(\text{EHL tensoativo A} \times m_A) + (\text{EHL Tensoativo B} \times m_B)}{(m_A + m_B)}$$

Onde,

EHL- Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo

mA = massa em gramas do tensoativo A

mB = massa em gramas do tensoativo B

Com os diferentes pares de tensoativos, foram preparados sistemas com valores de EHL: 10, 11; 12; 13; 14, 15, 16 e 16,7. Durante 3 dias, as nanoemulsões preparadas em repouso e sob temperatura ambiente. Após esse período foi feita a análise macroscópica das formulações, avaliando parâmetros como aspecto, presença de cremagem, viscosidade e cor. Após essa análise foi escolhida as melhores formulações, elas foram refeitas e depois caracterizadas.

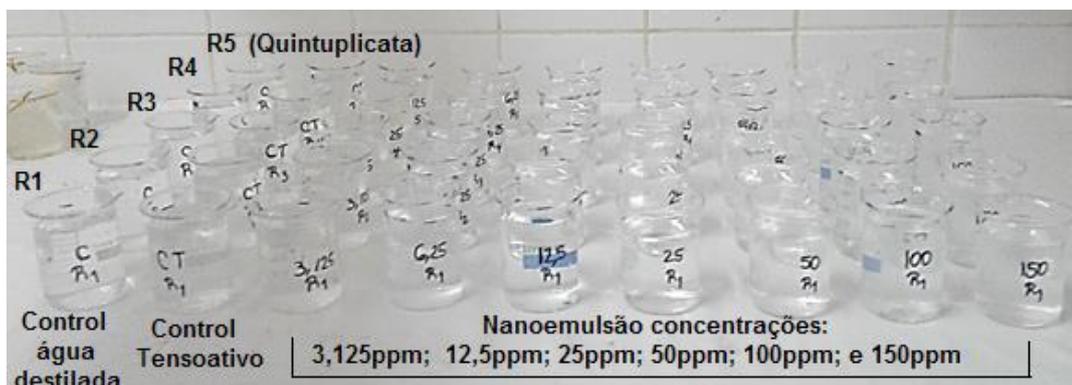
4.5. CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO

O tamanho de gotícula e índice de polidispersão das nanoemulsões foram determinados utilizando o analisador de partículas Zetasizer ZS (Malvern, UK). Cada amostra foi diluída com água destilada (1:20) para análise. As medidas foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como o diâmetro médio \pm desvio padrão. Se realizou a análise para o dia 0, dia 7 e dia 30. Esta caracterização foi realizada no laboratório de Pesquisa em Fármacos da UNIFAP (Fernandes et al., 2013).

4.6. ENSAIO LARVICIDA

As larvas de *A. aegypti* da cepa Rockefeller, foram obtidas do Laboratório de Arthropoda da UNIFAP. O ensaio biológico foi realizado sob condições controladas com temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $75\pm 5\%$ e um ciclo claro/escuro de 12 horas. O protocolo experimental foi de acordo com a OMS (2005) com pequenas modificações. Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata com 10 larvas de quarto estágio jovem em cada repetição, usando a nanoemulsão de raiz de *P. fragrantissimum* diluída a 3,125ppm; 12,5ppm; 25ppm; 50ppm; 100ppm; e 150ppm (Figura 11). Controle negativo foi feito com água destilada e tensoativo a 250ppm. As leituras da mortalidade foram verificadas nos períodos de 24hs e 48hs após a exposição das larvas às soluções. A mortandade foi observada devido a ausência total de movimentos.

Figura 11 – Ensaio larvicida de nanoemulsão de *P fragrantsiimum* frente as larvas de *A. aegypti*.



Fonte: Autor

4.7. ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

Para este ensaio, as seguintes soluções foram preparadas:

Preparação do tampão fosfato: 0,1M, pH 7,5 Fosfato monossódico monohidratado (13,799g; Merck) foi dissolvido em 950 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 7,5 com hidróxido de sódio (NaOH; Vetec) 5M e avolumado para 1L. A solução foi armazenada em geladeira (6-8°C)

Preparação da solução de 5,5'-Ditiobis (2-Ácido nitrobenzóico) (DTNB): foram pesados 134,75mg de ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB; Sigma) e 1,7g de Triton X-100 (Vetec). Os mesmos foram dissolvidos em tampão fosfato 0,1M, pH 7,5 e avolumados para 500 mL, resultado em solução de DTNB 0,68mM. A solução foi armazenada em geladeira (6-8°C).

A enzima acetilcolinesterase foi obtida no Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica- NANOFITO da UNIFAP. Os animais utilizados foram indivíduos adultos de *A. aegypti* coletados no insetário do laboratório de Arthropoda da Unifap. Os mosquitos (5 g) foram suspensos em água destilada (2 mL) e submetidos à homogeneização em aparelho de alta pressão (Ultra Turrax) por 2 minutos a 12.000 rpm. A suspensão resultante foi filtrada e a solução obtida foi liofilizada e armazenada sob -18 °C até o momento de uso.

Usaram-se mosquitos adultos simplesmente para se ter maior biomassa e, portanto, maior quantidade de enzima extraída. Na obtenção da enzima de acetilcolinesterase, não se isola a enzima, se obtém outras substâncias, inclusive outras enzimas. O que se obtém é um homogenato que contém a acetilcolinesterase. Porém, os outros componentes da mistura não influenciam no ensaio, porque se mide a capacidade do homogenato de hidrolisar o substrato da acetilcolinesterase.

A atividade anti-colinesterase foi realizada de acordo com o método descrito por Ellman e colaboradores (1961). As amostras foram solubilizadas em metanol e 340 µl destas soluções foram adicionados a 1660 µl de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5, 1000 de DTNB e 200 µl da solução enzimática (extraída de mosquitos adultos) (30 mU, diluída em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5) e incubadas por 15 minutos. Posteriormente adicionou-se 200 µl de solução de iodeto de acetilcolina ATCI 17 mM em água e fez-se as leituras em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1601) em 412 nm com cubeta de 1 cm, utilizando-se metanol como branco. As concentrações das

amostras em termos de óleo essencial foram: 500, 350, 250, 100 e 50 µg/mL Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.8. ANÁLISES DE DADOS

Para se estimar os valores de CL_{50} e CL_{90} da atividade larvicida da nanoemulsão do óleo essencial de *P. fragrantissimum* frente as larvas de *A. aegypti*, foi utilizada a análise Probit levando-se em consideração os tempos 24 e 48 horas através do software Stat Graphic Centurium XXV.1 (Stat Ease Co. MA. USA).

Para verificar se houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a mortalidade obtida nos diferentes tratamentos adotados foi utilizado o teste da análise de variância (ANOVA) unidirecional ou bidirecional seguida do teste de Tukey ou do teste de Bonferroni por meio do Software GraphPad Prism 6.02 (GraphPad Software Inc, San Diego, Califórnia EUA).

A concentração do óleo capaz de inibir a atividade enzimática em 50% (CI_{50}) foi estimada por regressão linear. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$, utilizando o Software GraphPad Prism 6.02 (GraphPad Software Inc, San Diego, Califórnia EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS RAÍZES FRESCAS

A quantidade total extraída de óleo essencial de raiz adventícia fresca de *P. fragrantissimum* foi 3,33 g com um rendimento de 0,09178% foram calculados sobre a massa do material fresco. O resultado foi satisfatório já que em um estudo que avaliou o rendimento médio de amostras de óleo essencial de plantas do gênero *Philodendron* spp foi obtido um menor rendimento com uma média de 0,046% cipó fresco e 0,030% de cipó seco (BACCHUS et al., 2015).

O óleo essencial de *P. fragrantissimum* tem uma coloração amarela (Figura 12). Por outra parte, a Quantidade de hidrolato obtida foi 104,850g e a quantidade de decocto: 4000ml.

Figura 12 – Óleo essencial de *P. fragrantissimum*



Fonte: Autor

5.2. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

O resultado da análise qualitativa e quantitativa do óleo permitiu identificar 27 constituintes no óleo essencial de *P. fragrantissimum* extraído de raízes na forma fresca. Os compostos majoritários foram β -Bisaboleno (40,44%), α -Pinoeno (23,69%), β -Pinoeno (7,20%), α -Bisaboleno (6,59%), β -Farneseno (5,29%) (Tabela 4 e Figura 13; 14). Courtois e colaboradores (2009) estabeleceram que os sesquiterpenos são mais

diversos e mais abundantes do que os monoterpenos em as espécies de *P. fragrantissimum* e *P. melinonii*, como em muitas outras espécies tropicais.

