

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GISLENE MARI FUJIWARA

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES PARA VEICULAÇÃO DE FITOLARVICIDA**



CURITIBA

2017

GISLENE MARI FUJIWARA

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES PARA VEICULAÇÃO DE FITOLARVICIDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof^a Dr^a Sandra Maria W. Zanin
Co-orientadores: Prof. Dr. Francisco de A. Marques
Prof^a Dr^a Josiane F. G. Dias

CURITIBA

2017

Fujiwara, Gislene Mari
Desenvolvimento tecnológico, caracterização e avaliação de micropartículas
flutuantes para veiculação de fitolarvicida / Gislene Mari Fujiwara – Curitiba, 2017.
166 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Sandra Maria W. Zanin
Coorientador: Professor Dr. Francisco de A. Marques
Coorientadora: Professora Dra. Josiane F. G. Dias
Tese (doutorado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. *Aedes aegypti*. 2. Bioensaio. 3. Prevenção de doenças. 4. Inseticidas.
5. Toxicidade. I. Zanin, Sandra Maria W. II. Marques, Francisco de A. III. Dias, Josiane
F. G. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 614.4323

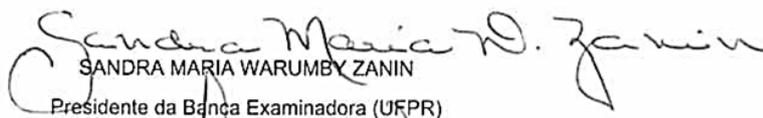


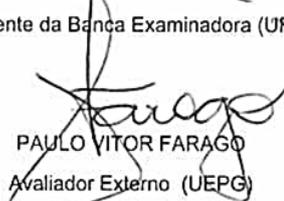
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TERMO DE APROVAÇÃO

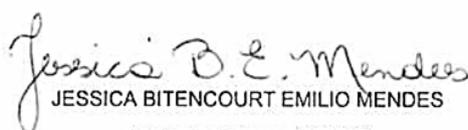
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de GISELENE MARI FUJIWARA intitulada: **DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES PARA VEICULAÇÃO DE FITOLARVICIDA**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

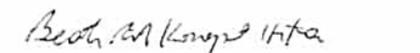
Curitiba, 10 de Maio de 2017.


SANDRA MARIA WARUMBY ZANIN
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


PAULO VITOR FARAGO
Avaliador Externo (UEPG)


CRISTIANE DA SILVA PAULA
Avaliador Externo (UFPR)


JESSICA BITENCOURT EMILIO MENDES
Avaliador Externo (UEPG)


BEATRIZ CRISTINA KONOPATZKI HIROTA
Avaliador Externo (UFPR)

*Ao meus pais, Susumi (in memoriam) e Diva,
meus exemplos de determinação, coragem,
sabedoria, bondade e amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, em especial minha mãe Diva, a quem me espelho pessoal e profissionalmente. Obrigada pelos momentos de conversas sinceras, carinho e amor. A cada dia te admiro e respeito mais, pela mulher e mãe que você é.

À Profª Drª Sandra Maria Warumby Zanin, orientadora e amiga, pelo incentivo, confiança e respeito depositados em mim durante todo o trabalho. Muito obrigada.

Ao Sr. Pedro Zannin, pelo comprometimento, sabedoria e amizade durante todos esses anos, e sem o qual não teria superado muitas das dificuldades encontradas durante esta jornada, tanto profissionais quanto pessoais.

Ao prof. Dr. Francisco de Assis Marques, pela confiança para execução deste trabalho.

À profª Drª Josiane de Fátima Gaspari Dias, pelo incentivo, comprometimento e disposição para esclarecer dúvidas, discutir resultados, corrigir manuscritos e assim, aprimorar este trabalho.

À Profª Drª Marilis Dallarmi Miguel, pelo apoio desde o início do mestrado, pelas conversas e risadas no laboratório e, principalmente pelas críticas construtivas que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho. Não tenho palavras para expressar minha gratidão.

Ao Prof. Obdulio Gomes Miguel, pela preciosa colaboração durante todos os anos em que estive no laboratório. Sempre terei enorme admiração e respeito.

À equipe da Farmácia Escola, profª Camila Costa, profª Deise Montrucchio, Guaracira, Ana Caroline, Marilene, Teresa e Elaine, pelo incentivo, apoio e compreensão desde o início do doutorado.

Ao doutor Vinícius Annies, por todo auxílio dado para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mário Navarro pela contribuição para os ensaios com as larvas de *Aedes aegypti*.

Aos meus colegas dos laboratórios de Farmacotécnica e Fitoquímica, em especial Camila Freitas de Oliveira, Cristiane da Silva Paula de Oliveira, Cibéli Martins, Fernando Betim, Angela de Souza e Vinícius B. de Oliveira, por toda ajuda durante os trabalhos. A generosidade, a competência e a humildade de todos vocês nunca serão esquecidas. Muito obrigada.

Aos ilustríssimos professores membros das bancas de qualificação e de defesa, por terem aceitado o convite e pelas valiosas contribuições prestadas.

Aos professores Jéssica Mendes Nadal e Paulo Vitor Farago, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, por toda colaboração para a realização das análises de microscopia eletrônica e discussão de resultados.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Ao Paulo Sérgio Diniz, sempre disposto a nos socorrer no laboratório.

À Maria da Graça Teixeira de Toledo pela importante contribuição nas análises espectroscópicas, amizade e incentivo.

À Universidade Federal do Paraná pelo incentivo ao meu aprimoramento profissional.

A todos os meus amigos, colegas e professores que de alguma maneira contribuíram para este trabalho.

Ao meu namorado Marcelo Hissao Imano, meu grande incentivador, e por quem tenho imensa admiração profissional e pessoal. Obrigada pelo carinho, paciência e suporte durante esses anos.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

A reemergência de doenças como a dengue, a febre amarela, a Chikungunya e a Zika, transmitidas principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti*, apresenta significativo impacto na saúde pública do país. A principal forma de controlar a transmissão dessas doenças é o combate ao mosquito, realizado com o uso de pesticidas sintéticos e manejo ambiental para remoção dos criadouros das larvas. Porém, o uso frequente de pesticidas sintéticos pode levar à contaminação ambiental e/ou humana e à emergência de insetos resistentes. O linalol e o cinamato de metila, comumente encontrados em óleos essenciais de diversas espécies de plantas, são tidos como alternativa aos pesticidas sintéticos, uma vez que apresentam atividade larvicida, repelente e/ou inseticida e são considerados seguros para utilização. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi desenvolver, caracterizar e avaliar micropartículas flutuantes contendo uma mistura de cinamato de metila e linalol (CM-L), na proporção 1:4, para utilização no controle populacional das larvas de *Aedes aegypti*. Inicialmente, foram realizados ensaios de toxicidade *in vitro* com o cinamato de metila, o linalol e a mistura CM-L através do bioensaio com *Artemia salina*, da atividade hemolítica, do potencial fitotóxico e da atividade larvicida. As micropartículas flutuantes contendo a mistura CM-L foram caracterizadas por meio de estudos morfológicos e espectroscópicos e avaliadas quanto à sua flotabilidade e perfil de liberação. O método analítico para a determinação do cinamato de metila e do linalol incorporado nas micropartículas foi validado conforme o preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e *The International Conference on Harmonization*. Foi investigada também a atividade larvicida das micropartículas flutuantes contra as larvas de *Aedes aegypti*. O cinamato de metila apresentou atividade larvicida significativa quando comparado ao linalol (valores de CL_{50} de $35,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $275,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente) e ao CM-L (CL_{50} $138,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$). As principais alterações morfológicas nas larvas submetidas ao tratamento com as três substâncias incluem inundação do sistema traqueal e lesão do intestino médio, fatores que dificultam o desenvolvimento e sobrevivência das larvas. O bioensaio com *A. salina* mostrou a alta bioatividade do cinamato de metila (CL_{50} $35,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), do linalol (CL_{50} $96,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e da mistura CM-L (CL_{50} $57,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$). As micropartículas flutuantes apresentaram tamanho médio de 1,73 μm ; eficiência de encapsulação de 85,2% para o cinamato de metila e de 66,7% para o linalol e flotabilidade média de 88,9% em sete dias e de 42,2% em 15 dias. Na avaliação da atividade larvicida, as micropartículas foram capazes de promover a redução dos valores de CL_{50} do cinamato de metila e do linalol, além de propiciar a mortalidade das larvas por um período de até 72 horas. Assim, os resultados indicam que, apesar da maior atividade larvicida do cinamato de metila, o uso da mistura CM-L como larvicida parece ser mais apropriado devido a sua significativa atividade larvicida e baixa toxicidade, e que a utilização de micropartículas flutuantes como carreador da mistura CM-L é uma proposta viável para o controle populacional das larvas de *Aedes aegypti*.

Palavras-chaves: *Aedes aegypti*. Cinamato de metila. Fitolarvicida. Linalol. Micropartículas flutuantes.

ABSTRACT

Dengue, yellow fever, Chikungunya and Zika are reemerging infectious diseases transmitted to humans mainly by infected *Aedes aegypti* mosquitoes. Despite of the significant impact on the public health, there are no specific therapeutics and prevention is limited to vector control measures, as the use of synthetic pesticides and environmental management to remove the breeding sites of the larvae. However, frequent use of these insecticides can result in phytotoxicity, human poisoning and emerging of resistant insects. Linalool and methyl cinnamate are commonly used in pharmaceutical, cosmetic and food industries and some authors have reported their repellent, insecticidal and larvicidal activities. In this context, the purpose of this study was to develop, characterize and evaluate floating microparticles containing a mixture of methyl cinnamate and linalool (MC-L), ratio 1: 4, for *Aedes aegypti* population control. Previously, *in vitro* toxicity tests were performed with methyl cinnamate, linalool and a MC-L mixture through the bioassay with *Artemia salina*, hemolytic activity, phytotoxic potential and larvicidal activity. Floating microparticles containing a MC-L mixture were characterized by morphological and spectroscopic studies, and according their buoyancy and release profile. The analytical method for the determination of the methyl cinnamate and linalool in the microparticles was validated according to the Agência Nacional de Vigilância Sanitária and the International Conference on Harmonization. It was also investigated the larvicidal activity of the floating microparticles against *Aedes aegypti*. The highest larvicidal activity was observed with methyl cinnamate, and the lowest one with linalool (LC₅₀ values of 35.4 µg.mL⁻¹ and 275.2 µg.mL⁻¹, respectively) and MC-L mixture (LC₅₀ 138.0 µg.mL⁻¹). Gut damage and flooding tracheal system were the major mechanisms involved in the larvicidal activity, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. Preliminary *in vitro* toxicity through brine shrimp showed the high bioactivity of methyl cinnamate (LC₅₀ 35.5 µg.mL⁻¹), linalool (LC₅₀ 96.1 µg.mL⁻¹) and the mixture MC-L (LC₅₀ 57.7 µg.mL⁻¹). The floating microparticles presented an average size of 1.73 mm; encapsulation efficiency of 85.2% for methyl cinnamate and 66.7% for linalool and buoyancy of 88.9% in seven days and 42.2% in 15 days. In the larvicidal bioassay, the floating microparticles were able to promote a reduction of the methyl cinnamate and linalool LC₅₀ values. In addition, they promoted larval mortality for up to 72 hours. Thus, the results indicate that, despite the greater larvicidal activity of methyl cinnamate, the use of the MC-L mixture as larvicide seems to be more appropriate due to its larvicidal activity and low toxicity, and that the use of floating microparticles as MC-L mixture carrier is a viable proposal for the population control of *Aedes aegypti* larvae.

Keywords: *Aedes aegypti*. Floating microparticles. Linalool. Methyl cinnamate. Phytolarvicide.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GLOBAL ESTIMADA DA DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA - 2016.....	24
FIGURA 2 - PAÍSES OU ÁREAS EM RISCO DE TRANSMISSÃO DA FEBRE AMARELA (2017).....	24
FIGURA 3 - CICLOS EPIDEMIOLÓGICOS DA FEBRE AMARELA.....	29
FIGURA 4 - CICLO DE VIDA DO <i>Aedes aegypti</i>	33
FIGURA 5 - OVOS DE <i>Aedes aegypti</i>	34
FIGURA 6 - LARVA DE <i>Aedes aegypti</i>	35
FIGURA 7 - PUPA DE <i>Aedes aegypti</i>	35
FIGURA 8 - MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i> NA FASE ADULTA	36
FIGURA 9 - MODELOS DE ESTRUTURAS DAS MICROPARTÍCULAS.....	41
FIGURA 10 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ALGINATO	44
FIGURA 11 - LIGAÇÃO ENTRE AS CADEIAS HOMOPOLIMÉRICAS ATRAVÉS DOS ÍONS CÁLCIO SITUADOS ENTRE OS GRUPOS COM CARGA NEGATIVA	44
FIGURA 12 - ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITOSANA	45
FIGURA 13 - DESACETILAÇÃO DA QUITINA	46
FIGURA 14 - ESTRUTURA QUÍMICA DA GOMA ARÁBICA	48
FIGURA 15 - MODELO <i>WATTLE BLOSSOM</i> PROPOSTO PARA ESTRUTURA DA AGP.....	49
FIGURA 16 - ESTRUTURA QUÍMICA DO CINAMATO DE METILA	50
FIGURA 17 - ESTRUTURA QUÍMICA DO LINALOL	52
FIGURA 18 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PESQUISA.....	60
FIGURA 19 - ESQUEMA PARA O PREPARO DE MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES.....	67
FIGURA 20 - ATIVIDADE ALELOPÁTICA DO CINAMATO DE METILA, LINALOL E MISTURA CM-L	79
FIGURA 21 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NAS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM CM, L E CM-L	84
FIGURA 22 - ESTABILIDADE DA PRIMEIRA SÉRIE DE EMULSÕES APÓS 24 HORAS	85

FIGURA 23 - ESTABILIDADE DA SEGUNDA SÉRIE DE EMULSÕES APÓS 60 DIAS.....	86
FIGURA 24 - REPRESENTAÇÃO DOS GRUPOS SILANOL LIVRE (A), GEMINAL (B), VICINAIS UNIDOS POR PONTE DE HIDROGÊNIO E GRUPO SILOXANO.....	93
FIGURA 25 - CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO-PADRÃO DE CINAMATO DE METILA (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) EM $\lambda = 210 \text{ NM}$	97
FIGURA 26 - CROMATOGRAMAS DA SOLUÇÃO-PADRÃO DE LINALOL (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) EM $\lambda = 210 \text{ NM}$	97
FIGURA 27 - CROMATOGRAMAS DA SOLUÇÃO-PADRÃO DA MISTURA CM-L EM $\lambda = 210 \text{ NM}$	98
FIGURA 28 - CROMATOGRAMAS DA SOLUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS SEM A ADIÇÃO DE MISTURA CM-L (A) E CONTENDO A MISTURA CM-L (B) EM $\lambda = 210 \text{ NM}$	98
FIGURA 29 -CURVA ANALÍTICA PARA O CINAMATO DE METILA E O LINALOL EM $\lambda = 210 \text{ NM}$	101
FIGURA 30 - MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES.....	105
FIGURA 31 - MICROPARTICULAS FLUTUANTES COM REVESTIMENTO DE QUITOSANA, EM MEV.....	106
FIGURA 32 - ESPECTROS IVTF DO LINALOL, CINAMATO DE METILA E DA MISTURA CM-L.....	108
FIGURA 33 - ESPECTROS IVTF DOS POLÍMEROS, DA MISTURA CM-L E DAS MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES CONTENDO A MISTURA CM-L.....	110
FIGURA 34 - ATIVIDADE LARVICIDA DAS MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES CONTENDO A MISTURA CM-L SOBRE O <i>Aedes aegypti</i> . (a) VISÃO GERAL DO ENSAIO E (b) LARVAS MORTAS 24 HORAS.....	112
FIGURA 35 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NAS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES.....	115

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS ASSOCIADAS A FEBRE AMARELA, DENGUE, CHIKUNGUNYA E ZIKA.....	25
QUADRO 2 - BIOATIVIDADE DE ESPÉCIES RICAS EM CINAMATO DE METILA.	51
QUADRO 3 - EFEITOS BIOLÓGICOS DO LINALOL.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - PORCENTAGEM DE HEMÓLISE OCACIONADA PELO CINAMATO DE METILA, LINALOL E MISTURA CM-L EM SUSPENSÃO DE HEMÁCIAS DE CARNEIRO 2% EM RELAÇÃO AO CONTROLE	77
GRÁFICO 2 – PERFIL DE LIBERAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES F8	111

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PARÂMETROS PARA A PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS	67
TABELA 2 - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DA MISTURA CM-L POR CLAE/DAD/UV	69
TABELA 3 - TOXICIDADE DO CINAMATO DE METILA, LINALOL E DA MISTURA CM-L FRENTE AO MICROCRUSTÁCEO <i>Artemia salina</i>	75
TABELA 4 - ATIVIDADE LARVICIDA DO CINAMATO DE METILA, LINALOL E DA MISTURA CM-L SOBRE <i>Aedes aegypti</i>	81
TABELA 5 - CONCENTRAÇÃO DE TENSOATIVOS E VALORES DE EHL.....	85
TABELA 6 - EHL DA SEGUNDA SÉRIE DE EMULSÕES	86
TABELA 7 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CaCO_3 SOBRE A FLOTABILIDADE DAS MICROPARTÍCULAS.....	89
TABELA 8- EFEITO DE DIFERENTES PROPORÇÕES DE QUITOSANA: ALGINATO (M/M) SOBRE A FLOTABILIDADE DAS MICROPARTÍCULAS.....	90
TABELA 9 - EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE GOMA ARÁBICA SOBRE A FLOTABILIDADE DAS MICROPARTÍCULAS.....	92
TABELA 10 - EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE AEROSIL® 200 SOBRE A FLOTABILIDADE DAS MICROPARTÍCULAS.....	92
TABELA 11 - VALORES DAS ÁREAS REFERENTES AO PICO DE CINAMATO DE METILA PARA CONSTRUÇÃO DE CURVA ANALÍTICA DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	99
TABELA 12 -VALORES DAS ÁREAS REFERENTES AO PICO DE LINALOL PARA CONSTRUÇÃO DE CURVA ANALÍTICA DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	100
TABELA 13 – RESULTADOS OBTIDOS PARA A VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO POR CLAE/DAD-UV.....	102
TABELA 14 – QUANTIDADE DE CM E L INCORPORADO NAS MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.....	103
TABELA 15 - ATIVIDADE LARVICIDA DAS MICROPARTICULAS FLUTUANTES F8 SOBRE <i>Aedes aegypti</i> EM 24 E 72 HORAS	113

TABELA 16 – VALORES DE CL ₅₀ (µg.mL ⁻¹) OBTIDOS PARA CM E L LIVRES E MICROENCAPSULADOS APÓS 24 HORAS	114
--	-----

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AER	- Aerosil® 200
ALG	- Alginato de sodio
ANVISA	- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
B.O.D	- <i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CENTRAL/CIEVS-SP	- Centro de informações estratégicas e vigilância em saúde
CHI	- Quitosana
CHIKV	- Vírus Chikungunya
CIVES	- Centro de Informação em Saúde para Viajantes
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CM	- Cinamato de metila
CM-L	- Mistura de CM e L (1:4)
DAD	- Detector de arranjo de diodo
DEN-1, DEN-2, DEN-4 e DEN-4	- Virus da dengue sorotipo 1, sorotipo 2, sorotipo 3 e sorotipo 4
DIVE	- Diretoria de vigilância epidemiológica
DP	- Desvio padrão
DPR	- Desvio padrão relativo
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
FDH	- Febre da dengue hemorrágica
FUNASA	- Fundação Nacional da Saúde
GA	- Goma arábica
ICH	- <i>International Conference on Harmonisation</i>
IVTF	- Infravermelho com transformada de Fourier
L	- Linalol
LD	- Limite de detecção
LQ	- Limite de quantificação
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
OECD	- Organisation for Economic Co-operation and Development
pH	- Potencial hidrogeniônico
SCD	- Síndrome de choque da dengue
SESA-PR	- Secretaria de Estado da Saúde do Paraná
UV	- Ultra-violeta
WHO	- World Health Organization
WPRO	- World Health Organization, Werstern Pacific Region
ZIKV	- Zika virus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 OBJETIVOS	22
1.1.1 Objetivo Geral	22
1.1.2 Objetivos Específicos	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 DOENÇAS INFECCIOSAS EMERGENTES	23
2.1.1 Febre Chikungunya	25
2.1.2 Febre Zika	27
2.1.3 Febre Amarela.....	28
2.1.4 Dengue.....	30
2.2 <i>Aedes aegypti</i> (LINNAEUS, 1762)	32
2.2.1 Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	33
2.2.1.1 Ovo de <i>Aedes aegypti</i>	33
2.2.1.2 Larva de <i>Aedes aegypti</i>	34
2.2.1.3 Pupa de <i>Aedes aegypti</i>	35
2.2.1.4 Adulto de <i>Aedes aegypti</i>	36
2.3 PESTICIDAS	37
2.3.1 Formulações pesticidas.....	38
2.4 MICROPARTÍCULAS	40
2.4.1 Micropartículas flutuantes.....	42
2.4.2 Polímeros utilizados para a produção de micropartículas flutuantes.....	43
2.4.2.1 Alginato de sódio	43
2.4.2.2 Quitosana	45
2.4.2.3 Goma Arábica	47
2.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO CINAMATO DE METILA, DO LINALOL E DA MISTURA CM-L.....	49
2.5.1 Cinamato de Metila	49
2.5.2 Linalol	52
2.5.3 Mistura CM-L.....	55
3 MATERIAL E MÉTODOS	56
3.1 EQUIPAMENTOS	56
3.2 REAGENTES E SOLVENTES	57
3.2.1 Fármacos	57
3.2.2 Polímeros	57
3.2.3 Água purificada	57
3.2.4 Outros reagentes e solventes.....	57

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	58
3.4 TESTES DE TOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	61
3.4.1 Teste de toxicidade <i>in vitro</i> do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i> Leach	61
3.4.2 Atividade hemolítica do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L.....	61
3.4.3 Atividade alelopática do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L	62
3.4.4 Atividade larvicida do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L contra larvas de <i>Aedes aegypti</i>	64
3.4.4.1 Alterações morfológicas das larvas submetidas ao teste de atividade larvicida	65
3.5 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES	65
3.5.1 Determinação do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) da mistura CM-L.....	65
3.5.2 Avaliação dos parâmetros das formulações para obtenção das micropartículas flutuantes	66
3.6 OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS FLUTUANTES CONTENDO A MISTURA CM-L	68
3.7 FLOTABILIDADE	68
3.8 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE MISTURA CM-L MICROENCAPSULADA POR CLAE/DAD-UV.....	69
3.8.1 Validação do método analítico para a quantificação da Mistura CM-L microencapsulada.....	69
3.8.2 Determinação da quantidade de Mistura CM-L nas micropartículas	72
3.8.3 Eficiência de encapsulação	73
3.9 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROPARTÍCULAS	73
3.9.1 Análises morfológicas e de superfície	73
3.9.2 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier	73
3.10 ESTUDO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	74
3.11 ATIVIDADE LARVICIDA DA MISTURA CM-L MICROENCAPSULADA	74
3.11.1 Alterações morfológicas das larvas submetidas ao teste de atividade larvicida	74
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1 TESTE DE TOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	75
4.1.1 Teste de toxicidade <i>in vitro</i> do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i> Leach	75
4.1.2 Atividade hemolítica do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L.....	77
4.1.3 Atividade alelopática do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L	78

4.1.4 Atividade larvicida co cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L contra larvas de <i>Aedes aegypti</i>	81
4.1.4.1 Alterações morfológicas das larvas submetidas ao teste de atividade larvicida	82
4.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES	85
4.2.1 Determinação do valor de EHL da mistura CM-L	85
4.2.2 Avaliação dos parâmetros das formulações para obtenção das micropartículas flutuantes	87
4.2.2.1 Determinação da concentração de mistura CM-L para formulação das micropartículas	87
4.2.2.2 Influência da quantidade do agente formador de gás (CaCO ₃) na estrutura e flotabilidade das micropartículas	88
4.2.2.3 Influência do recobrimento com quitosana sobre a flotabilidade das micropartículas	89
4.2.2.4 Influência da incorporação de goma arábica na flotabilidade das micropartículas	91
4.2.2.5 Incorporação de dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200) na formulação.....	92
4.3 OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS FLUTUANTES CONTENDO A MISTURA CM-L	94
4.4 FLOTABILIDADE	95
4.5 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE MISTURA CM-L MICROENCAPSULADA POR CLAE/DAD-UV.....	96
4.5.1 Validação do método analítico para a quantificação da Mistura CM-L microencapsulada por CLAE/DAD-UV.....	96
4.5.2 Quantidade de cinamato de metila e linalol incorporado nas micropartículas e eficiência de encapsulação.....	103
4.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES	105
4.6.1 Análises Morfológica e de Superfície das Micropartículas Flutuantes.....	105
4.6.2 Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho	106
4.7 ESTUDO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	111
4.8 ATIVIDADE LARVICIDA DA MISTURA CM-L MICROENCAPSULADA	112
4.8.1 Alterações morfológicas das larvas de <i>Aedes aegypti</i> submetidas ao tratamento com as micropartículas flutuantes	114
5 CONCLUSÃO	116
REFERÊNCIAS.....	118
APÊNDICE - MANUSCRITO	146

1 INTRODUÇÃO

A proliferação nas áreas urbanas do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1972), conhecido popularmente como o mosquito da dengue, é considerado um grave problema de saúde pública. (SENHORINI, 2010).

O *Aedes aegypti* é também o principal vetor dos vírus da febre amarela, Chikungunya e Zika, doenças originárias do continente africano e reemergentes no Brasil. (BRASIL, 2015a, 2015b, SANYAOLU et al., 2016).

Desde julho de 2014, o Brasil tem vivenciado o aumento de casos de febre amarela silvestre em áreas fora da região amazônica, como Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro, o que preocupa as autoridades sanitárias devido a possibilidade de transmissão urbana do vírus, ocasionada pelo mosquito *Aedes aegypti*. (BRASIL, 2015b, 2016a, 2017b).

Segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017a), no ano de 2016 foram registrados mais de um milhão e 500 mil casos prováveis de dengue no Brasil, com uma incidência de 733,4 casos para cada 100 mil habitantes. Em 2017, no período de janeiro a abril, foram registrados 113.381 casos prováveis. (BRASIL, 2017e). No Paraná, de agosto de 2016 a maio de 2017, foram confirmados mais de 705 casos de dengue, 59 casos de Chikungunya e quatro casos de Zika vírus. (PARANÁ, 2017).

Até o momento apenas uma vacina contra a dengue, desenvolvida pelo laboratório Sanofi Pasteur (Dengvaxia®) possui registro na ANVISA, sendo que esta não é eficaz contra os vírus da Chikungunya e Zika. (ANVISA, 2016).

O mosquito possui hábitos domiciliares, sendo essencialmente urbano. Seu desenvolvimento é classificado como holometábolo, pois faz metamorfose completa e seu ciclo de vida é composto por quatro estágios: ovo, larva, pupa e adultos. O ciclo de vida desse inseto depende diretamente da presença de água parada, pois os ovos necessitam da mesma para eclosão. O controle populacional do mosquito transmissor é a principal forma de combate a dengue. (FUNASA, 2001).

A principal forma de combate ao mosquito é a educação da população quanto a eliminação dos locais onde ocorre a oviposição e o desenvolvimento de suas larvas (criadouros) e a aplicação de inseticidas sintéticos, como os organofosforados. (TELES, 2009; PAULA et al., 2011).

Os pesticidas sintéticos são amplamente utilizados no Brasil para controle de endemias como a dengue, porém a utilização frequente pode levar à contaminação ambiental e/ ou humana e ao surgimento de espécies resistentes. Neste sentido, os óleos essenciais apresentam-se como alternativa de uso, uma vez que demonstraram ações repelente, inseticida, fungicida e antimicrobiana. (ISMAN, 2000; SILVA et al., 2008).

Diversos óleos essenciais têm apresentado atividade larvicida contra o *Aedes aegypti*, como os de *Cymbopogon citratus* Stapf. (CAVALCANTI et al., 2004), *Lippia sidoides* Cham. (CARVALHO et al., 2003) e *Ocimum basilicum* Linn. (GOVINDARAJAN et al., 2013). Além disso, compostos isolados dos óleos essenciais, como o timol, o cinamato de metila e o linalol também demonstraram atividade repelente, inseticida ou larvicida. (CARVALHO et al., 2003; SIMAS et al., 2004; JANTAN et al., 2005; BENELLI et al., 2013).

No entanto, os óleos essenciais são voláteis e apresentam instabilidade química na presença de ar, luz, umidade e altas temperaturas. Estas características dificultam a utilização em sua forma pura, pois haveria a necessidade de constantes reaplicações para manutenção da sua atividade. (MENEZES, 2005; SANTOS, 2014). Assim, estudos sugerem a veiculação dos óleos essenciais em diferentes sistemas, como os micro e nanoestruturados, com a finalidade de aumentar sua proteção contra as condições ambientais, reduzir o número de aplicações e prolongar sua ação. (PAULA et al., 2012; SANTOS, 2014; FERREIRA et al., 2015; DURÁN et al., 2016).

De modo amplo, podemos definir a tecnologia das micropartículas como um processo de englobamento de diferentes substâncias em pequenas partículas pela formação de uma fina camada protetora ao seu redor. (ANDREO FILHO; OLIVEIRA, 1999; SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000; ALLEN JÚNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2007).

A microencapsulação permite separar incompatibilidades, aumentar a estabilidade de produtos, converter líquidos em sólidos, diminuir a volatilidade ou inflamabilidade de líquidos, mascarar gosto e odor e reduzir a toxicidade de substâncias. (MAGILL, 1991; SILVA et al., 2003).

As micropartículas flutuantes surgiram com a finalidade de melhorar a liberação gástrica de fármacos. (MUKUND; KANTILAL; SUDHAKAR, 2012). No emprego como carreadores de larvicidas, objetivam manter o produto por mais tempo

na superfície da água, pois as larvas submergem constantemente para respirar e se alimentar, entrando frequentemente em contato com o produto. (PAULA et al., 2012).