Tabela 4 - Constituintes químicos, tempo de retenção (TR), índice de retenção calculado (IR) e percentagem da composição (%) do óleo essencial de *Philodendrum deflexum* extraídos de raízes adventícias frescas

Pico	TR (min)	Composto	(%) GC-MS	IR exp.*	IR lit.**
1	5.057	α-Pineno	23.69	935	939
2	6.044	Sabineno	0.32	975	976
3	6.151	β-Pineno	7.20	979	980
4	6.482	β -Myrceno	0.93	993	991
5	7.660	Limoneno	1.02	1030	1031
6	8.666	γ -Terpineno	0.19	1060	1062
7	13.188	1-Terpinen-4-ol	0.30	1179	1177
8	13.736	α -Terpineol	0.57	1193	1189
9	18.348	Undecan-2-ol	0.39	1303	1372
10	21.071	Cyclosativeno	0.33	1369	1368
11	21.432	α -Copaeno	0.19	1377	1376
12	22.409	Cypereno	1.06	1401	1398
13	23.895	α -Trans-Bergamoteno	1.08	1438	1436
14	24.196	β -Sesquiphellandreno	0.66	1445	1524
15	24.760	β-Farneseno	5.29	1459	1458
16	25.453	α -Gurjuneno	0.20	1476	1409
17	25.663	γ -Curcumeno	0.28	1481	1480
18	25.872	N.I.	1.21	1487	-
19	26.355	Tridecan-2-one	4.54	1499	1496
20	26.620	α-Bisaboleno	6.59	1514	1504
21	26.887	β-Bisaboleno	40.44	1520	1509
22	26.976	2-epi- α -Funebreno	0.39	1522	1382
23	27.422	β -Funebreno	0.66	1533	1414
24	31.466	N.I.	0.25	1633	-
25	32.948	Epi- α -Bisabolol	0.26	1673	1686
26	33.005	β -Bisabolol	0.20	1675	1671
27	33.970	N.I.	1.79	1701	-

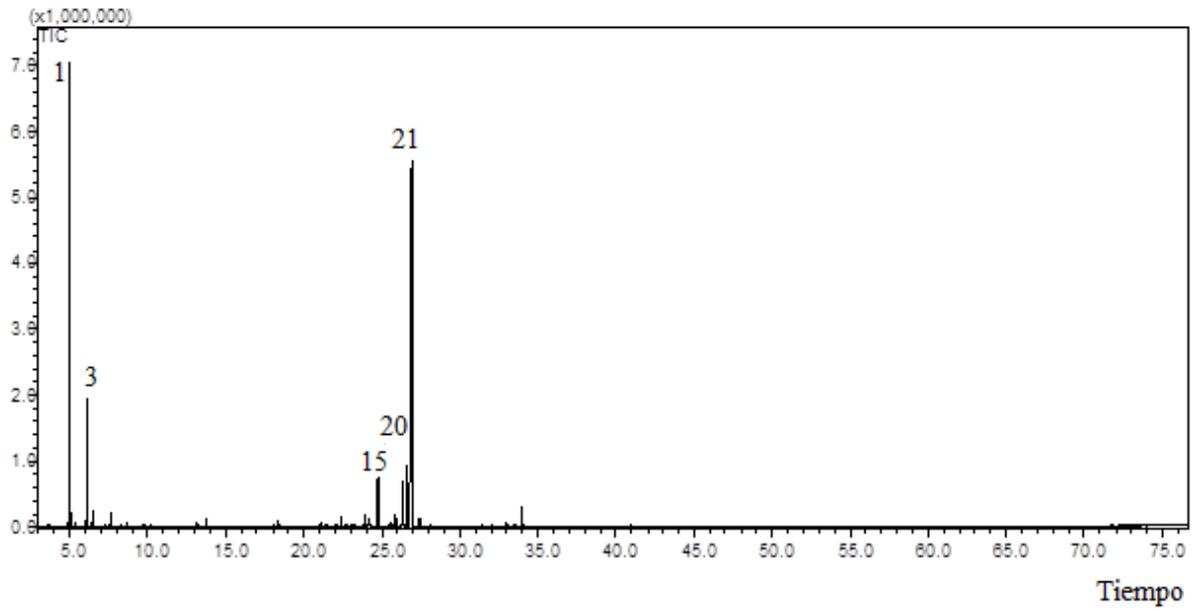
N.I: Constituinte não identificado

*IRexp: IR calculado

**IRlit: IR tabelado para o composto (Adams, 2007)

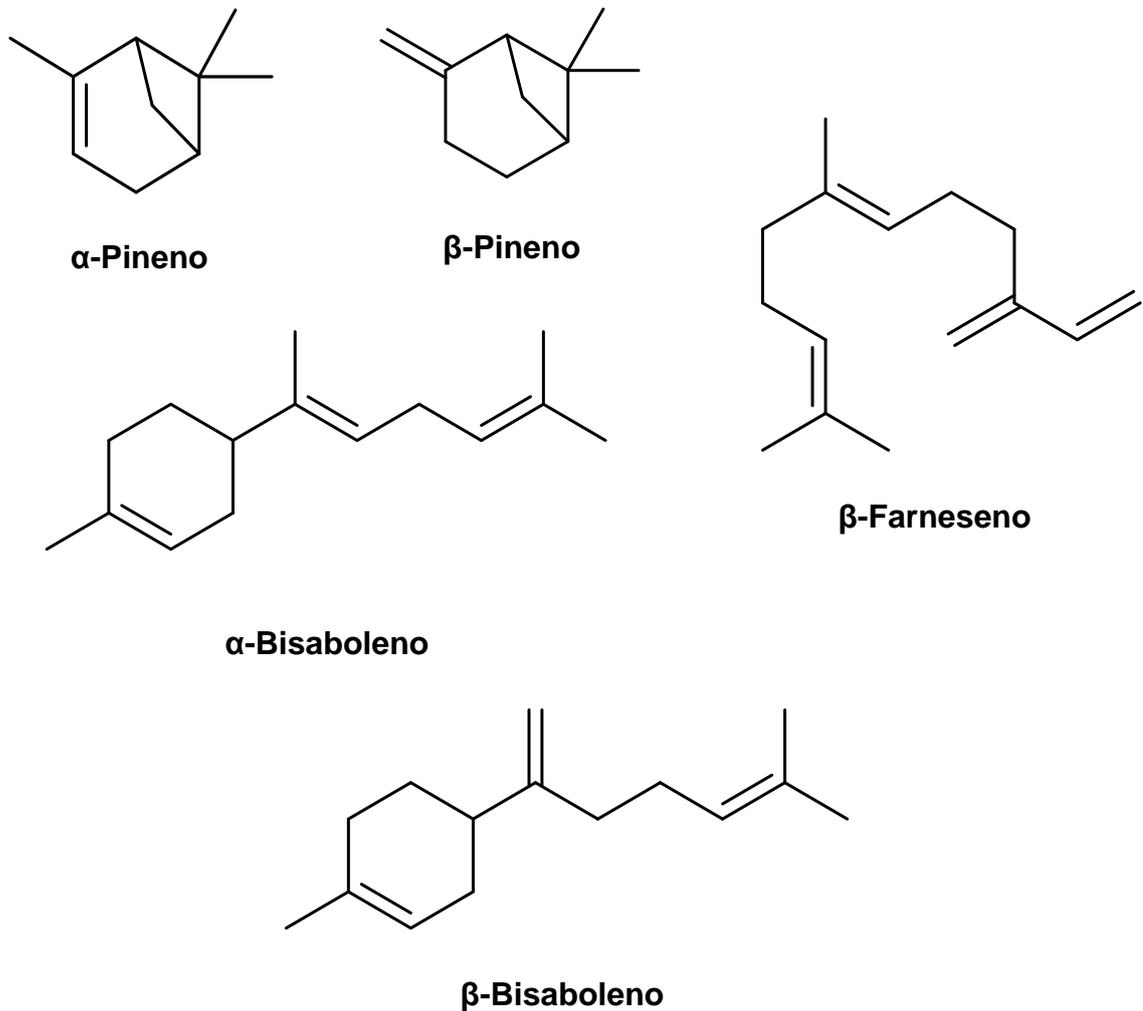
Fonte: Dados do estudo.

Figura 13 - Cromatograma de gás do óleo essencial *P. fragrantissimum*. Componentes majoritários: 1, α -pineno; 3, β -pineno; 15, β -Farneseno; 20, α -Bisaboleno; 21, β -Bisaboleno.



Fonte: Dados do estudo.

Figura 14 – Estruturas químicas dos compostos majoritarios identificados do óleo essencial de *P. fragrantissimum*.



Fonte: Dados do estudo.

Castellar et al., (2013) relatou 35 compostos para o óleo de raiz *P. fragrantissimum*, 8 destes presentes neste estudo, mas com diferentes concentrações (Tabela 5). Além disso, apresentaram diferentes compostos majoritários, com exceção do α -pineno e β -pineno que estão em concentrações mais baixas, β -caryophylleno (29.9%), limoneno (15.8%), β -selineno (11.5%), α -selineno (15.7%), α -pineno (3.4%), α -copaeno (3.2%), β -pineno (2.5%) and δ -cadineno (2.9%). E possível que esta diferença na concentração dos constituintes químicos seja devido ao período e local de coleta.

Tabela 5 -Comparação de constituintes químicos no estudo realizado por Castellar et al., (2013) e o presente estudo.

Constituintes químicos	(%)GC-MS Castellar et al., (2013)	(%) GC-MS Em este estudo
1 α -Pineno	3,4%	23,69%
2 Sabineno	0,4%	0,32%
3 β -Pineno	2,5%	7,20%
4 Myrceno	0,7%	0,93%
5 Limoneno	15,8%	1,02%
6 γ -Terpineno	0,1%	0,19%
7 α -Copaeno	3,2%	0,19%
8 Epi- α -Bisabolol	0,1%	0,26%

Em um estudo realizado por Joffard et al, (2017) evidenciou que as folhas de *P. fragrantissimum* continham β -bisaboleno assim como α - e β -selineno, que em conjunto representavam aproximadamente 65% da composição do óleo. Além destes foram também encontrados terpenos oxigenados, tais como α - e β -bisabol. Nas raízes foram identificados α - e β -selineno, que representavam, em média, 27,4% e 29,8% da composição do óleo.