Neste contexto, visando empregar uma mistura de cinamato de metila e linalol (mistura CM-L) no controle populacional do mosquito *Aedes aegypti*, este trabalho teve por objetivo principal desenvolver, caracterizar e avaliar micropartículas flutuantes contendo a mistura CM-L como larvicida para utilização em locais com água parada, ambientes propícios ao desenvolvimento das larvas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar micropartículas poliméricas flutuantes contendo a Mistura CM-L, para o controle populacional das larvas de *Aedes aegypti*.

1.1.2 Objetivos Específicos

Realizar teste de toxicidade *in vitro* do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L, frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach;

Avaliar a atividade hemolítica do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L sobre hemácias de carneiro;

Avaliar a atividade alelopática do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L sobre sementes de *Lactuca sativa*;

Comparar a atividade larvicida do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L sobre as larvas de *Aedes aegypti*;

Avaliar as alterações morfológicas das larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao tratamento com cinamato de metila, linalol e mistura CM-L;

Determinar o valor do Equilíbrio Hidrófilo- Lipófilo (EHL) da mistura CM-L;

Desenvolver método de obtenção de micropartículas poliméricas flutuantes contendo a mistura CM-L;

Caracterizar as micropartículas quanto à flotabilidade;

Desenvolver e validar método de quantificação da mistura CM-L por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/DAD-UV);

Determinar a eficiência de encapsulação das micropartículas flutuantes;

Caracterizar as micropartículas poliméricas contendo mistura CM-L por meio de análises morfológicas e espectroscópicas;

Avaliar o perfil de liberação *in vitro* da mistura CM-L microencapsulada;

Verificar a atividade larvicida das micropartículas poliméricas flutuantes contendo a mistura CM-L sobre as larvas de *Aedes aegypti*;

Verificar as alterações morfológicas das larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao tratamento com as micropartículas flutuantes contendo a mistura CM-L.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇAS INFECCIOSAS EMERGENTES

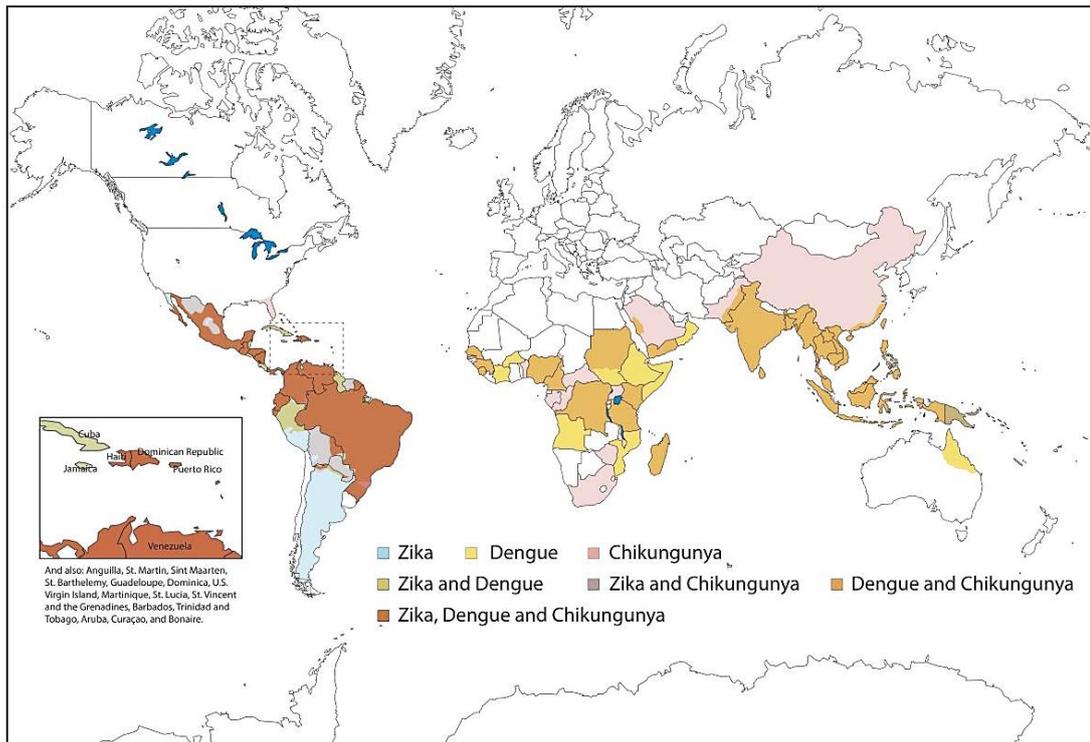
Doenças infecciosas emergentes podem ser definidas como infecções recentemente introduzidas em uma população, ou aquelas já existentes, mas que apresentam um rápido aumento na incidência e distribuição geográfica. (LUNA, 2002; PAZ; BERCINI, 2009; LIMA-CAMARA, 2016). Essas doenças impactam tanto na saúde pública como na financeira de um país devido aos custos relacionados ao diagnóstico, tratamento e prevenção, bem como as perdas de produtividade decorrentes da ausência de trabalho e o comprometimento da qualidade de vida dos pacientes. (MURUGAN; SATHISHKUMAR, 2016; MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017).

Nas últimas décadas a população mundial tem vivenciado a emergência de algumas doenças, em especial as arboviroses, como a dengue, a febre amarela, a Chikungunya e a Zika. (LIMA-CAMARA, 2016; PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016). Os arbovírus são vírus transmitidos ao homem e outros animais pela picada de artrópodes hematófagos, sendo os de interesse à saúde pública as famílias virais: Bunyaviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Reoviridae e Rhabdoviridae (LOPES; LINHARES; NOZAWA, 2014).

As arboviroses podem ser consideradas uma grande preocupação em países de regiões tropicais e sub-tropicais, as quais apresentam condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento dos vetores responsáveis pela transmissão dos vírus. Outros fatores que podem contribuir para o surgimento das doenças emergentes são as alterações climáticas, do ecossistema pela ação humana (desmatamento, poluição, migração de população), crescimento populacional urbano desordenado e o uso indiscriminado de antimicrobianos. (GRISOTTI, 2010; LOPES; LINHARES; NOZAWA, 2014; LIMA-CAMARA, 2016; MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017).

O *Aedes aegypti* é o principal vetor dos arbovírus responsáveis pela febre amarela, dengue, febre Chikungunya e febre Zika, as quais são doenças endêmicas em diversos países, conforme mostrado nas Figuras 1 e 2. (CENTRAL/CIEVS-SP, 2015).

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GLOBAL ESTIMADA DA DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA - 2016



FONTE: Adaptado de PATTERSON; SAMMON; GARG (2016)

FIGURA 2 – PAÍSES OU ÁREAS EM RISCO DE TRANSMISSÃO DA FEBRE AMARELA (2017)



FONTE: <https://www.cdc.gov/yellowfever/maps>

A febre amarela, dengue, febre Chikungunya e febre Zika apresentam sintomas semelhantes, cujas principais características encontram-se no Quadro 1.

QUADRO 1 - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS ASSOCIADAS A FEBRE AMARELA, DENGUE, CHIKUNGUNYA E ZIKA

Principais Sintomas	Febre Amarela	Dengue	Chikungunya	Zika
Febre	Febre alta (e diarreia)	Febre alta sempre, acima de 38°C (4 a 7 dias)	Febre alta frequente, acima de 38°C (2 a 3 dias)	Febre baixa, abaixo de 38°C, quando presente (1 ou 2 dias)
Dor	Geralmente dores musculares	Dores musculares, possibilidade de dores leves nas articulações	Geralmente dores intensas presentes nas articulações, menor incidência de dores musculares	Possibilidade de dores leves nas articulações, com dores musculares
Manchas na pele	Pele amarelada	Manchas vermelhas podem se manifestar a partir do 4º dia	Manchas vermelhas podem estar presentes desde o 2º dia (ou até o 5º dia)	Manchas vermelhas quase sempre presentes, no 1º e 2º dias
Prurido	Ausente	Leve, em alguns casos	Leve, em 50 a 80% dos casos	Moderado a intenso
Manifestação nos olhos	Geralmente apresenta cor amarelada	Rara presença de conjuntivite	Possível vermelhidão (30% dos casos)	Possível vermelhidão (50 a 90% dos casos)

FONTE: Adaptado de http://www.ioc.fiocruz.br/abcnaciencia/html/word/?page_id=154

2.1.1 Febre Chikungunya

É uma doença causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV), um RNA vírus pertencente ao gênero *Alfavírus*, da família *Togaviridae*. O vírus é transmitido a partir da picada de fêmeas dos mosquitos *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus*, porém a transmissão vertical já foi observada em alguns casos. (WHO, 2015; INVIVO, 2015; SANYAOLU et al., 2016).

O nome Chikungunya significa “aquele que se curva” na língua Kimakonde, e descreve um dos sinais mais importantes da doença, a artralgia intensa. Os primeiros sintomas surgem entre dois e doze dias após a picada do inseto contaminado e são repentinos: febre alta acompanhada de artralgia, principalmente nos pulsos e

tornozelos. Também pode ocorrer dores musculares, de cabeça, náusea, cansaço e manchas vermelhas pelo corpo. Raramente surgem complicações oculares, neurológicas e cardíacas. O risco de morte é baixo e ocorre principalmente em pessoas idosas ou debilitadas. (WHO, 2015; INVIVO, 2015).

A febre Chikungunya foi primeiramente descrita no ano de 1952, quando um surto atingiu o sul da Tanzânia. Desde então, a doença foi identificada em mais de 60 países da Ásia, África, Europa e América, incluindo o Brasil, tendo mais de 1,2 milhões de casos suspeitos. (WHO, 2015; INVIVO, 2015).

O número de casos na África, Ásia e Índia foi baixo até o ano 2000, quando um surto atingiu a República Democrática do Congo. No ano de 2005, um novo surto atingiu ilhas do Oceano Índico, sendo que em 2006, numerosos casos importados foram relatados na Europa. No ano de 2007, ocorreu o primeiro caso de transmissão na Europa, em um surto no nordeste da Itália, quando foi confirmada a transmissão pelo mosquito *Aedes albopictus*. Até o ano de 2013 os casos autóctones ocorriam apenas em alguns países da África e Ásia, onde o vírus circulava, porém, ao final do mesmo ano, os casos autóctones já estavam presentes em vários países do Caribe e, em março de 2014, na República Dominicana e Haiti. (WHO, 2015; INVIVO, 2015).

Os primeiros registros de Chikungunya no Brasil ocorreram no ano de 2010, sendo dois casos importados. No ano de 2012, outro caso importado foi diagnosticado no Rio de Janeiro. Em junho de 2014, cinco militares que voltavam de missões no Haiti manifestaram a doença no Brasil. Outros 37 casos importados surgiram nos meses seguintes. Ainda em 2014, surgiram os primeiros casos autóctones no país, principalmente na Bahia. (WHO, 2015; INVIVO, 2015).

Segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2016b), de setembro a dezembro de 2014 foram notificados 3.657 casos autóctones suspeitos de febre de Chikungunya em oito municípios brasileiros, nos estados da Bahia, Amapá, Roraima, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal. No ano de 2016, foram registrados 271.824 casos prováveis de febre de Chikungunya no país, sendo confirmados 151.318 casos e 196 óbitos. (BRASIL, 2017a). De janeiro a abril de 2017, foram confirmados 13.239 casos de Chikungunya e registrados nove óbitos em decorrência da infecção pelo vírus. (BRASIL, 2017e).

2.1.2 Febre Zika

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, o qual foi primeiramente isolado na floresta Zika, em Uganda, no ano de 1947, em um macaco Rhesus, usado como sentinela para a febre amarela. Atualmente a doença é endêmica a leste e oeste do continente africano e em algumas áreas do Sudeste Asiático. (DUFFY et al., 2009; BRASIL, 2015a).

O primeiro grande surto de febre Zika fora das áreas endêmicas ocorreu no ano de 2007 na ilha de Yap, Micronésia. Em 2013, houve uma epidemia na Polinésia francesa e em fevereiro de 2014, foi registrado na ilha de Páscoa, o primeiro caso de febre Zika autóctone nas Américas. (DUFFY et al., 2009; BRASIL, 2015a).

Em função da ampla distribuição do mosquito *Aedes aegypti* no Brasil e do grande número de turistas provenientes de diversos países no período da Copa do Mundo de 2014, a Secretaria de Vigilância em Saúde passou a monitorar casos de doenças exantemáticas, principalmente na região nordeste do país. Em abril de 2015 foram confirmados casos de transmissão autóctone de febre pelo vírus Zika no país, sendo oito no estado da Bahia e oito no Rio Grande do Sul. (BRASIL, 2015a).

No ano de 2016, foram registrados 215.319 casos prováveis de febre pelo vírus Zika no país, tendo sido confirmados 130.701 casos e oito óbitos. Em gestantes, foram registrados 17.000 casos prováveis, sendo 11.052 confirmados por critério clínico-epidemiológico ou laboratorial. (BRASIL, 2017a). De janeiro a abril de 2017 não foram registrados óbitos relacionados ao ZIKV, porém, foram confirmados 2.826 casos de infecções pelo vírus. (BRASIL, 2017e).

O ZIKV é transmitido principalmente por picadas das fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes* (*A. africanus* e *A. aegypti*). No entanto, o vírus já foi detectado em amostras de sangue, urina, sêmen, saliva, líquido, líquido amniótico e leite materno de indivíduos infectados, podendo ocorrer também transmissão vertical e sexual. (LONG; LONG; KOYFMAN, 2016).

A grande maioria dos casos é assintomática, e estima-se que apenas 18% dos infectados apresentam manifestações clínicas da doença, como febre de baixa intensidade (inferior a 38,5°C), normalmente acompanhada de exantema maculopapular. Outros sintomas incluem artralgia, mialgia, cefaleia, hiperemia conjuntival e, menos frequentemente, edema, odinofagia, tosse seca e alterações gastrointestinais, principalmente vômitos. (BRASIL, 2015a; WPRO, 2015).

Uma possível correlação entre a infecção pelo ZIKV e a síndrome de Guillain-Barré (SGB) foi observada em locais com circulação simultânea do vírus da dengue. Em 2013, a Polinésia francesa sofreu epidemias simultâneas de dengue e febre Zika, sendo que pela primeira vez foram registrados casos graves, com complicações neurológicas (Síndrome de Guillain Barré e meningoencefalite) ou autoimunes (leucopenia, púrpura trombocitopênica). (IOOS et al., 2014; OEHLER et al., 2014). A síndrome de Guillain-Barré é uma doença autoimune na qual os nervos periféricos são afetados, lesionando a bainha de mielina, o que resulta no enfraquecimento dos músculos e paralisia. (PASSI et al., 2017).

A infecção pelo ZIKV de mulheres durante o primeiro trimestre de gestação pode acarretar em alterações no desenvolvimento do feto, como redução do crescimento, microcefalia e calcificações intracranial e placentária. (LONG; LONG; KOYFMAN, 2016; PASSI et al., 2017). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2016a), a microcefalia é uma malformação congênita, cujo perímetro cefálico apresenta-se menor que o esperado para a idade e o sexo. (BRASIL, 2015c).

No final de novembro de 2015, o Ministério da Saúde divulgou a correlação entre o surto de microcefalia na região Nordeste do país e o ZIKV. A confirmação foi realizada pelo Instituto Evandro Chagas, o qual conseguiu identificar a presença do vírus em amostras de sangue e tecidos de um recém-nascido que veio a óbito no Ceará. (BRASIL, 2015d).

Até final de dezembro de 2016 foram notificados 10.867 casos de microcefalia relacionada à infecção pelo ZIKV, sendo 2366 confirmados, e desses, 582 evoluíram para óbito fetal ou neonatal. (BRASIL, 2017c).

2.1.3 Febre Amarela

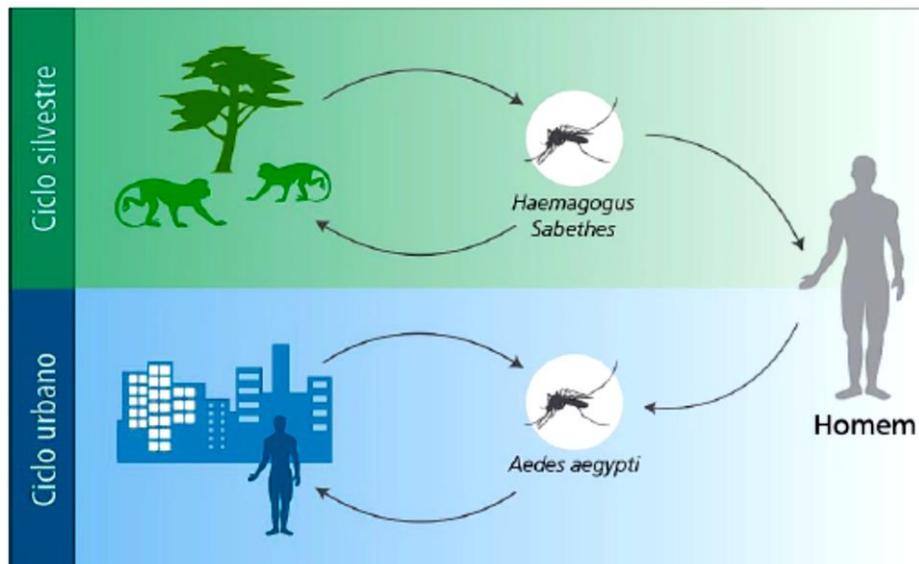
A febre amarela é uma doença infecciosa não contagiosa, endêmica em áreas de florestas tropicais da América do Sul e da África, causada por um vírus do gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*. (BRASIL, 2014; WHO, 2016b).

Os sintomas iniciais incluem febre, cefaleia, dores musculares, náuseas, vômitos e fadiga. (BRASIL, 2009; WHO, 2016b). Uma pequena porcentagem dos infectados evolui para uma segunda fase, mais tóxica, desenvolvendo febre alta, icterícia (característica relacionada com o nome da doença), dor abdominal com vômito, sangramento pela boca, nariz, olhos ou estômago e perda das funções

hepática e renal. Metade dos pacientes que entram na fase tóxica vão a óbito dentro de 10 a 14 dias. (ROGERS et al., 2006; BRASIL, 2009). Não há tratamento específico para a febre amarela, porém, a vacina de vírus atenuado é eficaz, segura e economicamente acessível. (WHO, 2016b).

O vírus da febre amarela é transmitido pelos mosquitos pertencentes aos gêneros *Aedes*, *Haemagogus* e *Sabethes*, os quais vivem em habitats domésticos, selvagens ou em ambos os habitats. Assim, existem dois tipos de ciclos de transmissão (Figura 3): a silvestre e a urbana. (ROGERS et al., 2006; BRASIL, 2009; WHO, 2016b). Não há diferença etiológica, fisiopatológica, imunológica e clínica entre os ciclos, sendo a diferenciação realizada apenas pelos aspectos geográficos, tipo de hospedeiro envolvido e participação de diferentes espécies de mosquitos transmissores. (BRASIL, 2009).

FIGURA 3 - CICLOS EPIDEMIOLÓGICOS DA FEBRE AMARELA



FONTE: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/descricaodadoencafebreamarela>

No ciclo de transmissão silvestre, os macacos (primatas não humanos - PNH) são os principais hospedeiros do vírus. Assim, quando mosquitos silvestres, como os dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, picam macacos infectados, passam a ser transmissores do vírus para macacos saudáveis e, eventualmente, para o homem, principalmente em áreas rurais. (BRASIL, 2009; GOLDANI, 2017).

O ciclo urbano envolve a transmissão do vírus de um homem infectado para um saudável, tendo como transmissor, mosquitos urbanos como o *Aedes aegypti*. Assim,

a introdução do vírus numa área urbana ocorre após o homem se infectar no ambiente silvestre. (ROGERS et al., 2006; GOLDANI, 2017).

A introdução do vírus nas Américas ocorreu, provavelmente, através de navios transportando escravos da África Ocidental, sendo que as primeiras epidemias foram registradas no México no ano de 1648. (BRASIL, 2004; ROGERS et al., 2006). No Brasil, os primeiros registros da doença são do ano de 1685, quando uma primeira epidemia da doença foi registrada em Recife (PE). Até o ano de 1961, milhares de casos foram relatados em Recife e Salvador (BA), até a implementação da primeira campanha profilática. Nesse período, a febre amarela era essencialmente urbana. (BRASIL, 2004; COSTA et al., 2011).

No entanto, o avanço do conhecimento sobre a doença, o isolamento viral, a definição do agente etiológico e a introdução da vacina direcionaram as medidas de controle dos vetores e assim, a eliminação da doença nas áreas urbanas, sendo os últimos casos registrados na cidade de Sena Madureira (AC), no ano de 1942. (BRASIL, 2004; GOLDANI, 2017). As epizootias (doenças que atacam animais) passaram também a ser monitoradas pelo Ministério da Saúde desde o ano de 1999, com a finalidade de prever a ocorrência da doença e fazer a intervenção adequada para evitar casos humanos. (BRASIL, 2009).

No Brasil, a febre amarela tem comportamento endêmico na região amazônica, porém, desde dezembro de 2016 até março de 2017, foram notificados ao Ministério da Saúde 1.558 casos suspeitos de febre amarela silvestre extra-amazônica, sendo confirmados 422 (27,08%) casos. No mesmo período, não houve evidências de transmissão do vírus pelo *Aedes aegypti*. (BRASIL, 2017d).

2.1.4 Dengue

A dengue é uma doença viral, causada por um arbovírus, o qual possui quatro diferentes sorotipos, DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. Sua transmissão ocorre quando a fêmea do mosquito do gênero *Aedes* infectada pelo vírus pica o homem. (FUNASA, 2001; GUZMAN, 2010).

A doença pode se manifestar na forma de dengue clássica, de febre da dengue hemorrágica (FDH) e síndrome de choque da dengue (SCD). A dengue na sua forma clássica pode ser assintomática ou sintomática, e se inicia com o ciclo de replicação viral nas células estriadas, lisas, fibroblastos e linfonodos locais, ocorrendo

a chamada viremia, com disseminação do vírus no organismo do indivíduo. (WHO, 2009).

Os primeiros sintomas como febre, dor de cabeça e mal-estar surgem após um período de incubação que pode variar de dois a dez dias, seguindo com intensas dores musculares e articulares. Nesta forma a letalidade é baixa, mesmo sem tratamento específico, porém normalmente ocorre afastamento das pessoas de suas atividades diárias. (WHO, 2009; GUZMAN, 2010).

Na dengue hemorrágica, a febre é alta, com ocorrências de vômitos, manifestações hemorrágicas, hepatomegalia e insuficiência circulatória. A letalidade é significativamente maior do que na forma clássica, dependendo da capacidade de atendimento médico-hospitalar da localidade. (WHO, 2009; GUZMAN, 2010).

As primeiras epidemias de dengue datam do ano de 1779-1780 na Ásia, África e América do Norte, sendo que a ocorrência nos três continentes indica uma distribuição mundial do mosquito nos trópicos há mais de 200 anos. (MAHMOOD, 2006). Os primeiros casos reconhecidos de dengue grave, antigamente chamada de dengue hemorrágica, foram identificados nas Filipinas e Tailândia durante epidemias na década de 1950. Nos últimos anos houve um grande aumento na transmissão da doença, principalmente em áreas urbanas e semi-urbanas. (WHO, 2014).

Estudos sugerem que anualmente ocorram 390 milhões de casos de infecções de dengue, sendo que cerca de 96 milhões apresentam algum tipo de manifestação clínica. (BHATT et al., 2013). Além disso, estima-se que cerca de 4 bilhões de pessoas, em 128 países estão sujeitas à infecção pelo vírus. (BRADDY et al., 2012). No Brasil, durante o ano de 2016 foram registrados mais de 1 milhão e 500 mil casos prováveis de dengue, com uma incidência de mais de 730 casos para cada 100 mil habitantes. (BRASIL, 2017a). De janeiro a abril de 2017, foram registrados mais de 113 mil casos prováveis de dengue, sendo que a região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis (32,9%) em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (27,5%), Centro-Oeste (22,1%), Norte (14,0%) e Sul (3,6%). (BRASIL, 2017e).

Não há tratamento específico para a dengue, sendo os cuidados voltados para a melhora dos sintomas, hidratação e repouso. Usualmente os analgésicos, como paracetamol, são utilizados para a redução da febre e dores nas articulações, porém, o ácido acetilsalicílico e o ibuprofeno são desaconselhados devido ao risco de sangramentos. (BRASIL, 2016c).

No Brasil, a prevenção da doença pode ser feita com uma vacina introduzida no ano de 2016, chamada Dengvaxia[®], uma vacina tetravalente recombinada e atenuada com eficácia de aproximadamente 65% produzida pelo laboratório Sanofi Pasteur. Até o momento, a vacina está sendo distribuída pelo Sistema Único de Saúde (SUS) apenas em cidades brasileiras com alta incidência de casos, para crianças e adultos entre 9 e 45 anos, faixa etária considerada segura para administração. (DENG VAXIA, 2015).

A vacina não é recomendada para gestantes, pois não há estudos específicos. No entanto, durante os ensaios clínicos foram também relatados desfechos adversos isolados, como casos de natimortos, morte intrauterina e aborto espontâneo. (DENG VAXIA, 2015).

2.2 *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) pertence à família Culicidae, da ordem Diptera, composta por mosquitos e pernilongos. Esta família destaca-se pela presença de, em sua grande maioria, espécies hematófagas e transmissoras de doenças mortais como a dengue e a febre amarela. (FUNASA, 2001; SENHORINI, 2010).

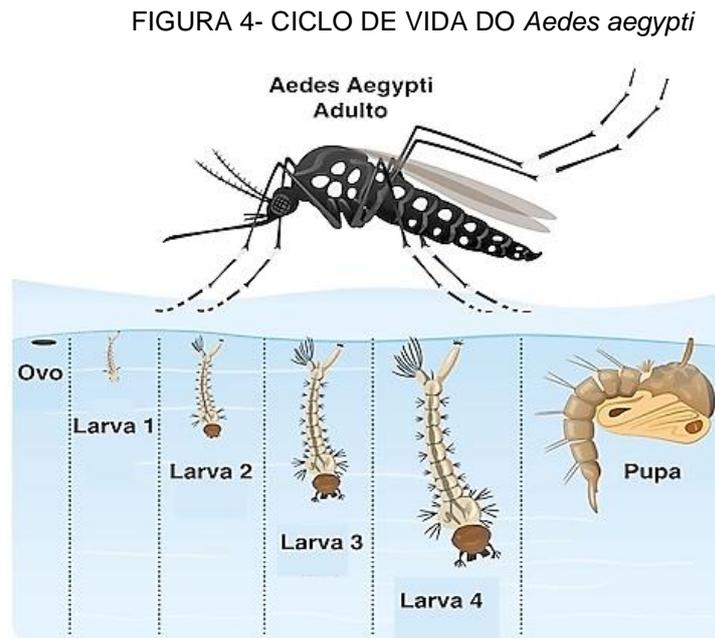
Esta espécie, de hábitos doméstico e diurno é originária da África e adapta-se bem em regiões de clima tropical e subtropical. Ocorre em todo o mundo, com exceção da Europa, e sua proliferação nas áreas urbanas está diretamente associada a falta de sistemas eficazes no controle e combate do mosquito vetor da dengue. (TELES, 2009; SENHORINI, 2010).

O controle da disseminação das doenças relacionadas ao *A. aegypti* consiste principalmente na eliminação dos criadouros do mosquito, impedindo que os ovos cheguem à fase adulta. (JANSEN; BEEBE, 2010).

Outra estratégia utilizada no país é o controle químico, no qual inseticidas, como organofosforados e piretroides, são pulverizados nos locais suspeitos. Porém, esta estratégia pode levar não somente ao surgimento de população resistente, como também à contaminação humana e/ ou ambiental. (ISMAN, 2000; TELES, 2009).

2.2.1 Ciclo de vida do *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* é uma espécie doméstica que apresenta seu ciclo de vida em quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 4), sendo os três primeiros estágios aquáticos. (FUNASA, 2001; DIVE, 2008; BESERRA et al., 2009).



FONTE: <https://www.tuasaude.com/ciclo-de-vida-do-aedes-aegypti/>

O ciclo aquático do *A. aegypti* é influenciado pelo tipo e qualidade dos reservatórios de água. Sua reprodução ocorre preferencialmente em reservatórios de águas limpas e paradas, porém, devido a sua capacidade de adaptação, podem se desenvolver em locais com condições menos propícias, como os esgotos a céu aberto. (BESERRA et al., 2010).

2.2.1.1 Ovo de *Aedes aegypti*

Os ovos são fusiformes e medem aproximadamente 1 mm de comprimento (Figura 5). As fêmeas colocam seus ovos nas paredes dos depósitos que servem como criadouros, próximos à lâmina da água. No momento da postura os ovos são brancos, porém adquirem cor negra nas primeiras 24 horas. (DIVE, 2008; TELES, 2009).

São capazes de resistir a longos períodos de seca (até 18 meses) e eclodir após contato com a água. Esta condição permite que os ovos sejam transportados a grandes distâncias, em recipientes secos, tornando-se assim, o principal meio de dispersão do inseto. (FUNASA, 2001; TELES, 2009).

FIGURA 5 - OVOS DE *Aedes aegypti*



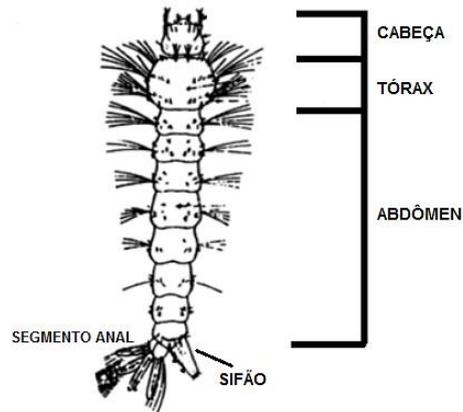
FONTE: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/galeria/data/images1/65.jpg>

2.2.1.2 Larva de *Aedes aegypti*

As larvas vivem na água, subindo frequentemente à superfície para respirar e alimentando-se de substâncias orgânicas, bactérias, fungos e protozoários. Não resistem a longos períodos sem alimentação, águas poluídas e luz intensa. (DIVE, 2008; TELES, 2009).

A duração da fase larval, em condições favoráveis de temperatura (25 a 29°C) e alimentação, pode chegar a 10 dias, podendo se prolongar por algumas semanas. Mudam de tamanho quatro vezes, sendo essas mudas consideradas os estágios larvais. Após o 4º estágio as larvas se transformam em pupas (3 a 4 dias). (DIVE, 2008).