O composto β -Bisabolene foi percebida em alta quantidade em outras espécies do gênero *Philodendron* como: *P. de defelxum* que tem um 44,3% (ALLIANCE et al., 2017); *P. bipinnatifidum* 65.3%, (DE ANDRADE et al., 2014) e *P. acutatum* um 49,5%, (VIANA et al., 2002) e em baixa quantidade em *P. solimoesense* com um 11,64% (SILVA et al., 2016) e *Philodendron scabrum* β -bisaboleno 10,01% (OTTOBELLI et al., 2011).

De acordo com Simões e Spitzer (2004) as variações ambientais, na composição do solo, órgão vegetal, fase do seu desenvolvimento, entre outras, podem afetar a composição e a qualidade dos óleos de uma mesma espécie. Isso demonstra a importância de se avaliar o óleo de uma espécie, mesmo que ele já tenha sido anteriormente estudado. No caso de trabalho realizado por Castellar et al., (2013) *P. fragrantissimum* foi coletado em agosto de 2010, em o estado de Pará, Brasil. No presente estudo, o material vegetal foi coletado no Amapá, no mês de outubro, período menos chuvoso. Ambos Estados se encontram no norte de Brasil sendo muito pertos, mesmo assim a composição de óleo apresento diferencias significativas. Segundo Reis et al., (2006) geralmente as espécies apresentam épocas específicas em que contêm maior quantidade de princípio ativo no seu tecido,

podendo esta variação ocorrer tanto no período de um dia como em épocas do ano. Também Simões e Spitzer (2004) falam que o período de exposição ao sol pode provocar uma perda quantitativa importante do óleo existente no vegetal.

5.3. NANOEMULSIFICAÇÃO

No desenvolvimento de nanoemulsões foram preparadas diversas formulações com diferentes pares de tensoativos nos valores de EHL de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 16, 7 (Tabela 6 e figura 15 até 19). Na determinação do EHL requerido para o óleo essencial de *P. fragrantissimum*, encontrou-se que o melhor valor foi 15,0 com mistura de Span 80 e Tween 20 (Figura 20). Essa formulação apresentou boa aparência, aspecto translúcido e reflexo azulada, que estão de acordo com o conceito de nanoemulsões (SOLANS; SOLÉ, 2012). De acordo com Holmberg et al. (2002), a desestabilização de uma emulsão pode ocorrer por diversos mecanismos, tais como: sedimentação, cremagem, floculação e coalescência, por tanto as demais nanoemulsões apresentaram sinais de instabilidade como cremagem e separação de fases 24 horas após preparação.

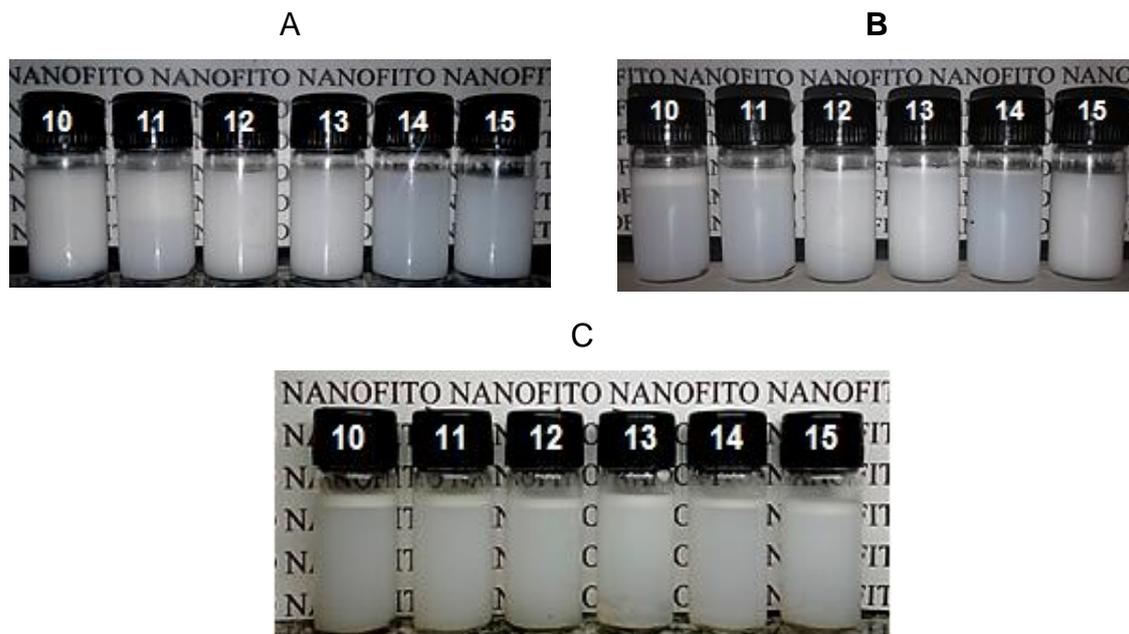
Tabela 6 - Análise macroscópica das nanoemulsões após dos 3 dias (72 horas)

TENSOATIVOS	EHL	DESCRIÇÃO
Span 80 e Tween 80	10	Separação de fases, presença cremagem
	11	Separação de fases, presença cremagem
	12	Aspecto leitoso, presença de cremagem
	13	Aspecto leitoso, presença de cremagem
	14	Aspecto azulado com fina cremagem, quase imperceptível
Tween 80	15	Aspecto leitoso, presença de cremagem
Triolato de sorbitano e Tween 80	14	Aspecto leitoso, presença de cremagem
Tween 80	15	Aspecto leitoso, presença de cremagem
Tween 20 e Span 80	14	Aspecto leitoso, presença de cremagem
	15	Aspecto azulado, sem cremagem
	16	Aspecto azulado, com cremagem
Tween 20	16,7	Aspecto leitoso, presença de cremagem
Triolato de sorbitano e Tween 20	14	Separação de fases, presença cremagem
	15	Separação de fases, presença cremagem
	16	Separação de fases, presença cremagem

Fonte: Dados do estudo.

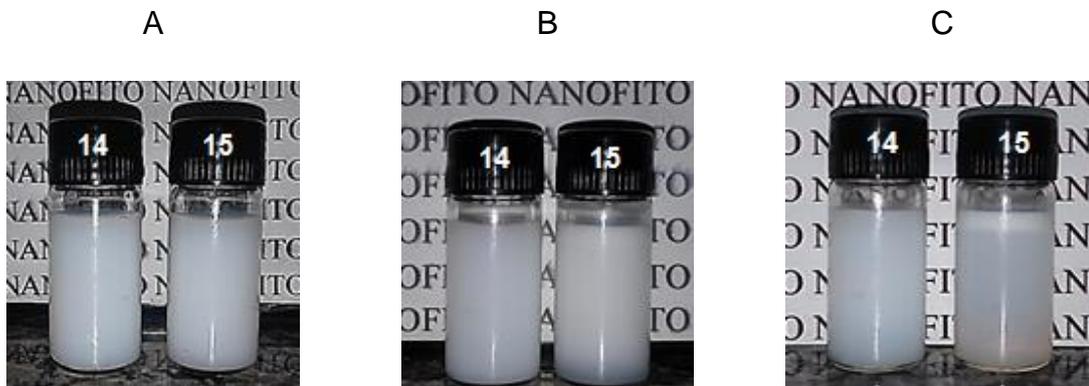
Figura 15 - Nanoemulsões usando tensoativos Span 80 e Tween 80 (EHL de 10 até 15)

A) Dia 1; B) Dia 3; C) Dia 30.



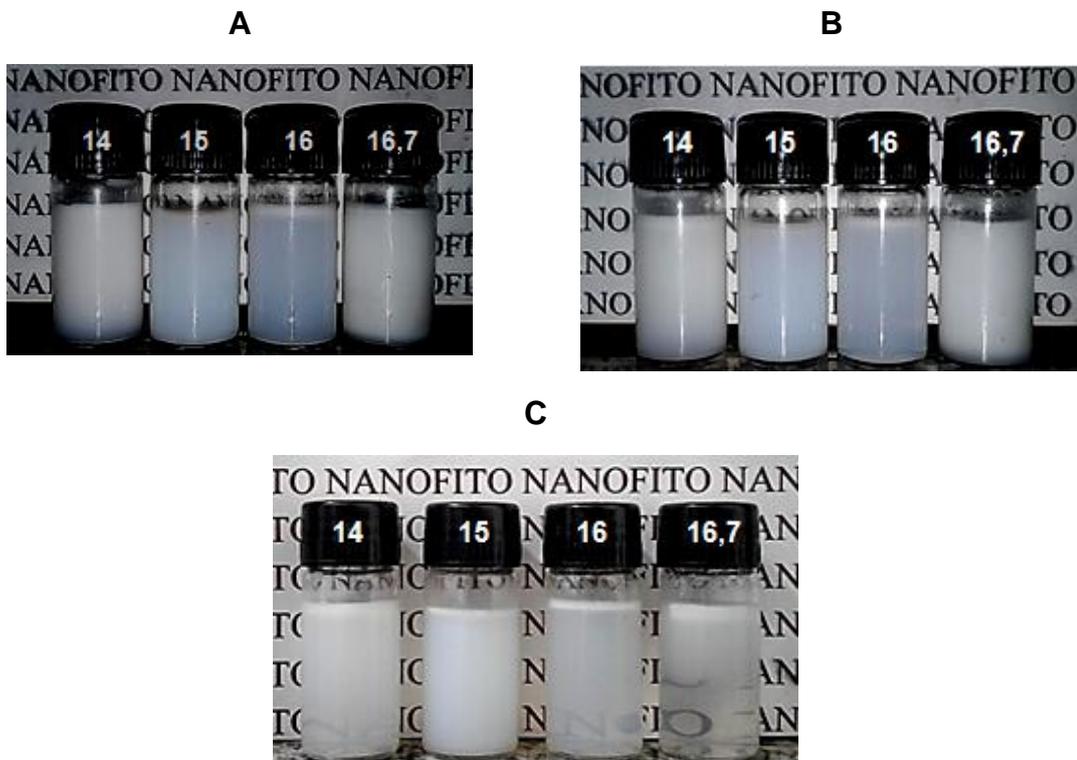
Fonte: Autor

Figura 16 - Nanoemulsões usando Triolato de sorbitano e Tween 80. (EHL de 14 e 15)
A) Dia 1; B) Dia 3; C) Dia 30



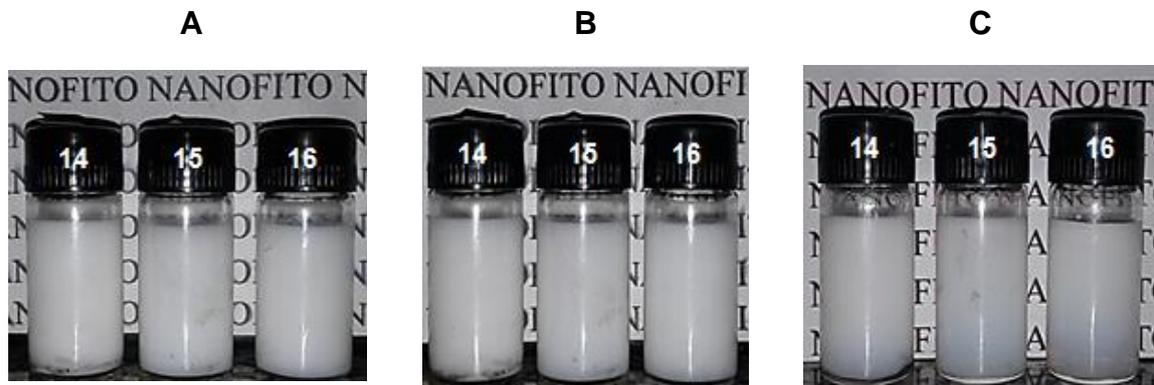
Fonte: Autor

Figura 17 - Nanoemulsões usando Tween 20 e Span 80 (EHL de 14 até 16,7)
A) Dia 1; B) Dia 3; C) Dia 30



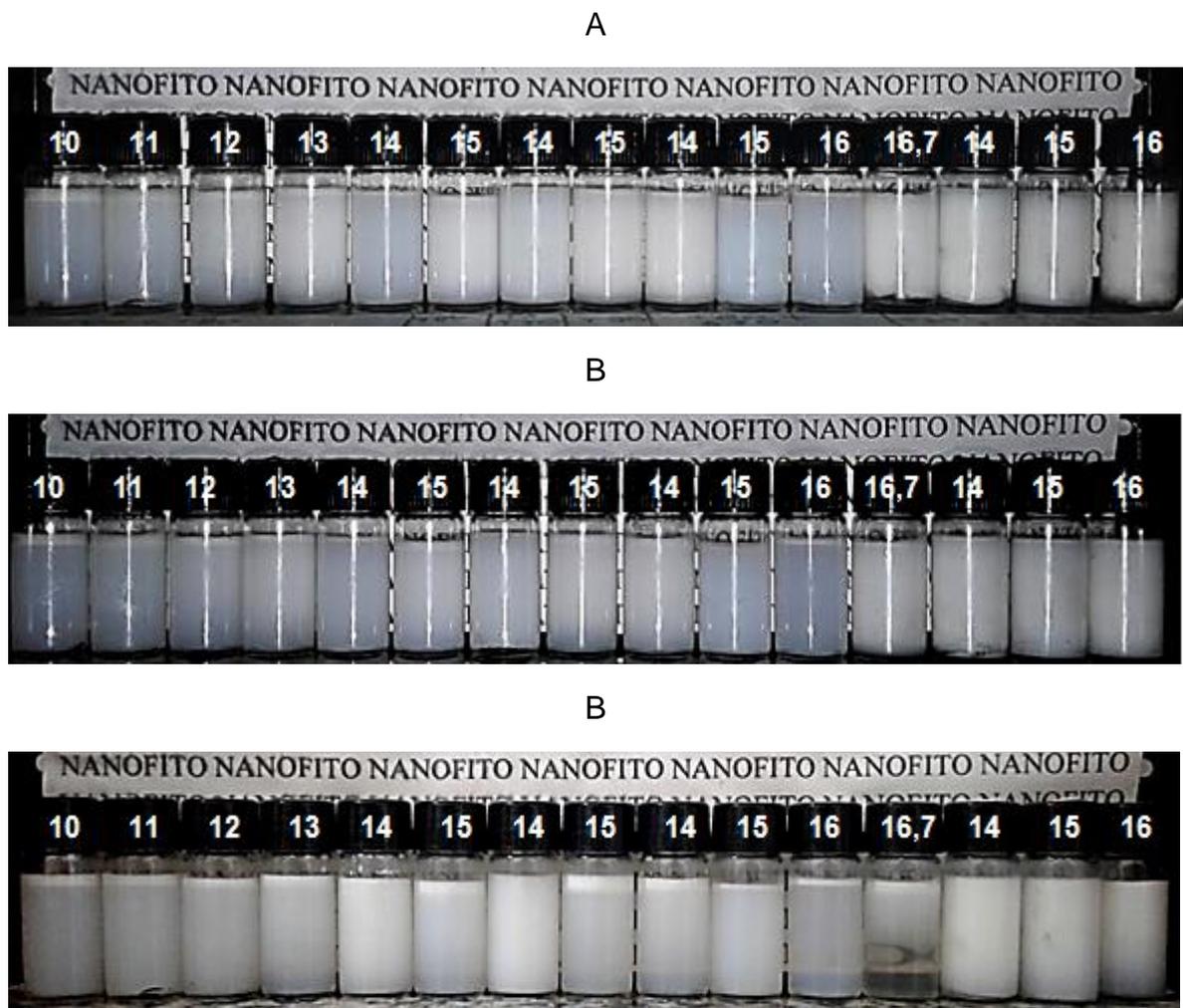
Fonte: Autor

Figura 18 - Nanoemulsões usando Triolato de sorbitano e Tween 20 (EHL 14, 15 e 16)
A) Dia 1; B) Dia 3; C) Dia 30



Fonte: Autor

Figura 19 - Nanoemulsões usando diferentes tensoativos. A) Dia 1; B) Dia 3; C) Dia 30



Fonte: Autor

Figura 20 - Melhor nanoemulsão (óleo em água), mistura de Span 80 e Tween 20 (EHL: 15) apresenta aspecto azulado e sem cremagem.



Fonte: Autor

5.4. CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO

A dispersão de pequenas gotas, em nanoescala, é denominada de nanoemulsão. O comprimento convencional para esta escala está entre 1 e 100 nm (Chiesa et al., 2008), ou pode variar entre 20 nm e 200 nm (Ee et al., 2008). A nanoemulsão de a raiz de *P. fragrantissimum* feita com tween 20 e spam 80 e de EHL 15, amostraram um tamanho bom das gotículas ficou compreendido entre uma média de 87,51 nm para o primeiro dia e uma média de 69.53 nm para o dia trinta, reduzindo consideravelmente conforme o tempo, mas em geral se comporta com uma escala menor a 100nm (Tabela 6).

Não obstante, do ponto de vista cinético, as nanoemulsões são particularmente propensas a um crescimento no tamanho das partículas ao longo do tempo, decorrente da coalescência das gotículas de óleo dispersas, fenômeno este conhecido como a maturação de Ostwald (WOOSTER; GOLDING; SANGUANSRI, 2008). Por tanto, a avaliação da estabilidade em função do tempo é importante para indicar em qual momento este fenômeno ocorre. À medida que as nanoemulsões

tornam-se instáveis (do ponto de vista termodinâmico) algumas propriedades, tais como o Índice de Polidispersão, podem sofrer variações em função da temperatura ou outros elementos termodinâmicos.