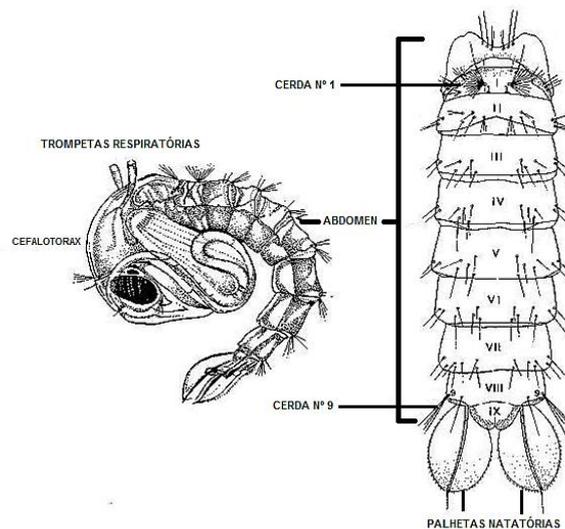
A larva é composta de cabeça, tórax e abdômen, o qual é dividido em oito segmentos, sendo que no último encontra-se o segmento anal e o sifão respiratório (Figura 6).

FIGURA 6 - LARVA DE *Aedes aegypti*

FONTE: Adaptado de MONTEIRO (2014)

2.2.1.3 Pupa de *Aedes aegypti*

Durante esta fase não se alimentam, utilizando a energia armazenada na fase larvária. A pupa é dividida em cefalotórax e abdômen (Figura 7) tendo o formato de uma vírgula. Tem um par de tubos respiratórios ou trombetas, que atravessam a água e permitem a respiração. Nesta etapa, sofrem as últimas transformações para a formação do adulto. Após 2 a 3 dias, emerge o adulto. (DIVE, 2008).

FIGURA 7 - PUPA DE *Aedes aegypti*

FONTE: Adaptado de DIVE (2008)

2.2.1.4 Adulto de *Aedes aegypti*

Na fase adulta, o mosquito já formado alimenta-se de néctar e sucos vegetais, fontes de carboidratos para os processos metabólicos, até a fase de acasalamento. Após o acasalamento, a fêmea necessita de sangue (fonte proteica) para a maturação dos ovos. Assim, a busca por este alimento ocorre normalmente durante o dia, com picos de maior atividade ao amanhecer e pouco antes do entardecer. Pode alimentar-se mais de uma vez entre duas posturas, principalmente quando são perturbadas durante o repasto. (DIVE, 2008; TELES, 2009).

As oviposições ocorrem geralmente no final da tarde. A fêmea grávida é atraída para recipientes escuros, sombreados, úmidos ou com água limpa, com superfícies ásperas nas quais depositam os ovos. Em cada postura a fêmea distribui seus ovos em vários recipientes, de preferência artificiais como pneus, latas, garrafas e floreiras, que acumulam água da chuva. (DIVE, 2008).

O tamanho médio do mosquito adulto é de 5 mm, sendo de coloração amarronzada, com anéis brancos nas pernas e um desenho prateado em forma de lira na parte dorsal do tórax e escamas branco-prateadas no corpo (Figura 8). (DIVE, 2008).

FIGURA 8 - MOSQUITO *Aedes aegypti* NA FASE ADULTA



FONTE: www.ioc.fiocruz.br

2.3 PESTICIDAS

Os pesticidas são substâncias químicas usadas para controlar ou matar a população de algumas pragas, como fungos, bactérias, insetos ou plantas indesejáveis que afetam a área agrícola. (GUILHERME et al., 2000; MARASCHIN, 2003).

Devido ao grande número de compostos químicos empregados como pesticidas, podem ser classificados quanto a sua estrutura química, como os organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretrinas, triazinas, sulfoniluréias, benzimidazóis, ditiocarbamatos, derivados de glicina e fenoxiacéticos; e quanto ao organismo-alvo a ser controlado, como os inseticidas para controle de insetos, os herbicidas para controle de ervas daninhas e os fungicidas para controle de fungos. (MARASCHIN, 2003).

O uso de pesticidas sintéticos para o controle de pragas teve início a partir do ano de 1939, quando Paul Muller descobriu as propriedades inseticidas do DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano), sintetizado em 1874 pelo químico alemão Zeidler. Nas décadas de 1940 e 1950 as indústrias químicas passaram a produzir várias outras substâncias que eram utilizadas principalmente como inseticidas, sendo na sua maioria organoclorados. (MARASCHIN, 2003).

No Brasil, os pesticidas organofosforados são amplamente utilizados no combate a endemias, como no controle da dengue, febre amarela e doença de Chagas. (LIMA et al., 2006). Porém, apesar de promover resultados efetivos, a utilização contínua favorece a intoxicação de organismos não alvos, do homem e do ambiente, além de propiciar o surgimento de população de insetos resistentes. (MACORIS et al., 2003; OCAMPO et al., 2011).

Devido a preocupação com o potencial tóxico dos pesticidas sintéticos e o surgimento de insetos resistentes, métodos alternativos para o controle de vetores mais seguros e eficazes têm sido investigados, principalmente utilizando plantas que possuem bioativos com atividades larvicida e/ou inseticida. (CORRÊA; SALGADO, 2011).

Uma alternativa ao uso de inseticidas sintéticos seria a utilização de plantas que apresentam em sua composição química metabólitos secundários, que compõem a própria defesa contra, principalmente, os insetos herbívoros. Esses metabólitos poderiam ser usados com a proposta de eliminar outros insetos, como os vetores de

doenças. (KIM et al., 2003; MENEZES, 2005). Dentre os compostos secundários que possuem atividade biológica, destacam-se os alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais. (CASTRO, 2004).

Diversos óleos essenciais apresentam propriedades antimicrobiana, antitumoral, fungicida e inseticida. (ALCÂNTARA; YAMAGUCHI; VEIGA JÚNIOR, 2010; DEKKER et al., 2011; BUSHRA; TARIQ, 2014; GALLARDO; PICOLLO; MOUGABURE-CUETO, 2015). Podem atuar diretamente no controle do *Aedes aegypti* promovendo repelência, inibição da alimentação, inibição da oviposição, inibição do crescimento, alterações morfogénéticas, alterações do sistema hormonal, alterações no comportamento sexual, esterilização de adultos, mortalidade na fase imatura ou adulta, entre outros. (ISMAN, 2000; DIETRICH et al., 2011).

Muitos trabalhos demonstram atividades repelente ou larvicida de óleos essenciais de diferentes espécies, como as dos gêneros *Cymbopogon spp.*, *Eucalyptus spp.* e *Ocimum spp.* (FURTADO et al., 2005; MENEZES, 2005; LUCIA et al., 2009; NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010; GOVINDARAJAN et al., 2013). Os óleos essenciais são misturas complexas de constituintes voláteis, como os terpenoides e os fenilpropanoides, os quais individualmente podem ou não apresentar bioatividade. (PANDEY et al., 2013; DIAS; MORAES, 2014).

No entanto, devido as suas propriedades físico-químicas, os óleos essenciais apresentam-se como substâncias voláteis e de fácil oxidação, características que reduzem seu tempo de ação quando aplicado em sua forma pura, resultando na necessidade de várias reaplicações do produto. (MENEZES, 2005; GONSALVES et al., 2009). Assim, a utilização de óleos essenciais como pesticida exige o desenvolvimento de formulação adequada para sua veiculação, com o objetivo de protegê-los contra condições ambientais desfavoráveis e aumentar seu tempo de ação. (GONSALVES et al., 2009; SOUZA; FERRAZ-FREITAS; OLIVEIRA, 2016).

2.3.1 Formulações pesticidas

As substâncias com propriedade pesticida normalmente não são apropriadas para a aplicação na forma pura, pois costumam apresentar imiscibilidade em água, instabilidade química, podendo ser também de difícil manuseio, armazenamento e aplicação, sendo necessária sua utilização em formulações que melhorem estas características. (HERZFELD; SARGENT, 2011).

Em geral, uma formulação de pesticida eficiente deve apresentar não apenas atividade biológica, mas também ser segura para o ambiente e para quem manuseia o produto. Sua escolha deve ser fundamentada nos riscos do uso de cada produto, na praticidade de aplicação dependente da praga a ser atingida e na efetividade de controle da mesma. (HERZFELD; SARGENT, 2011; MASUDA, 2011).

Como exemplos dessas formulações podemos citar as emulsões concentradas, as suspensões concentradas, os pós secos e molháveis, as iscas e as suspensões de microencapsulados. (MASUDA, 2011).

As emulsões concentradas são formulações homogêneas contendo uma substância ativa líquida, emulsionante e um ou mais solventes pouco solúveis, que quando misturados com a água, formam emulsões. Apresentam ampla versatilidade de uso, sendo empregado no controle de pragas agrícola, ornamental e de jardim, silvicultura, processamento de alimentos e pragas da saúde pública. (HERZFELD; SARGENT, 2011).

Nas suspensões concentradas as partículas sólidas estão finamente divididas e espalhadas no líquido, sem que haja miscibilidade, sendo necessária sua agitação constante. Estas formulações apresentam, devido a utilização de espessantes, uma elevada viscosidade durante o armazenamento e uma boa fluidez depois de agitadas, mesmo a baixas temperaturas. (TADROS, 1990).

As suspensões concentradas apresentam como vantagem a substituição de solventes pela água, o que reduz os riscos de fitotoxicidade e facilita a sua preparação. O principal inconveniente é a impossibilidade de utilização para todas as substâncias ativas, pois é necessário que tenham uma fraca solubilidade e grande estabilidade na água. (HERZFELD; SARGENT, 2011).

Os pós secos e os molháveis são compostos de partículas sólidas finamente moídas de um material adsorvente impregnado com a substância ativa. Os pós secos são aplicados por polvilhamento, enquanto os molháveis são dispersos em água antes do uso. Apresentam como principais desvantagens a irritação cutânea, ocular e respiratório do manipulador. (HERZFELD; SARGENT, 2011).

As iscas consistem da mistura de uma substância ativa com alimento ou outra substância atrativa, destinada a atrair o alvo desejado ou a ser ingerida por ele. São de fácil manejo, porém, deve-se ter a precaução do uso em ambientes com animais domésticos e crianças, pela possibilidade de intoxicação. (SANTOS, 2000; HERZFELD; SARGENT, 2011).

Nas suspensões de microencapsulados, micropartículas contendo as substâncias ativas estão suspensas num líquido, para aplicação após diluição em água. A microencapsulação de substâncias pesticidas promove a melhora na liberação das mesmas, previne a degradação ambiental e reduz a dose de aplicação, a toxicidade aquática e a volatilização, mostrando-se uma alternativa viável para o controle eficiente e econômico de pragas. (SOPEÑA; MAQUEDA; MORILLO, 2009; MASUDA, 2011).

2.4 MICROPARTÍCULAS

A tecnologia de liberação modificada de fármacos envolve uma ampla variedade de sistemas que visam otimizar a velocidade e o sítio de liberação dos fármacos, resultando na redução da toxicidade, otimização do benefício clínico e o aumento da adesão ao tratamento. São exemplos desses sistemas os lipossomas, os revestimentos entéricos, os sistemas transdérmicos, as micropartículas e as nanopartículas. (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; COIMBRA, 2010; NADAL, 2016).

As micropartículas poliméricas são muito estudadas devido a sua versatilidade de uso, disponibilidade dos materiais encapsulantes e variados métodos de obtenção, tendo aplicação em diversas áreas, como a agroquímica, a farmacêutica e a alimentícia. (SUAVE et al., 2006; NADAL, 2016).

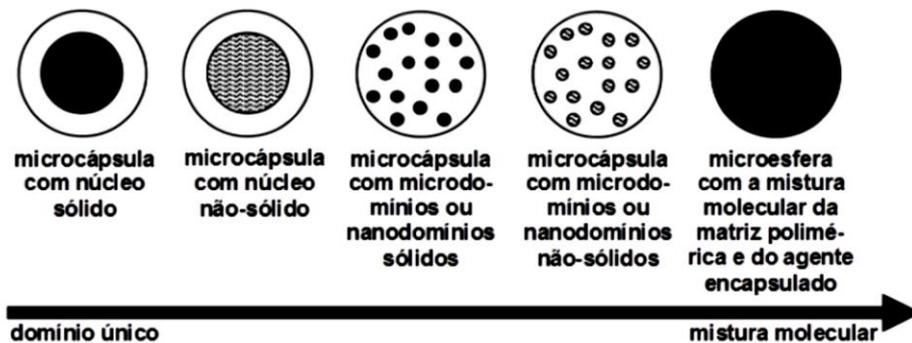
A microencapsulação permite separar incompatibilidades entre os componentes de uma mesma formulação, proteger contra condições ambientais desfavoráveis, mascarar gosto e odor e reduzir a toxicidade das substâncias encapsuladas. Na indústria farmacêutica, as micropartículas podem melhorar a manipulação de pós coesivos, dispersar substâncias pouco solúveis em água, reduzir ou eliminar irritação gástrica e programar ou controlar a liberação de fármacos. (SILVA et al., 2003; KUMAR et al., 2011).

No setor agropecuário, as micropartículas são utilizadas na produção de pesticidas (herbicidas, inseticidas e parasiticidas) com o objetivo de reduzir o risco de intoxicação por parte do usuário e melhorar sua eficácia, minimizando as perdas do agrotóxico por degradação, evaporação e lixiviação, redução das taxas de aplicação e fitotoxicidade. (BRASILEIRO, 2011; HIRSCH, 2011). Assim, alguns pesticidas sintéticos foram microencapsulados, como o Diclorvós (PAULA; PAULA; BEZERRA, 2006), o Temefós (BADAWI et al., 2015), cipermetrina (DALL'AGNOL et al., 2016) e o

Bacillus thuringiensis (PRABAKARAN; PADMANABHAN; BALARAMAN, 2001), além de óleos essenciais com atividade larvicida. (PANT et al., 2012; SENHORINI et al., 2012; LÓPEZ et al., 2014).

As micropartículas normalmente são sólidas e de formato esférico, com diâmetro médio entre 1 e 100 μm . (STORPIRTIS et al., 2009; MASCARENHAS, 2010). De acordo com sua estrutura podem ser classificadas em microesferas e microcápsulas. As microesferas são sistemas matriciais no qual a substância ativa (fármaco) está dispersa na matriz polimérica, enquanto as microcápsulas são um sistema reservatório, no qual a substância ativa encontra-se envolta por uma parede polimérica externa (Figura 9). (SUAVE et al., 2006; STORPIRTIS et al., 2009).

FIGURA 9 - MODELOS DE ESTRUTURAS DAS MICROPARTÍCULAS



FONTE: Adaptado de BIRNBAUM; BRANNON-PEPPAS (2003)

Diversos métodos permitem microencapsular um material ativo, e a escolha do método mais adequado depende do tipo de material a ser encapsulado, de sua aplicação e do mecanismo de liberação desejado. (SUAVE et al., 2006; STORPIRTIS et al., 2009). Além disso, para ser considerado ideal, o processo de microencapsulação deve ser simples, rápido, reprodutível, de baixo custo, facilmente transponível para a escala industrial e ser pouco dependente da solubilidade do fármaco e do material encapsulante. (BRASILEIRO, 2011; NADAL, 2016).

O método de gelificação iônica é um processo que resulta na formação de micropartículas gelatinosas através da interação entre polímeros e polieletrólitos ou outros polímeros de cargas opostas que se ligam ionicamente, formando um complexo estável. (BENAVIDES et al., 2016; DIAS et al., 2017). É uma técnica realizada em condições brandas de temperatura e agitação, e que dispensa o uso de solventes

orgânicos, permitindo o encapsulamento de substâncias que degradariam sob outras condições. (NEVES et al., 2014; BENAVIDES et al., 2016).

As micropartículas obtidas pela técnica de gelificação iônica são normalmente produzidas com polímeros naturais como o alginato, a quitosana e a pectina, resultando em um produto final biocompatível e biodegradável. (PATEL et al., 2017).

2.4.1 Micropartículas flutuantes

Micropartículas flutuantes foram inicialmente desenvolvidas para melhorar a liberação de fármacos no estômago. Por serem menos densas que o fluido gástrico, essas micropartículas mantem-se flutuando no conteúdo gástrico, no qual o fármaco é liberado lentamente durante um maior período de tempo. (CHOI et al., 2002; YAO et al., 2012, MALAKAR et al., 2014). Neste sentido, pesquisas utilizando micropartículas flutuantes como carreadores de antimicrobianos, antivirais e anti-inflamatórios foram desenvolvidas nos últimos anos. (MUKUND; KANTILAL; SUDHAKAR, 2012; MALAKAR et al., 2014; DEY et al., 2016).

A partir do modelo das micropartículas flutuantes para liberação gástrica controlada, outros estudos foram conduzidos para utilização desse sistema para carregamento de pesticidas, principalmente larvicidas. (PRABAKARAN; PADMANABHAN; BALARAMAN, 2001; PAULA et al., 2012). A formulação de micropartículas flutuantes contendo larvicidas visa, além da proteção do ativo e redução do contato humano, a manutenção do ativo por mais tempo na superfície da água, pois as larvas sobem frequentemente para respirar e se alimentar, o que permite maior exposição ao produto. (PRABAKARAN; PADMANABHAN; BALARAMAN, 2001; PAULA et al., 2012).

As micropartículas flutuantes são usualmente produzidas utilizando matrizes lipídicas (ABOUELATTA et al., 2015), polímeros hidrofílicos (SELVAKUMARAN; MUHAMAD, 2014; PANDA et al., 2016), óleos mineral e/ou vegetal (MUKUND; KANTILAL; SUDHAKAR, 2012; DEY et al., 2016) e agentes formadores de gás carbônico (CHOI et al., 2002; PANDA et al., 2016), os quais permitem a formação de partículas de baixa densidade. (PETCHSOMRIT; SERMKAEW; WIWATTANAPATAPEE, 2013; KAJALE; CHANDEWAR, 2016).

A obtenção das micropartículas flutuantes pode ser realizada pelos métodos de emulsificação e evaporação do solvente e gelificação iônica. (MALAKAR et al.,

2014). No método de emulsificação e evaporação de solvente, o fármaco dissolvido em uma solução orgânica volátil contendo o polímero é emulsionada em uma fase aquosa, sendo o solvente da fase interna removido posteriormente pelo uso de calor, resultando em micropartículas porosas. (YAO et al., 2012; MUKUND; KANTILAL; SUDHAKAR, 2012; NADAL, 2016).

A técnica de gelificação iônica, por sua vez, utiliza agentes formadores de gás carbônico dispersos na solução polimérica, como o carbonato de cálcio e o bicarbonato de sódio, os quais liberam gás carbônico em meio ácido, produzindo bolhas de ar ou poros na matriz, reduzindo a densidade das partículas. (CHOI et al., 2002; KRISHNAN et al., 2010; YAO et al., 2012).

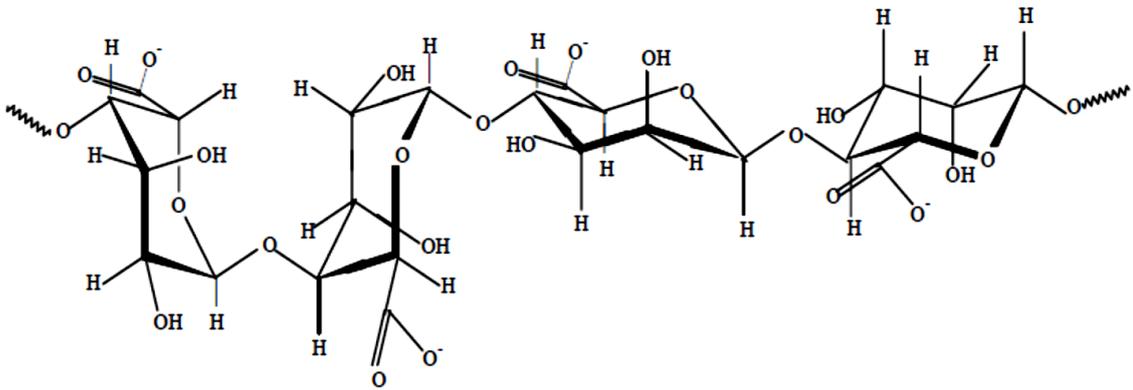
2.4.2 Polímeros utilizados para a produção de micropartículas flutuantes

Diferentes polímeros podem ser utilizados para a produção de micropartículas flutuantes, como os alginatos, goma arábica, goma de cajueiro, goma xantana, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e quitosana, os quais são preferencialmente usados devido a sua biodegradabilidade e baixa toxicidade. (MUKUND; KANTILAL; SUDHAKAR, 2012; PANDA et al., 2016).

2.4.2.1 Alginato de sódio

O alginato de sódio é um polímero natural, biodegradável e biocompatível formado pela ligação de resíduos dos ácidos β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G). Esses resíduos são arrançados em blocos ao longo da cadeia, sendo que os resíduos podem estar dispostos em diferentes proporções ou ordem (Figura 10). Assim, os blocos podem apresentar-se como sequência homopolimérica (MM e GG) ou como sequências alternadas de MG, sendo que a composição e sequência de disposição dos blocos são responsáveis pelas propriedades físicas dos alginatos, parâmetros importantes na formação das micropartículas. (CHAN; LEE; HENG, 2002; SIMPSON et al., 2004; LEE et al., 2006; REIS et al., 2006).

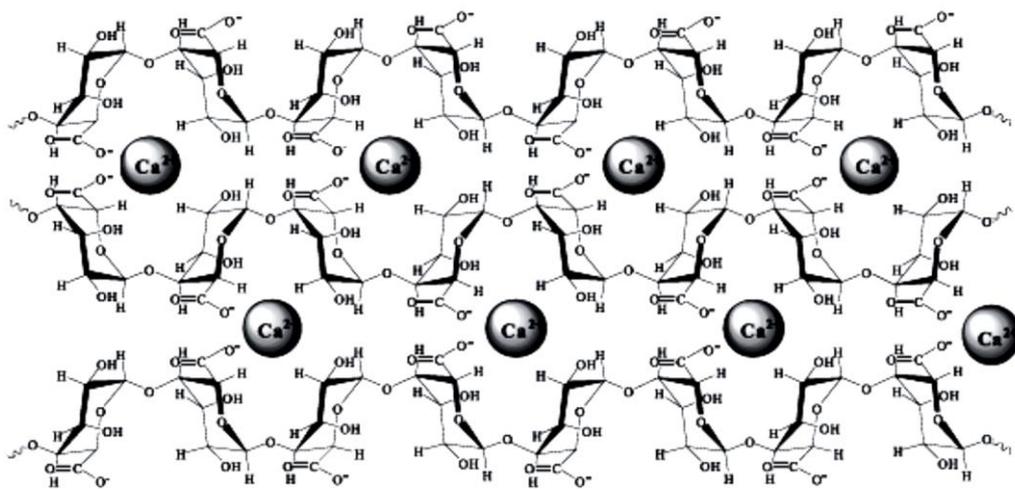
FIGURA 10- ESTRUTURA QUÍMICA DO ALGINATO



FONTE: Adaptado de RACOVITA et al. (2007)

Apresentam comportamento aniônico em meio aquoso, e em presença de cátions multivalentes, comumente Ca^{+2} ou Ba^{+2} , formam hidrogéis pouco solúveis, devido a ligação cruzada destes íons com os grupos carboxílicos dos resíduos de ácido gulurônico. Esta ligação forma uma rede tridimensional, num modelo chamado de “caixa de ovo”, no qual os íons divalentes encontram-se nas cavidades eletronegativas do alginato (Figura 11). (FUNDUEANU et al., 1998; SIMPSON et al., 2004; KAWAGUTI; SATO, 2008; DOHNAL; STEPANEK, 2010).

FIGURA 11 - LIGAÇÃO ENTRE AS CADEIAS HOMOPOLIMÉRICAS ATRAVÉS DOS ÍONS CÁLCIO SITUADOS ENTRE OS GRUPOS COM CARGA NEGATIVA



FONTE: Adaptado de KAWAGUTI E SATO (2008)

Diferentes substâncias já foram encapsuladas utilizando o alginato de sódio como matriz polimérica, como óleos, fármacos, células e proteínas. (SCHOUBBEN et

al., 2010). Devido a grande porosidade da membrana formada, as micropartículas de alginato são utilizadas para encapsular materiais bioativos, pois permitem a passagem de pequenas moléculas necessárias para mantê-los viáveis. (LÓPEZ; FERNANDEZ, 2001).

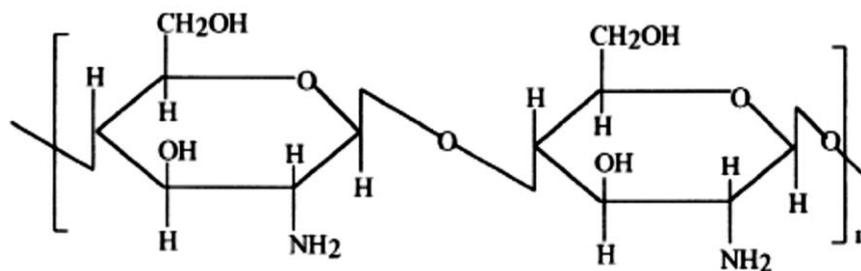
As micropartículas de alginato-cálcio apresentam excelente propriedade bioadesiva, principalmente quando associadas à quitosana, mostrando um grande potencial para liberação de fármacos na mucosa gástrica. (TU et al., 2005; WITTAYA-AREEKUL; KRUEENATE; PRAHSARN, 2006).

No entanto, micropartículas flutuantes de alginato apresentam baixa eficiência de encapsulação, menor tempo de flutuação e rápida liberação do ativo, o que pode ser ajustado com a incorporação de adjuvantes como óleos e agentes formadores de gases, ou a utilização de uma mistura de polímeros. (BERA et al., 2015).

2.4.2.2 Quitosana

A quitosana é um biopolímero linear, hidrofílico, de natureza catiônica, obtido a partir da desacetilação da quitina, principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos (Figura 12). Pode também ocorrer naturalmente na parede celular de alguns tipos de fungos, como os pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes* (KUMAR, 2000; KUMIRSKA et al., 2010).

FIGURA 12 - ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITOSANA



FONTE: Adaptado de KUMAR (2000)

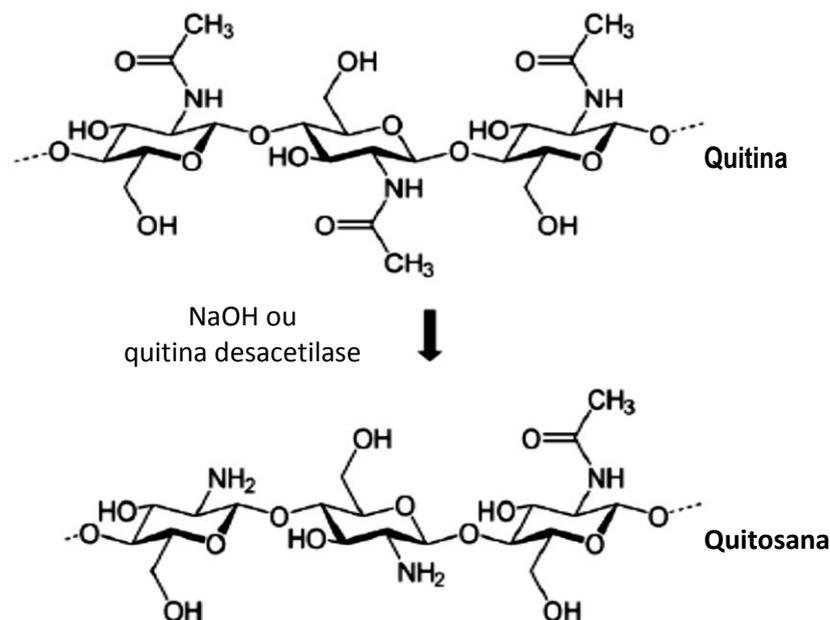
A desacetilação da quitina ocorre por alcalinização do meio com utilização de NaOH concentrado ou por hidrólise enzimática, na presença de quitina deacetilase (Figura 13). (KUMAR, 2000; ZARGAR; ASGHARI; DASHTI, 2015). Este processo muitas vezes não é completo, resultando em um polímero parcialmente desacetilado

constituído por unidades que sofreram a reação (D-glicosamina) e liberaram os grupos amino, e de unidades que não foram alteradas (N-acetil-D-glicosamina). Estas unidades variam ao longo da cadeia, tanto em quantidade quanto em distribuição (SIGNINI; CAMPANA-FILHO, 2001).

O grau de desacetilação (GD) da quitosana, que é o parâmetro que indica a porcentagem de unidades monoméricas que contêm grupos amino, influencia nas propriedades físico-químicas, como solubilidade, pKa e viscosidade. (KUMAR, 2000; POKHREL; YADAV; ADHIKARI, 2015).

Devido a sequência não homogênea de unidades monoméricas, diferentes amostras de quitosana apresentam diferentes características quanto ao grau de desacetilação, viscosidade e massa molar, que podem influenciar nas propriedades finais do polímero (CANELLA; GARCIA, 2001).

FIGURA 13 - DESACETILAÇÃO DA QUITINA



FONTE: Adaptado de ZARGAR; ASGHARI; DASHTI (2015)

A quitosana apresenta-se pouco solúvel em água, porém, na presença de soluções aquosas de ácidos orgânicos, como o acético e inorgânicos como o clorídrico, ocorre a protonação dos grupos amino, que leva ao aumento da repulsão eletrostática entre as cadeias e a solvatação em água, formando soluções viscosas.

(SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; SANTOS et al., 2009). Nestas condições, a quitosana expõe sua natureza policatiónica (RINAUDO, 2006).

A quitosana é um polímero que apresenta biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e mucoadesividade, sendo utilizada em diferentes áreas, como na produção de cosméticos, medicamentos, produtos alimentícios e no desenvolvimento de biomateriais. (POKHREL; YADAV; ADHIKARI, 2015).

A associação alginato-quitosana, na forma de micropartículas, mostrou-se interessante para utilização no transporte de proteínas, fármacos e outras substâncias através da mucosa gastrointestinal ou nasal, atuando como um sistema de liberação específico nestes locais. (CRCAREVSKA; DODOV; GORACINOVA, 2008; SPINETTO et al., 2008).

Além da associação com o alginato, a quitosana também foi utilizada em outras misturas de polímeros e compostos, como argilas, goma de cajueiro, goma arábica, Aerosil®, gelatina e etilcelulose para melhorar as características físico-químicas de micro e nanopartículas. (HUA; YANG; WANG, 2010; KANG; DAI; KIM, 2012; PAULA et al., 2012).