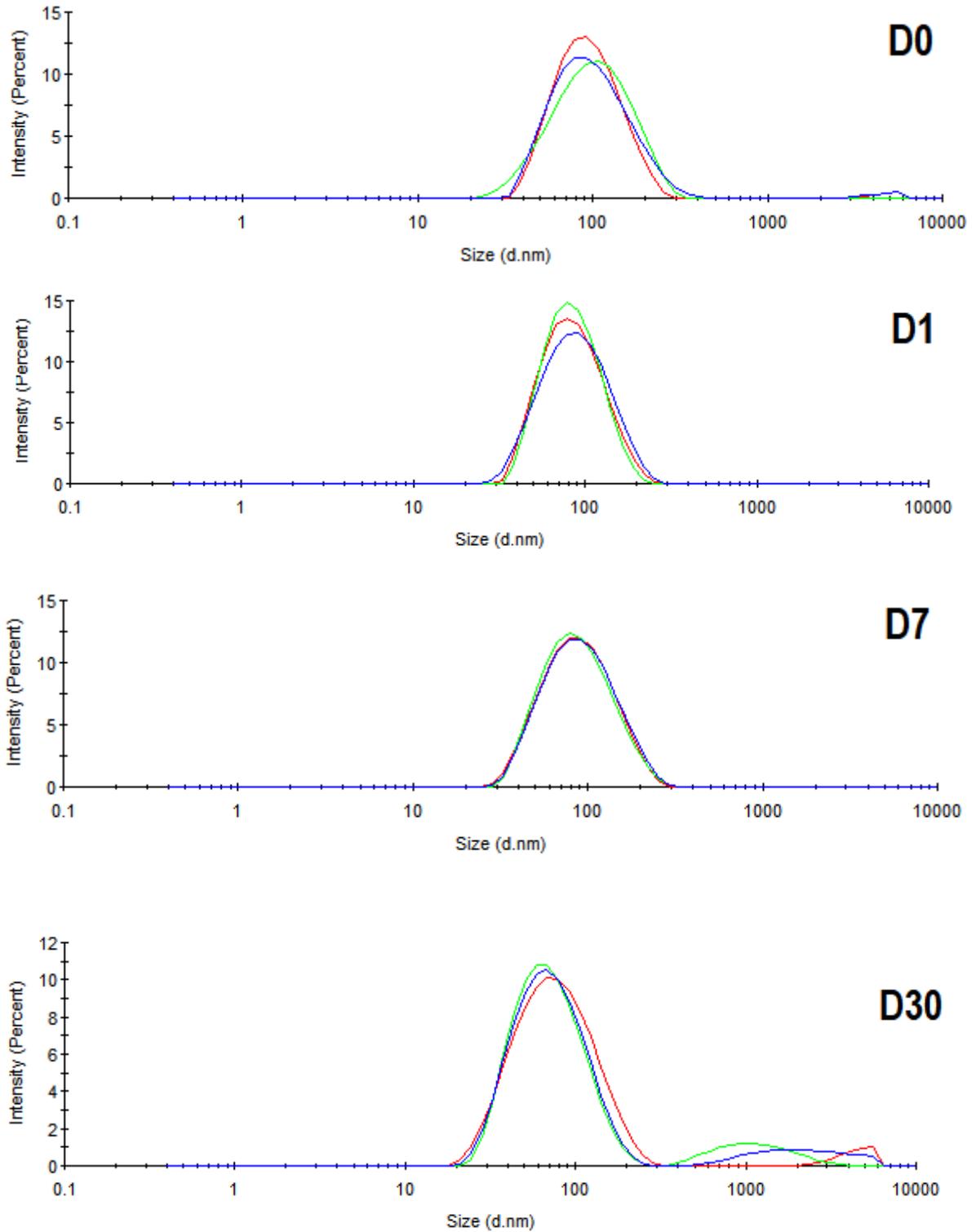
As partículas da nanoemulsão estão em constante movimento e a dispersão da luz aparece flutuante, o equipo zetasizer mede a flutuação da intensidade e com isso o tamanho e a polidispersão das partículas. Para os autores Izquierdo et al., (2005) os valores de índice de polidispersão próximos a 0,2 indicam uma distribuição monomodal. A nanoemulsão de *P. fragrantissimum* ficou com um índice de polidispersão compreendido com uma média de 0,191 para o primeiro dia, e uma média de 0,282 para o dia trinta, aumentando consideravelmente conforme o tempo (Tabela 7). Desta forma se pode dizer que a uniformidade de distribuição no que se encontram as moléculas foi diminuindo, ou seja, aumento o número de partículas de diferente tamanho no médio, o qual pode ocasionar uma instabilidade na nanoemulsão, mas sim embargo depois de 30 dias não tem um valor maior a 0,3 sendo ainda baixo. Além disso, observamos alta homogeneidade de tamanho de partícula e distribuição quase monomodal mesmo após 7 dias de armazenamento. (Tabela 7 e Figura 21).

Tabela 7 - Tamanho gotícula e Índice de polidispersão da nanoemulsão do óleo de *P. fragrantissimum* feita com tween 20 e spam 80 e EHL: 15. Após Dia 0; 1; 7 e 30 (D0, D1, D7, D30)

	Tamanho gotícula (nm)	Índice de polidispersão
D0	86.73	0.188
	87.15	0.186
	88.65	0.198
Média±DP	87.51±1.009	0.191±0.006
D1	77.69	0.138
	78.1	0.123
	79.16	0.153
Média±DP	78.32±0.7586	0.138±0.015
D7	78.89	0.155
	78.99	0.173
	81.08	0.172
Média±DP	79.65±1.237	0.167±0.010
D30	70.1	0.252
	69.05	0.29
	69.45	0.303
Média±DP	69.53±0.5299	0.282±0.027

Fonte: Dados do estudo, a partir do analisador de partículas Zetasizer ZS

Figura 21 - Distribuição do tamanho de partícula da nanoemulsão da nanoemulsão do óleo de *P. fragrantissimum* feita com tween 20 e spam 80 e EHL: 15. Após Dia 0; 1; 7 e 30 (D0; D1; D7; D30).



Fonte: Dados do estudo.

5.5. ATIVIDADE LARVICIDA DA NANOEMULSÃO DE *P. fragrantissimum*

A Tabela 8 mostra a percentagem da mortalidade e desvio padrão das diferentes concentrações da nanoemulsão do óleo de *P. fragrantissimum*. A nanoformulação de 150 ppm mostrou 100% de mortalidade e as concentrações de 50, 100 resultaram em mortalidade acima de 50% em 24 horas exposição. A taxa de mortalidade aumentou pouco em função do tempo de exposição de as 24 horas as 48 horas, sendo que somente a de 25 ppm variou em 48 horas. Não houve mortalidade nos grupos controle indicando que este efeito larvicida é atribuído à compostos presente no óleo essencial contido na nanoformulação testada. As concentrações baixas de 3,125 ppm e 12,5 ppm não produziu mortalidade. Por outra parte, o teste com hidrolato e decocto não mostraram atividade larvicida. Por tanto, pode se dizer que é possível que os compostos ativos se encontram no óleo essencial.

Tabela 8 - Percentual de mortalidade (média \pm desvio padrão) de larvas de *A. aegypti* produzida por diferentes concentrações da nanoemulsão de *P. fragrantissimum*, em diferentes períodos (24 e 48 h).

Tempo de exposição (h)	Controle Água destilada	Controle Tensoativo	Concentrações testadas					
			3,125p pm	12,5p pm	25ppm	50ppm	100ppm	150ppm
24	0	0	0	0	12 \pm 4,47	56 \pm 26,08	92 \pm 8,37	100 \pm 0,0
						****	****	****
48	0	0	0	0	14 \pm 5,48	64 \pm 23,02	92 \pm 8,37	100 \pm 0,0
						****	****	****

****: $p < 0,0001$ comparado com o controle de água destilada.

Fonte: Dados do estudo.

O teste de Tukey apresentou que a partir da concentração de 50 ppm, tanto com tempo de exposição de 24 e 48 horas, a mortalidade foi significativamente diferente. A CL₅₀ após 24 horas foi estimada em 55.07 ppm e após 48 horas 52.29 ppm. A CL₉₀ após 24 horas foi estimada 86.70ppm e após 48 horas 83.7059 ppm (Tabela 9). A organização Mundial da Saúde ainda não estabeleceu um critério padrão para a determinação da atividade larvicida de produtos naturais, entretanto, Dias e Moraes (2014) utilizaram uma classificação estabelecida por Cheng et al., (2003) em

que os compostos com $CL_{50} > 100$ mg / L são considerados não ativos, com $CL_{50} < 100$ mg / L considerados ativos, e aqueles com $LC_{50} < 50$ mg / L altamente ativos.

Tabela 9 - Estimativas das concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}) e seus respectivos intervalos de confiança, das concentrações do óleo essencial de *P. fragrantissimum* em diferentes períodos.

Tempo de exposição (h)	CL50 ppm	CL 90 ppm
24	55.07 (42.44 - 75.36)	86.70 (68.73 - 129.87)
48	52.29 (40.00 - 72.59)	83.71 (65.85 - 127.96)

Fonte: Dados do estudo.

Nos estudos realizados por Viana et al. (1999) e Alliance et al (2017) foram testadas diferentes concentrações do óleo essencial de *P. deflexum* frente a larvas de *A. aegypti*, apresentando potencial larvicida, com concentrações letais $CL_{50} = 85,31$ ppm e $CL_{50} = 78.28$ ppm, respectivamente. Também disso, relatam que entre os compostos majoritários de *P. de defelxum* se encontram: β -Bisaboleno (44,3%), Limoneno (33,42%), Undecanol (18,94%), (-)-Isoledeno (16,34%), α -Copaeno (12,57%), lactato de butilbutirila (11,46%), β -Caryophyleno, (11,34%), m-Cymeno (11,4%), β -Selineno (9,3%). Em relação com o presente estudo se encontra também como composto majoritário β -Bisaboleno (40,44%), dessa forma pode ser possível que este composto tenha alta atividade larvicida, não obstante a nanoemulsão de *P. fragrantissimum* mostra um CL_{50} mais baixo em comparação com o óleo de *P. deflexum*, é possível que esta diferença seja porque as nanoemulsões podem potencializar a atividade larvicida dos compostos.

Alguns estudos demonstraram outras atividades biológicas do gênero *Philodendron*, por exemplo, o óleo essencial de *P. bipinnatifidum* tendo como constituintes majoritários o β -bisaboleno (65,3%) e trans- α -bergamoteno (9,9%) foram ativos quanto a atividade inseticida e de inibição alimentar de *Diabrotica speciosa* (DE ANDRADE et al., 2014). O extrato de *Philodendron scabrum* constituído majoritariamente por oxido de cariofileno (19,42%), α -capoeno (16,08%) e o β -bisaboleno (10,01%), apresentaram atividade antioxidante e citotóxica em *Artemia*

salina (OTTOBELLI et al., 2011). *P. goeldii* tendo como componente majoritário principal o limoneno (42,27%) produziu inibição do crescimento de *Corynebacterium glutamicum* e *C. glutamicum* (SILVA et al., 2016).

5.6 INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

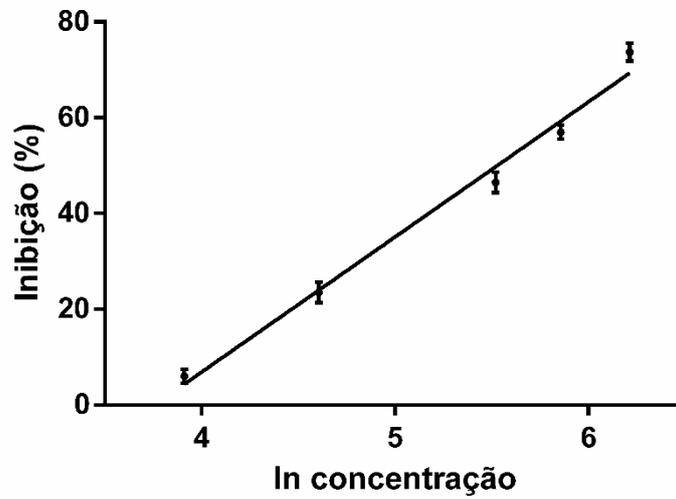
Conforme dados encontrados na literatura, pode-se verificar que grande parte dos extratos de plantas considerados ativos apresentam atividade anticolinesterásica com valores de IC₅₀ acima de 100 µg/mL (MUKHERJEE et al., 2007; SENOL et al., 2010). O óleo essencial de *P. fragrantissimum* apresentou moderada atividade inibitória sobre a enzima acetilcolinesterase com o valor de CI₅₀ = 251,9 µg/mL (210,0 a 311,1) (Tabela 10, Figura 22).

Tabela 10 – Inibição de AChE em cada concentração testada do óleo.

Concentração do óleo	Porcentagem de Inibição de AChE
50	6,00
100	23,50
250	46,50
350	56,98
500	73,69

Fonte: Dados do estudo.

Figura 22- Efeito da concentração do óleo essencial na porcentagem de inibição de AChE. R= 0,981



Fonte: Dados do estudo.

Apesar de a atividade anticolinesterásica dos óleos essenciais serem um importante foco de estudo químicos e farmacêuticos, este parece ser o primeiro relato de tal atividade em uma planta do gênero

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da composição fitoquímica do óleo essencial de *P. fragrantissimum* permitiu identificar 27 constituintes, os compostos majoritários foram β -Bisabolene, α -Pinene, β -Pinene, α -Bisabolene, β -Farnesene, Tridecan-2-one. O óleo essencial de *P. Fragrantissimum* indicou uma distinção na constituição fitoquímica com um estudo realizado por Castellar et al, 2013, tais variações podem ser decorrente dos fatores abióticos, ao tempo y lugar da coleta e isso demonstra a importância de se avaliar o óleo de uma espécie, mesmo que ele já tenha sido anteriormente estudado.

Na determinação do EHL requerido para o óleo essencial de *P. Fragrantissimum*, encontrou-se que o melhor valor foi 15,0 com tensoativos Span 80 e Tween 20. Essa formulação apresentou boa aparência, aspecto translúcido e reflexo azulada. As nanoemulsões são capazes de dispersar-se em meio aquoso, portanto são uma boa alternativa para utilizar óleos essenciais que são menos tóxicos que os produtos sintéticos.

A nanoemulsão de *P. fragrantissimum*, demonstrou potencial uso no controle larvicida do *A. aegypti*, que apresentarem baixos valores de CL50 de 55,07 em 24 horas. Portanto, as larvas da espécie estudada, foram suscetíveis à composição do óleo essencial. Tais resultados poderão ser úteis na promoção de pesquisas para o controle vetorial de mosquitos baseado em compostos ativos oriundos de espécies vegetais como uma alternativa aos larvicidas sintéticos.

Apesar de a atividade anticolinesterásica dos óleos essenciais serem um importante foco de estudo químicos e farmacêuticos, este parece ser o primeiro relato de tal atividade em uma planta do gênero *Philodendron*. Atividade moderada demonstra que esse produto possui baixa propensão a causar eventos tóxicos em organismos não alvo, como humanos ou animais domésticos, por exemplo.

REFERÊNCIAS

- ABED, R.A., et al. Alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pela atividade larvicida do óleo-resina da planta medicinal *Copaifera reticulada* Ducke (Leguminosae). **Revista De Patologia Tropical**, v. 36, p. 75-86, 2007.
- ACOSTA, G. O., PÁTZCUARO, M. Flora del Bajío y de Regiones adyacentes. **Instituto de Ecología, A. C, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad**, v. 24, p. 164-182, 2003.
- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4th. ed. [S.l.]: Allured Pub Corp, 2007.
- ALENCAR, C.H.M., ALBUQUERQUE, L.M., AQUINO, T.M.F., SOARES, C.B., RAMOS JÚNIOR, A.N., LIMA, J.W.O., PONTES, R.J.S. Potencialidades do *Aedes albopictus* como vetor de arboviroses no Brasil: um desafio para a atenção primária. **Revista de Atencao Primaria a Saude**, v.11, n. 4, p. 459-467. 2008.
- ALLIANCE, DIANEL, et al. Chemical Study, Predictions In Silico and Larvicide Activity of the Essential Oil of Root *Philodendron deflexum* Poepp. **Journal of Computational and Theoretical Nanoscience**. v. 14, n. 7, p: 3330-3337, 2017
- APG IV. Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV» (PDF), **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p 1–20. 2016.
- BACCHUS, N. E.; WÉLIDIA, N. O.; CHRISTIANE, M.; CLÉRIA, M. M. Caracterização Química do Óleo Essencial de *Philodendron* sp. no Município de São João da Baliza, Roraima. **Revista Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v.7, n.4, 376-381. 2015.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446–475, 2008.
- BERG, J. M, LUBERT, J. **Bioquímica**. 6.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p, 545, 2008.
- BESERRA, E. B. et al. Relação entre densidade larval e ciclo de vida, tamanho e fecundidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em laboratório. *Neotropical Entomology*, **Revista Londrina**, v. 38, p.847-852, 2009.
- BRAGA, I. A.; LIMA, J. B. P.; SOARES, S. S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.2, p.199-203, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de ciência, tecnologia e insumos estratégicos. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a.

_____. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 3, **Bol Epidemiol**, v. 47, n. 31, 2018a.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS e o **Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília : Ministério da Saúde, 2006b.

_____. Ministério da saúde.Saúde. **Atualização de casos de febre amarela no Brasil. 2018b**. Disponível em: < <http://portais.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42496-ministerio-da-saude-atualiza-casos-de-febre-amarela-5> >. Acesso em: 17 Jan. 2018 b.

BUENO, C. A.; BARQUERO, A. A.; CÓN SOLI, H. D.; MAIER, M. S.; ALCHE, L. E. A natural tetranortriterpenoid with immunomodulating properties as a potential anti-HSV agent. **Revista Virus**, vol. 141, p. 47-54, 2009.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **Revista International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Revista Brazilian Journal and Biological Research**, v.33, p.179-189, 2000.

CAMPELL, F.L.; SULIVAN, W.W.; SMITH, L.N..The relative toxicity of nicotine, anabasine, methyl anabasine and lupinine for culicine mosquito larvae. **Revista Journal of Economic Entomology**. (26) 500-5. 1933

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Revista Advances in Colloid and Interfase Science**, v.107,p. 125-155, 2004.

CASSEB, A.R., et al . Diagnosis of arboviruses using indirect sandwich IgG ELISA in horses from the Brazilian Amazon. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, p.1-4, 2014.

CASTELLAR, A., OLIVEIRA, D. R., LEITÃO, S. G., BIZZO, H. R., SOARES, M. D. L. C., KINUPP, V. F., VEIGA-JUNIOR, V. F. Essential oil from *Philodendron fragrantissimum*, an aromatic Araceae from Amazonia, Brazil. **Journal of essential oil research**, v.25, n.3, p: 194-197, 2013.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários. **Revista Visconde do Rio Branco: Suprema**. p.113, 2004.