2.4.2.3 Goma Arábica

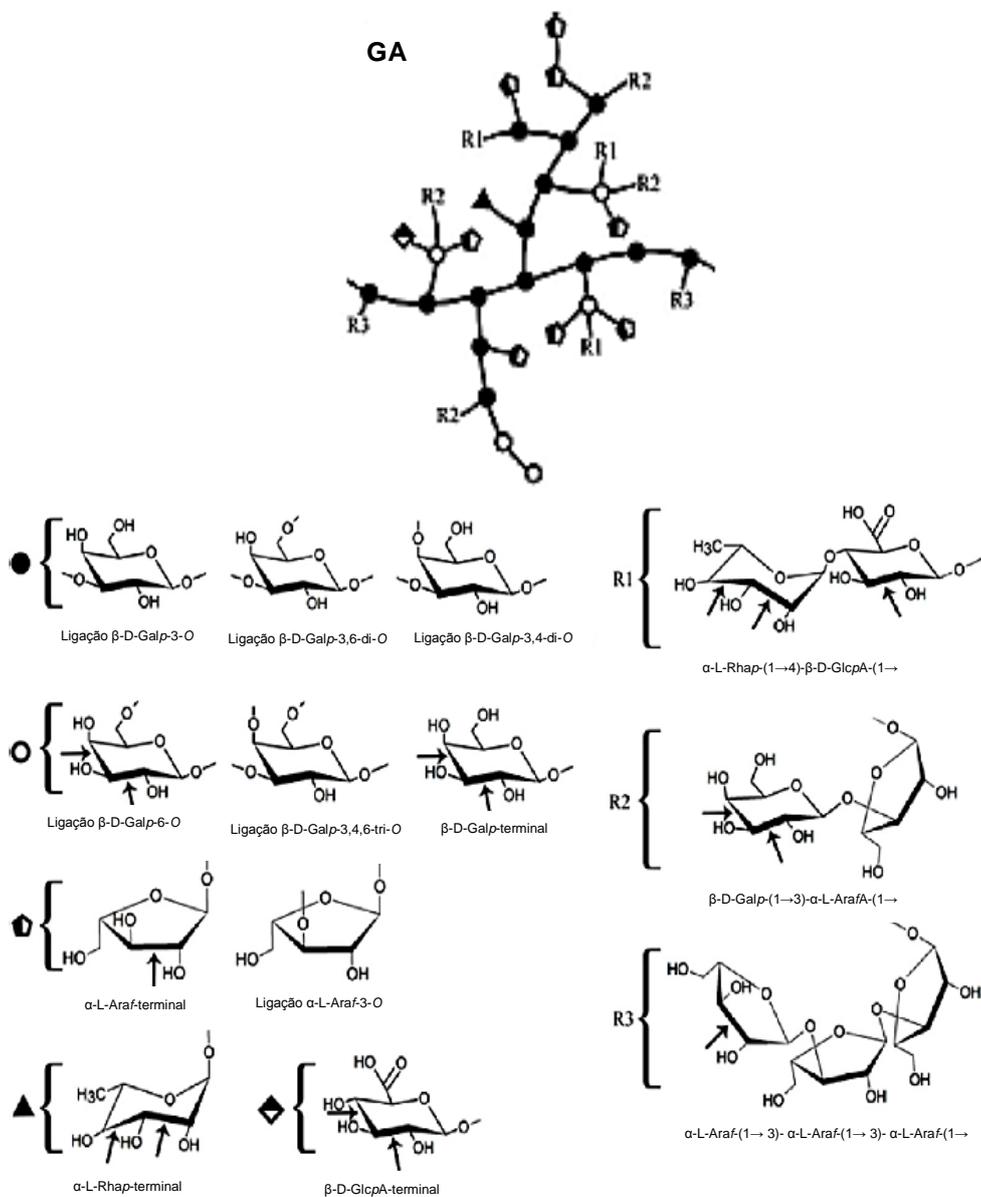
A goma arábica, ou goma acácia é o exsudato gomoso dessecado dos troncos e dos ramos da *Acacia senegal* ou de outras espécies africanas de acácia, como a *Acacia seyal*. (ALI; ZIADA; BLUNDEN, 2009; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). É um heteropolissacarídeo complexo, altamente ramificado, contendo subunidades polissacarídicas e proteicas. Sua cadeia principal é formada por unidades de galactose e ramificações secundárias de arabinose, ramnose, galactose e ácido glucurônico, sendo a porção proteica encontrada ligada covalentemente a esta estrutura (Figura 14). (McNAMEE; O'RIORDAN; O'SULLIVAN, 1998; SOUZA, 2014; CHOPRA et al., 2015).

Pode ser dividida em três frações dependendo do conteúdo relativo de proteína para polissacarídeo: fração arabinogalactano (AG), fração glicoproteica (GP) e fração arabinogalactana-proteína (AGP). A fração AG, composta por uma cadeia principal de β -D-galactopiranosose com ligação 1 \rightarrow 3 e cadeias laterais compostas por duas a cinco unidades de β -D-galactopiranosose ligadas a cadeia principal por ligações

1→6 representa cerca de 85% da composição total da goma arábica. (ANDRADE, 2013; SILVA, 2014).

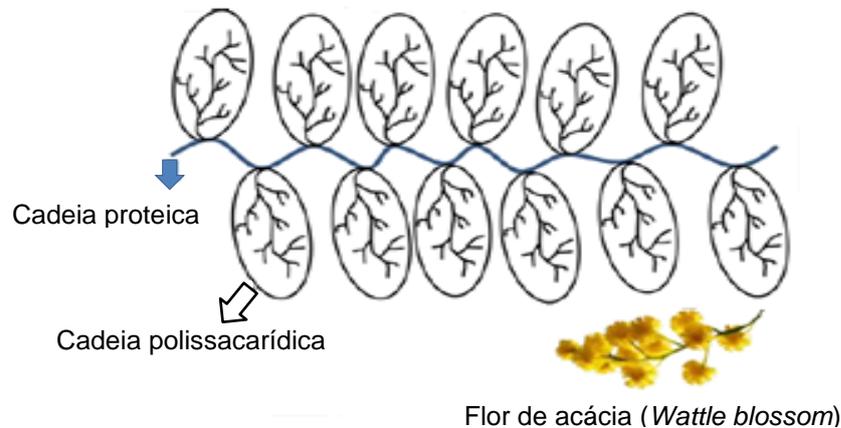
A fracção AGP é considerada responsável pelas propriedades emulsionantes da goma arábica, e é formada por unidades polissacarídicas dispostas ao longo da cadeia proteica, formando uma estrutura tipo *wattle blossom* (flor de acácia) (Figura 15) e confere à macromolécula um carácter anfifílico que favorece sua adsorção nas interfaces óleo-água (BOUYER et al., 2012; SILVA, 2014).

FIGURA 14 - ESTRUTURA QUÍMICA DA GOMA ARÁBICA



FONTE: Adaptado de CORNELSEN et al. (2015)

FIGURA 15 - MODELO WATTLE BLOSSOM PROPOSTO PARA ESTRUTURA DA AGP



FONTE: Adaptado de SILVA (2014)

Usualmente é utilizada como emulsificante, estabilizante e agente suspensor nas indústrias alimentícia e farmacêutica. (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; NAYAK; DAS; MAJI, 2012). No entanto, devido as suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade, alta solubilidade em água, baixa viscosidade e boa compatibilidade com outras gomas, amidos, carboidratos e proteínas, a goma arábica tem sido explorada para a encapsulação de diferentes substâncias, como aromatizantes, probióticos e óleos essenciais. (KRISHNAN; KSHIRSAGAR; SINGHAL, 2005; MENDES, 2012; PIACENTINI et al., 2013; CHUN, KIM; CHO, 2014).

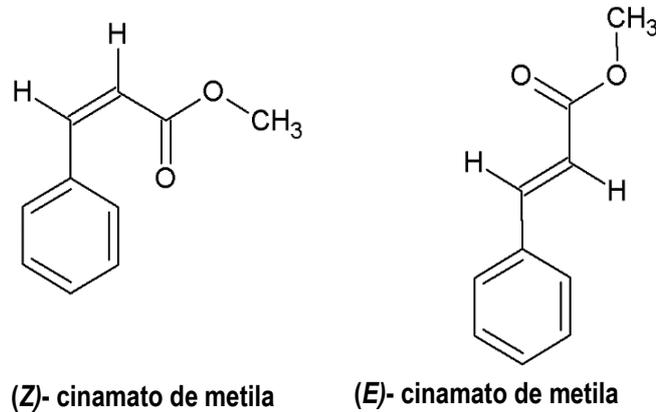
2.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO CINAMATO DE METILA, DO LINALOL E DA MISTURA CM-L

2.5.1 Cinamato de Metila

O cinamato de metila, também denominado metil-3-fenilpropanoato ou 2-ácido propenoico, 3-fenil, metil éster é um monoterpene, estruturalmente semelhante ao ácido cinâmico e caracteriza-se pelo seu odor forte e aromático. (FAHELBUM; JAMES, 1977; PARANAGAMA et al., 2001; BATHIA et al., 2007).

Apresenta fórmula molecular geral $C_{10}H_{10}O_2$ (Figura 16), massa molar de 162,19 g/mol e é encontrado em duas conformações isoméricas: (E)-cinamato de metila (CAS 1754-62-7) e (Z)-cinamato de metila (CAS 19713-73-6). (PARANAGAMA et al., 2001; BATHIA et al., 2007).

FIGURA 16 - ESTRUTURA QUÍMICA DO CINAMATO DE METILA



FONTE: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

Possui coloração branca quando em forma de cristais, e amarelo claro em estado líquido, ponto de ebulição de 262°C, ponto de fusão de 33°C e solubilidade em água de 387,1 mg/L à temperatura de 25°C. (BATHIA et al., 2007). É uma substância hidrofóbica, volátil e instável, características associadas a outros terpenos. (PARANAGAMA et al., 2001).

O cinamato de metila pode ser encontrado naturalmente em frutas, como o morango (LUNKENBEIN et al., 2006) e em algumas espécies dos gêneros *Ocimum spp.* (DEKKER et al., 2011) e *Cinnamomum spp.* (ALI et al., 2010; PERETTO, 2014). Devido ao seu aroma e sabor de morango, é comumente utilizado na indústria cosmética, em formulações de fragrâncias, perfumes finos, xampus e sabonetes. (BHATIA et al., 2007; SHARMA, 2011).

É também utilizado na indústria de alimentos, sendo aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como agente aromatizante e pelo Conselho Europeu como produto alimentício. (BATHIA et al., 2007). Devido a sua ação inibidora da tirosinase, enzima parcialmente responsável pela degradação dos alimentos, pode ser utilizado na forma de filmes comestíveis para aumentar a vida de prateleira dos mesmos. (BATHIA et al., 2007; HUANG et al., 2009), mantendo suas características nutricionais e aspectos sensoriais. (PERETTO et al., 2014).

É uma substância considerada segura quando avaliada quanto à toxicidade aguda, irritação cutânea e genotoxicidade (BATHIA et al., 2007), sendo excretada pela urina na forma de ácido hipúrico e ácido glucurônico. (FAHELBUM; JAMES, 1977).

As atividades biológicas de óleos essenciais contendo cinamato de metila como componente majoritário já foram investigadas, como os trabalhos de Ali e

colaboradores (2010) e Resende (2013) que verificaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Cinnamomun* sp. e *Lychnophora pinaster*, respectivamente, evidenciando a eficácia na inibição do desenvolvimento de bactérias Gram positivo e Gram negativo, de leveduras e fungos filamentosos. Alguns estudos com espécies ricas em cinamato de metila estão descritos no Quadro 2.

A bioatividade do cinamato de metila isolado também já foi estudada. Lima e colaboradores (2014), verificaram sua atividade antiespasmódica com efeito miorreaxante, promovida pela inibição da tirosino quinase. Freitas (2014) demonstrou as atividades hipoglicêmica e hipolipidêmica. Além disso, também inibe a síntese de lipídeos e a adipogênese por atenuar fatores de transcrição adipogênicos. (CHEN et al., 2012).

QUADRO 2 - BIOATIVIDADE DE ESPÉCIES RICAS EM CINAMATO DE METILA

Espécie	Atividade	Referência
<i>Alpinia galanga</i>	hipoglicemiante	AKHTAR; KHAN; MALIK, 2002
<i>Ocotea quixos</i>	antioxidante, antibacteriana, antifúngica	BRUNI et al., 2004
<i>Ocimum americanum</i>	larvicida	CAVALCANTI et al., 2004
<i>Kaempferia galanga</i>	antimicrobiana	TEWTRAKUL et al., 2005
<i>Zanthoxylum alatum</i>	nematicida	KIM; SEO; PARK, 2011
<i>Alpinia nieuwebhuizii</i> <i>Alpinia ligulata</i>	antimicrobiano	YUSOFF et al., 2011
<i>Zanthoxylum alatum</i>	antifúngico	PRAKASH et al., 2011a
<i>Ocimum gratissimum</i>	antioxidante, antimicrobiana	PRAKASH et al., 2011b
<i>Ocimum micranthum</i>	antinociceptiva, anti-espasmódica, anti-inflamatória	PINHO et al., 2012
<i>Ocimum americanum</i>	antifúngico	VIEIRA et al., 2014

FONTE: O Autor (2015)

O cinamato de metila apresenta atividades antimicrobiana (HUANG et al., 2009), antifúngica (EL-SHIEKH et al., 2012), anti-inflamatória (PINHO et al., 2012) e pesticida, com atividade nematicida contra *Bursaphelenchus xylophilus*, responsável pela doença da murcha de pinheiros (KONG et al., 2007), inseticida (PETERSON et

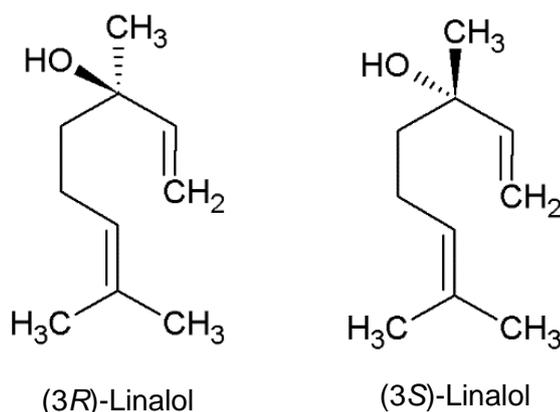
al., 2000) e repelente sobre mosquitos adultos *Aedes aegypti*, reduzindo o pouso das fêmeas do mosquito. (DEKKER et al., 2011; ANNIES et al., 2012).

2.5.2 Linalol

O linalol (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol) é um monoterpreno alcoólico de cadeia aberta muito importante na indústria de aromas. Ocorre naturalmente sob a forma de dois estereoisômeros, o (3*R*)-linalol (CAS 126-91-0) e o (3*S*)-linalol (CAS 126-90-9) (Figura 17), os quais possuem odores distintos. O isômero levorrotatório (lincareol) possui um aroma de lavanda e flores frescas, enquanto o dextrorrotatório (coriandrol) possui um cheiro herbáceo, frequentemente descritas como uma nota cítrica. (TELES, 2009; RODRIGUES, 2010).