CHAU, C-F.; WU, S-H.; YEN, G-C. The development of regulations for food nanotechnology. **Journal Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 18, n. 5, p. 269-280, 2007.

CHENG SS, CHANG HT, CHANG ST, TSAI KH, CHEN WJ. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Journal Bioresour Technol**; v. 89, p: 99. 2003

CHIESA, M., J. GARG, Y. T. KANG e G. CHEN. Thermal conductivity and viscosity of water-in-oil nanoemulsions. **Journal Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 326, n.1–2, p: 67-72, 2008.

COELHO, M.A.N., SOARES, M.L., CALAZANS, L.S.B., GONÇALVES, E.G., ANDRADE, I.M. DE, PONTES, T.A., SAKURAGUI, C.M., TEMPONI, L.G., BUTURI, C., MAYO, S. 2016. **Araceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB51>>. Acesso Abril 28 de 2016

COELHO, M.A.N.; MAYO, S. J. Cinco espécies novas do gênero *Philodendron* Schott (Araceae) para o Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**. p. 47-60, 1998.

CONSERVATION INTERNATIONAL. **Biodiversity Hotspots**. 2010. Disponível em: <<http://www.biodiversityhotspots.org/xp/hotspots/Pages/default.aspx>>. Acessado em: 21 jan. 2018.

CONSOLI G.B., LOURENÇO O. R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro. **Revista Fiocruz**. p. 225, 1994

CORREA, M. G. S., VIÉGAS, J., SILVA, J. D., ÁVILA, P. D., BUSATO, G. R., & LEMES, J. S. Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. **Acta botânica Brasília, São Paulo**, v. 19, n.2, p. 295-303, 2005.

COURTOIS, E. A., PAINE, C. T., BLANDINIÈRES, P. A., STIEN, D., BESSIERE, J. M., HOUEL, E., CHAVE, J. Diversity of the volatile organic compounds emitted by 55 species of tropical trees: a survey in French Guiana. **Journal of chemical ecology**, v.35, n.11, p: 1349, 2009.

DE ANDRADE, J., et al. Chemical Characterization and Application of the Essential Oils from *Chenopodium ambrosioides* and *Philodendron bipinnatifidum* in the Control of *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae). **American Journal of Plant Sciences**, vol. 5, no 26, p. 3994, 2014.

DEFILIPPS, R.A.; MAINA, S.L.; CREPIN, J. Medicinal plants of the Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana). **Department of Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution**, 2004.

DIAS, C.N.; MORAES, F.C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: **Parasitology research**. v.113, n. 2, p: 565–592, 2014.

DISCOVER LIFE, *Philodendron fragrantissimum*. Disponível em: <<http://www.discoverlife.org/mp/20q> >. Acesso em: 1 Mar. 2018.

DOLABELA, M. F., SILVA, J. V. D. S., DO ROSÁRIO, D. M., DA VEIGA, A. D. S., DE VASCONCELOS, F., PERCÁRIO, S. Uma revisão bibliográfica sobre Araceae com foco nos gêneros *Pistia*, *Philodendron* e *Montrichardia*: aspectos botânicos, fitoquímicos e atividades biológicas. **Revista Fitos Eletrônica**. v.8, n.2, p.79-93, 2015.

DORMAN, H.J.D., DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2000.

DOS SANTOS, A. P. B. A beleza, a popularidade, a toxicidade e a importância econômica de espécies de Aráceas. **Revista Virtual de Química**, vol. 3, no 3, p. 181-195, 2011.

DOU, D., J. G. PARK, S. RANA, B. J. MADDEN, H. JIANG AND Y. P. PANG. "Novel selective and irreversible mosquito acetylcholinesterase inhibitors for controlling malaria and other mosquito-borne diseases." **Journal Scientific Reports**. v.3, p:1068, 2013

EE, S. L., X. DUAN, J. LIEW e Q. D. NGUYEN. Droplet size and stability of nanoemulsions produced by the temperature phase inversion method. **Chemical Engineering Journal**, v. 140, n. 1–3, p. 626-631, 2008.

EIRAS, A.E. Culicidae, in: Neves, D.P. (Ed.), **Parasitologia humana**, 12 ed. Atheneu, São Paulo, p. 387-401, 2011

ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V., FEATHERSTONE R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Journal Biochemical Pharmacology**; v.7, p : 88–95, 1961

FARIA, N. R., et al. Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. **Revista Science**, v. 352, n. 6283, p. 345-349, 2016.

FERNANDES, C.P., MASCARENHAS, M.P., ZIBETTI, F.M., LIMA, B.G., OLIVEIRA, R.P.R.F., ROCHA, L., FALCÃO, D.Q.. HLB value, an important parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.23, p:108–114, 2013.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KUNLE, A.; Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Journal Colloids and Surfaces**, v. 251, p 53-58, 2004

FERREIRA, J.T.B.; CORREA, A.G.; VIEIRA, P.C. Produtos Naturais no Controle de Insetos, **Revista Edufscar**, p.30, 2001.

FIOCRUZ, Fundação Oswaldo Cruz. **Conheça o comportamento do mosquito *Aedes aegypti* e entenda a razão que leva este pequeno inseto a ser taxado desta forma** 2017. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/oportunista.html>. Acesso em: 17 Jan. 2017

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. **Uma breve história da Febre Amarela.** Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1490&sid=9&tpl=printervie>>. Acesso em: 01 out 2016.

FLORA DO BRASIL 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15635>>. Acesso em: 17 Jan. 2018

FLORENTINO, H. O., CANTANE, R. D., REIS C.A "Controle populacional do mosquito *Aedes aegypti* na fase aquática." **Encontro Regional de Matemática Aplicada e Computacional – ERMAC.** 2016.

FLORURA DIGITAL. *Philodendron fragrantissimum*. Disponível em: <<https://sura.ots.ac.cr/florula4/>>. Acesso em: 1 Mar. 2018

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica: identificação, biologia, epidemiologia.** São Paulo: EDUSP, v.2, 2002.

FORGIARINI, A.; ESQUENA, J.; GONZALEZ, C.; SOLANS, C. Formation of nanoemulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature, **Revista Langmuir.** v. 17, n. 7, p. 2076 – 2083, 2001.

FRAUSIN, G.; LIMA, R.B.S.; HIDALGO, A.F.; MING, L.C.; POHLIT, A.M. Plants of the Araceae family for malaria and related diseases: a review. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais,** v.17, n.4, p.657-666, 2015.

FUMAGALI, E., GONÇALVES, R. A. C., MACHADO, M. F. P. S., VIDOTI, G. J., & OLIVEIRA, A. J. B. D. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 18, n. 4, p. 627-641. 2008.

FUNASA - **FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE** - MS. Dengue - Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor: manual de normas técnicas. Brasília. 2001. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf>. Acessado em: 21 jan. 2018.

GARCEZ, W.S., GARCEZ, F.R., SILVA, L.M.G.E., HAMERSKI, L.. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of some plants native to the West- Central region of Brazil. **Bioresource Technology journal.,** v. 100, p. 6647-6650, 2009

GBIF. Global Biodiversity Information Facility. Disponível em: <<https://www.gbif.org/species/2861312>>. Acessado em: jan.2018.

- GERIS, R., et al. Bioactive natural products as potential candidates to control *Aedes aegypti*, the vector dengue e. In: Atta-ur-Rahman, FRS. Studies in natural products chemistry. **Journal Elsevier**. Amsterdã, 2012.
- GOBBO, N. L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Journal Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.
- GRANDADAM, M., et al. Chikungunya virus, southeastern France. **Journal Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 5, p. 910, 2011.
- GRIFFIN, W.C. Classification of surface active agents by HLB. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**. v. 1, p. 311–326, 1949
- HEAL, R.E.; ROGERS, E., WALLACE, S. , STARNES, O. A survey of plants for insecticidal activity. **Journal Lloydia**. n. 13, p. 89-162, 1950.
- HILI, P.; EVANS, C.S.; VENESS, R.G. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. **Journal Letters in Applied microbiology**, v.24, p.269-275, 1997.
- HOLMBERG, K. JONSSON, B.; KRONBERG, B.; LINDMAN, B. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution. **Journal Wiley**. 2002
- HOMMA, A. K. O. Extrativismo vegetal na Amazônia: história, ecologia, economia e domesticação. O timbó: expansão, declínio e novas possibilidades para agricultura orgânica. Belém, PA. **Embrapa Amazônia Oriental-Livro científico (ALICE)**, p. 48, 2014.
- HOUGHTON, P. J., Y. REN AND M.-J. "Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi." **Natural Product Reports**. v.23, n. 2, p: 181-199, 2006.
- IAS, **International Aroid Society. The genera of Araceae**. Online. Disponível em: <<http://www.aroid.org/genera/index.html#a>>. 2016. Acesso em 28 Abril de 2016.
- IRUME, MARIANA VICTÓRIA; MORAIS, MARIA DE LOURDES DA COSTA SOARES; ZARTMAN, Charles Eugene and AMARAL, Iêda Leão do. Floristic composition and community structure of epiphytic angiosperms in a terra firme forest in central Amazonia. **Acta Botanica Brasil**, p: 378-393. 2013
- IZQUIERDO, P.; FENG, J.; ESQUENA, J.; TADROS, T. F.; DEDEREN, J. C.; GARCIA, M. J.; AZEMAR, N.; SOLANS, C. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. **Journal of Colloid and Interface Science**, 285, 388-394, 2005.
- JOFFARD, N., LEGENDRE, L., GIBERNAU, M. AND PASCAL, L, Differential Accumulation of Volatile Organic Compounds by Leaves and Roots of Two Guianese *Philodendron* Species, *P. fragrantissimum* Kunth and *P. melinonii* Brongn.. **Journal Chemical Biodiversity**. 2017

KHAN, M. T. "Molecular interactions of cholinesterases inhibitors using in silico methods: current status and future prospects." **Journal Biotechnol.** v.25, n. 5, p:331-346, 2009.

KRAEMER MUG, SINKA ME, DUDA KA, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **Journal eLife.** 2015.

LOCHHEAD, R. Y. Emulsions. **Journal Cosmetics e Toiletries**, v. 109, n. 5, p. 93-103, 1994.

LÓPEZ, M. D. PASCUAL M. J. "Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control." **Journal Industrial Crops and Products** v.31, n. 2, p: 284-288. 2010.

LÓPEZ, R., NAVARRO, J. A., MONTERO, M. I., AMAYA, K., RODRÍGUEZ, M., POLANIA, A. Manual de identificación de especies no maderables del corregimiento de Tarapacá, Colombia. **Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI Cooperación Técnica Alemana – GTZ.** 2006.

MARÇAL J, O., SANTOS, A. Infestação por *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e incidência do dengue no espaço urbano: um estudo de caso. **Revista Caminhos de Geografia.** v.5, p. 241-251, 2004.

MARTINES, RB. Notes from the field: evidence of Zika virus infection in brain and placental tissues from two congenitally infected newborns and two fetal losses—Brazil, 2015. **Journal Morbidity and mortality weekly report**, v. 65, 2016.

MORRISON, I.D.; ROSS, S. **Emulsions. Colloidal dispersions- Suspensions, Emulsions and Foams.** John Wiley y Sons Ltd. 420-455, 2002

MUELAS-SERRANO, S., et al. In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. **Elsevier, Journal of Ethnopharmacology.** v.71, p. 101-107, 2000.

MUSTAFA, M. S., et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, 2015, v. 71, n. 1, p. 67-70.

NATAL, D. The bioecology of *Aedes aegypti*. **Revista Biológico.** São Paulo. v. 64, n. 2, p. 205-207, 2002.

NETO, L.M.; FORZZA, R.C.; ZAPPI, D.. Angiosperm epiphytes as conservation indicators in Forest fragments: A case study from southeastern Minas Gerais, Brazil. **Journal Biodiversity and Conservation**, v.18, p. 3785-3807, 2009.

NOGUEIRA RC, CERQUEIRA HF, SOARES MBP. Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. **Expert Opinion on Therapeutic Patents.** v.20, n.2, p.1-13, 2010.

OLIVEIRA, H.P; SILVA, B. R; TICIANELLI, G.S et all. A Visão dos Alunos da FATEC-PR em Relação a Epidemia do Aedes Aegypti. **Tecnológica da FATEC-PR**, v.2, n.6, p. 84 - 105, 2015.

OLIVEIRA,B.R. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de Carapa guianensis e Copaifera sp. e estudo da ação repelente frente a Aedes aegypti.** Tesis Doctoral. Universidade de São Paulo. 2008.

OMS, Organização Mundial da Saúde. **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicidas. World health organization Communicable disease control, prevention and eradication WHO pesticide evaluation scheme.** WHO, Geneva, Switzerland, 2005.

_____, Organización Mundial de la Salud; Organización Panamericana de la Salud **Actualización Epidemiológica: Fiebre amarilla**, 16 de febrero de 2018. Washington. 2018. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=fiebre-amarilla-2178&alias=43621-16-febrero-2018-fiebre-amarilla-actualizacion-epidemiologica-621&Itemid=270&lang=en>. Acessado em: 21 feb. 2018

OSTERTAG, F., WEISS, J., MCCLEMENTS, D.J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Journal of Colloid and Interface Science**, p: 95–112, 2012.

OTTOBELLI, I., FACUNDO, V. A., ZULIANI, J., LUZ, C. C., BRASIL, H. O. B., MILITÃO, J. S. L. T., & BRAZ-FILHO, R. Chemical study of two Amazonian medicinal plants: *Philodendron scabrum* K. Krause (Araceae) and *Vatairea guianensis* Aubl.(Fabaceae). **Revista Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 393-400, 2011.

PATIÑO A. M, RODRÍGUEZ, A. J. ¿Debemos esperar una mayor expansión de distintos Arbovirus en las Américas?. **Revista Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana**. v.22, n. 2, 2017.

PINTO, A. C., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. D. S., LOPES, N. P., & EPIFANIO, R. D. A. (2002). Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, p. 45-61, 2002

PIRES, J.M.. Plantas Ictiotóxicas: Aspectos da botânica sistemática. Sessão integrada- Plantas ictiotóxicas (Timbós). Ciênc. Cult. Suplemento. **V Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. v. 32, p. 37-41. 1978

POHANKA, M. "Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology." **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia**, v.155, n. 3, p: 219-229, 2011.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 4 ed. Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, 1991.

REGAZZI, C.F., LIMA, W.O., PONTES, J.S. Avaliação comparativa do efeito residual de uma apresentação comercial do temefos com uma apresentação comercial do *Bacillus thuringiensis israelensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.36, p: 253, 2003.

REIS, G.G. et al. Estudo do efeito da secagem em convecção natural e forçada na composição do óleo essencial da citronela (*Cymbopogon nardus*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, São Paulo, v.8, n.4, p: 47-55, 2006.

ROEL, A.R., Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**. v. 1, p. 43- 50, 2001.

SAKURAGUI, C. M. Biogeografia de *Philodendron* seção *Calostigma* (Schott) Pfeiffer (Araceae) no Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 23, p. 561-569, 2008.

SANTIAGO, G.M, et al. Avaliação da atividade larvicida de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 187-190, 2005.

SENA, M.A., RIBEIRO, D.G. ANÁLISE ANATÔMICA E MORFOLÓGICA DE *Philodendron guaraense* GONÇALVES (ARACEAE). **Ciências biológicas, Botânica, Anatomia Vegetal. Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC - Florianópolis, SC**, 2006.

SILVA, J. I. M.; SOUZA, M. S.; SOARES, M. L. C.; COSTA, R. C.; NUNEZ, C. V. Óleos essenciais das raízes das espécies de *Philodendron maximum*, *P. solimoesense* e *P. goeldii* (Araceae), **Revista Fitos**. Rio de Janeiro, v, 10, n. 1, p.1-93, 2016

SILVA, R; OLIVEIRA, A.A; LIMA, R.A. Identificação dos metabólitos secundários do extrato etanólico das folhas de *Schinus terebinthifolius* RADDI. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 2, n. 2, 2015.

SIMÕES O. M. C., et al. **Farmacognosia da planta medicamento**. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1999.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, p. 467-95, 2004

SNITF. **Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas**. 2016.

Disponível em:

<http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=31>. Acesso em: 27 Abril de 2016.

SOLANS C, SOLÉ I. Nano-emulsions: formation by low-energy methods *Curr Opin Colloid. Interface Science*. p: 246–54, 2012.

SUKUMAR K, PERICH MJ, BOOBAR LR. Botanical derivatives in mosquito control: A review. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 7: 210-37. 1991

TADROS, T.; IZQUIERDO, P. ESQUENA, J.; SOLAN, C. Formation and stability of nanoemulsions. *Journal Advances in Colloid and Interface Science*, p. 303-318, 2004.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed. 2006.
VASCONCELOS, P.F.C., BRYANT, J.E., TRAVASSOS, A.P.A., TESH, R.B.,

RODRIGUES S.G., BARRET, A.D.T. Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brasil. *Emerging Infectious Disease*, v10, n 9, 2004.

VIANA, F. A. LUCIEN V. G.; ANDRADE M. N.; MORAIS S. M.; UCHOA D. E. A; POULIQUEN Y. B. M.; SANTIAGO G. M. P.; BEZERRA H. S. S. Atividade larvicida do óleo essencial de *Philodendron deflexum* sobre *Aedes aegypti* a. **IX Simposio 50 Latino-Americano de Farmacobotânica e III Reunião Latino-Americano de Fitoquímica.Gramado-RS**. p: 209. 1999.

VIANA, F. A.; NETO, M. A.; POULIQUEN, Y. B E LUCIEN, V. G. Chemical composition of the essential oil from roots of *Philodendron acutatum* schot. *Journal of Essential Oil Research*, v.14, n.3, p: 172-174, 2002.

VIZZOTTO, M., KROLOW, A., WEBER, G.E.B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado-Documentos (INFOTECA-E)** p. 16, 2010.

WIESNER, J., Z. KRIZ, K. KUCA, D. JUN AND J. Koca (2007). "Acetylcholinesterases--the structural similarities and differences." **J Enzyme Inhib Med Chem**. v.22, n. 4, p: 417-424, 2007

WOOSTER, T.J.; GOLDING, M.; SANGUANSRI, P. Impact of Oil Type on Nanoemulsion Formation and Ostwald Ripening Stability. *Langmuir*, v. 24, p: 12758-12765, 2008.