Apresenta-se como um líquido amarelado, com solubilidade em água de aproximadamente 1,5 g/L à temperatura de 25 °C, fórmula molecular geral C₁₀H₁₈O e massa molar de 154,53 g/mol. (OECD, 2002; LAPCZYNSKI et al., 2008). É muito utilizado na indústria cosmética, como fixador de fragrâncias, aromatizante em xampus e sabonetes e também em produtos de limpeza, como detergentes. (LAPCZYNSKI et al., 2008; CAMARGO; VASCONCELOS, 2014).

FIGURA 17 - ESTRUTURA QUÍMICA DO LINALOL



FONTE: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

O linalol pode ser encontrado em diversas espécies da flora brasileira, como o pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), a tangerina (*Citrus reticulata* Blanco), a bergamota (*Citrus bergamia* Risso), o jasmim (*Jasminum auriculatum* Vahl), a lavanda

(*Lavandula dentata* L.), o manjeriço (*Ocimum gratissimum* L.) e o coentro (*Coriandrum sativum* L.). (CAMARGO; VASCONCELOS, 2014).

Camargo e Vasconcelos (2014) fizeram uma revisão sobre os efeitos biológicos do linalol, os quais encontram-se dispostos no Quadro 3. O linalol apresenta atividade sobre o sistema cardiovascular, atuando como agente hipotensor e vasorrelaxante (RODRIGUES, 2010; ANJOS et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2014) e redutor de colesterol e triglicerídeos. (JUN et al., 2014). É utilizado ainda como ansiolítico, sedativo e anticonvulsivante. (BRUM et al., 2001; HELDWEIN et al., 2014; CHENG; SHEEN; CHANG, 2015).

O linalol demonstrou também atividades antimicrobiana (PEREIRA, 2009; AMAZONAS, 2012), anti-inflamatória (WU et al., 2014), antiespasmódica (REKHA et al., 2014), antioxidante, anti-leishmaniana (FABRI et al., 2012), repelente (ANNIES et al., 2012) e larvicida. (SOUZA et al., 2007; TELES, 2009).

De acordo com Bickers et al. (2003), o linalol apresenta baixa toxicidade aguda oral (CL₅₀ para roedores entre 2200 e 3920 mg/kg) e dermatológica (CL₅₀ para coelhos de 5619 mg/kg), além de não demonstrar efeito genotóxico ou mutagênico em 16 ensaios *in vitro* separados realizados.

QUADRO 3 - EFEITOS BIOLÓGICOS DO LINALOL

Tecido e/ou espécie	Efeitos	Referência
Artéria aorta isolada de ratos	Hipotensão, bradicardia e vasorrelaxamento	SIQUEIRA et al. (2014)
Cultura de células de ratos	Hipotrigliceridemia	JUN et al. (2014)
Peixes	Sedação e Anestesia	HELDWEIN ET al. (2014)
Pele de seres humanos	Dermatite de contato	BJORKMAN et al. (2014)
Cultura de micro-organismos	Antimicrobiano	YANG; CHAO; LIU (2014)
Células cancerígenas de seres humanos	Apoptose de células tumorais. Anticâncer	CHANG; SHEN (2014)
Mosquitos vetores da malária	Controle dos vetores da malária	NYASEMBE et al. (2014)
Artéria mesentérica isolada de ratos	Hipotensão e vasorelaxamento	ANJOS et al. (2013)
Cultura de células e tecido cerebral de ratos	Antidepressivo. Não causa proteção ou dano ao DNA	COELHO et al. (2013)
Ratos	Ansiolítico e sedativo	TANKAM; ITO (2013)
Ratos	Sedativo e sonífero	ZU et al. (2013)
Pele de seres humanos	Linalol oxidado causa dermatite de contato	CHRISTENSSON et al. (2012)
Ratos	Reduz tolerância e dependência a morfina	HOSSEINZADEH et al. (2012)
Músculo liso da traqueia isolada de ratos	Antiespasmódico	ROCHA (2011)
Cultura de neurônios isolados de ratos	Antinociceptivo em dor aguda e crônica	BATISTA (2010)
Cultura de bactérias	Inibe o crescimento bacteriano	SOKOVIĆ et al. (2010)
Ratos	Diminui ansiedade e agressividade	LINCK et al. (2010)
Artéria aorta, músculo liso vascular de ratos	Hipotensão, bradicardia e antiespasmódico	RODRIGUES (2010)
Neuropatia em nervo ciático de ratos	Anti-inflamatório e antinociceptivo	BURGOS (2009)
Frequência cardíaca, pressão arterial de humanos	Modula níveis de cortisol. Alívio do stress	HOFERL; KRIST; BUCHBAUER (2006)
Células humanas	Antinociceptivo	PEANA et al. (2006)
Saliva de seres humanos	Antibacteriano	ALVIANO et al. (2005)
Seres humanos	Sedativo, calmante e bradicárdico	KURODA et al. (2005)
Cerebelo isolado de ratos e neurônios da retina de peixes	Atua nas correntes iônicas	NARUSUYE et al. (2005)
Ratos	Analgésico e antinociceptivo	PEANA et al. (2004)
Pele de ratos	Linalol oxidado causa dermatite de contato	SKOLD et al. (2004)
Cultura de macrófagos de ratos com <i>Leishmania amazonensis</i>	Antileishmanial. Lise celular de macrófago infectado	ROSA et al. (2003)
Pele de ratos	Linalol oxidado tem potencial alérgico	BASKETTER et al. (2002)
Cultura de células do córtex cerebral de ratos	Anticonvulsivante. Interfere na transmissão glutamatérgica	BRUM et al. (2001)

FONTE: Adaptado de CAMARGO e VASCONCELOS (2014)

2.5.3 Mistura CM-L

A mistura CM-L é composta pelo cinamato de metila (CM) e linalol (L) na proporção de 1:4. (MARQUES et al., 2014).

Em estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa (ANNIES et al., 2012), a mistura CM-L demonstrou atividade repelente frente aos mosquitos *Aedes aegypti*, bem como atividade inseticida contra aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*) e escorpião amarelo (*Tityus serrulatus*), efeitos esses que não foram observados com seus componentes separadamente. Os resultados obtidos nesses estudos apontam para uma possível ação aditiva ou sinérgica.

A mistura CM-L encontra-se em depósito de pedido de patente no Instituto Nacional da Propriedade Intelectual (INPI) sob o número BR 1020130305880, e no *International Bureau PCT/BR2013/000589*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético
- Agitador mecânico
- Balança analítica
- Banho-maria
- Centrífuga para tubos
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência dotado de detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD-UV)
- Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier
- Leitor de microplacas
- Metalizador
- Microscópico eletrônico de varredura
- Centrífuga para microtubos
- Estufa incubadora B.O.D
- Liofilizador
- RCT basic, Ika
- RW20 digital, Ika
- AR2140, Ohaus
- EEQ9074, Edutec
- Edutec
- Varian ProStar, modelo SYS-LC-240-E
- Nicolet iS10, Thermo Fisher Scientific
- Multiskan FC, Thermo Scientific
- IC-50 Ion Coater, Shimadzu
- SSX-550, Shimadzu
- Minispin Plus, Eppendorf®
- NT 708, Novatecnica
- VirTis, BenchTop Pro com Omnitronics™, SP Scientific

3.2 REAGENTES E SOLVENTES

3.2.1 Fármacos

- *E*-cinamato de metila - Padrão, grau de pureza 99%, Sigma Aldrich, Brasil
- Linalol - Padrão, grau de pureza \geq 97%, Sigma Aldrich, Brasil

3.2.2 Polímeros

- Alginato de sódio - Protanal LF 20/ 40, com viscosidade de 100 a 200 mPas e alto conteúdo de resíduos G (65 – 75%), FMC Bio Polymer
- Quitosana - grau de desacetilação > 80%, peso molecular > 40 kDa, Galena
- Dióxido de silício coloidal - Aerosil® 200, grau farmacêutico, Fagron

3.2.3 Água purificada

Para o desenvolvimento das micropartículas flutuantes e análises cromatográficas foi utilizada água ultrapura obtida pelo processo de osmose reversa com microfiltração (OS10LX, Gehaka, Brasil).

3.2.4 Outros reagentes e solventes

- Acetonitrila - grau UV/HPLC, Proquimios
- Ácido acético glacial - P.A, Synth
- Carbonato de cálcio - grau farmacêutico, Viafarma
- Carbonato de sódio - P.A, Vetec
- Cloreto de cálcio - P.A, diidratado, All Chemistry
- Etanol - P.A, Dinâmica
- Metanol - P.A, Vetec

- Sal marinho - Qingdao
- Monoestearato de sorbitano - Span® 60, Croda
- Sulfato de quinidina - Merck
- Sulfato de sódio - P.A, anidro, Vetec
- Polissorbato 80 - Tween® 80, Galena
- Sangue de carneiro - Newprov®
- Fosfato de potássio monobásico - P.A, Vetec
- Fosfato dissódico - P.A, Vetec

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

A pesquisa foi realizada em três etapas, sendo que na primeira, foi avaliada a toxicidade do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L (proporção 1:4). Para tanto foram realizados os ensaios de toxicidade *in vitro* frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach, a avaliação da atividade hemolítica sobre hemácias de carneiro, a avaliação da atividade alelopática sobre sementes de *Lactuca sativa* (alface) e a atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. Foram também observadas as alterações morfológicas nas larvas de *A. aegypti* submetidas ao tratamento com as amostras.

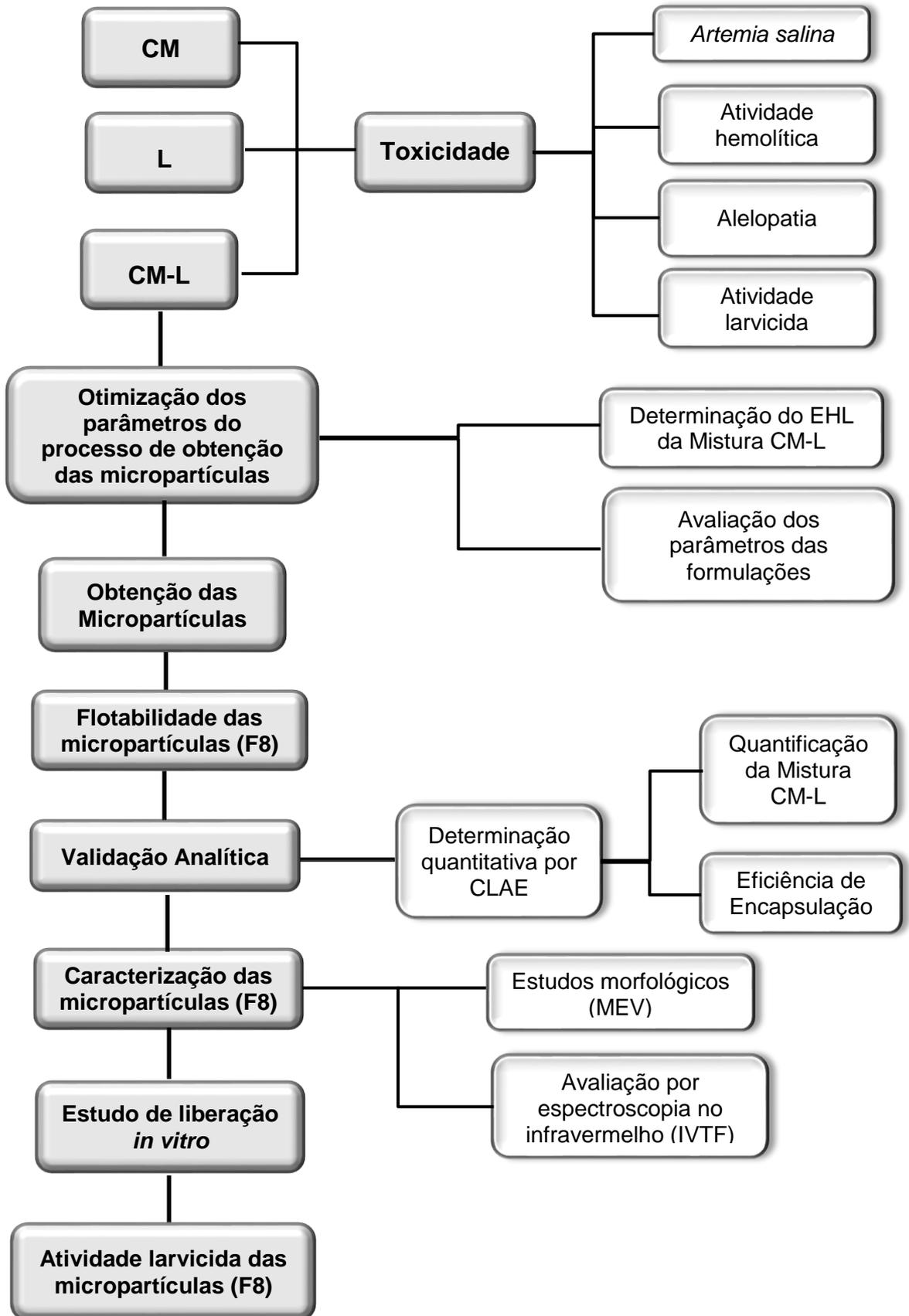
A segunda etapa da pesquisa consistiu na otimização dos parâmetros das formulações para obtenção das micropartículas flutuantes contendo a mistura CM-L. Foram avaliados o valor de EHL da mistura CM-L e as diferentes concentrações das matérias-primas utilizadas no processo de encapsulação.

Na terceira etapa, após definição dos parâmetros da formulação, as micropartículas flutuantes contendo a mistura CM-L foram obtidas por gelificação iônica e caracterizadas por meio de estudos morfológicos e espectroscópicos, e quanto a sua flotabilidade e perfil de liberação. Para a determinação quantitativa da mistura CM-L microencapsulada foi utilizado um método de cromatografia líquida de alta eficiência, previamente validado, avaliando a eficiência de encapsulação/incorporação do fármaco.

A avaliação da atividade larvicida das micropartículas flutuantes foi conduzida com larvas de *Aedes aegypti*, observando-se também as alterações morfológicas

ocasionadas pelas mesmas. As etapas descritas estão esquematizadas no fluxograma da Figura 18.

FIGURA 18 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PESQUISA



FONTE: O Autor (2017)

3.4 TESTES DE TOXICIDADE *in vitro*

3.4.1 Teste de toxicidade *in vitro* do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach

O ensaio foi conduzido conforme Meyer e colaboradores (1982) e Souza e colaboradores (2007) com adaptações. Foi utilizada água do mar artificial, preparada com 38 g de sal marinho e 1000 mL de água purificada. O pH foi ajustado com Na_2CO_3 para a faixa de 8-9.

Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) foram colocados em contato com a água do mar artificial e aerados por uma hora. Após este período, foram incubados em estufa incubadora B.O.D (Novatécnica), com temperatura entre 27 e 30 °C por 48 horas, com iluminação constante. Após a eclosão dos ovos, 10 náuplios foram transferidos para os tubos de ensaio utilizados para o teste.

Soluções-estoque na concentração de 5 mg.mL⁻¹ de CM, L e CM-L foram preparadas em água do mar artificial contendo 0,5% (m/v) de Tween[®] 80. As soluções-estoque foram transferidas para tubos de ensaio de maneira a obter amostras diluídas nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 125 e 150 µg.mL⁻¹. A concentração máxima de Tween[®] 80 nos tubos foi de 0,1% (m/v). O controle negativo consistiu de tubos com água do mar artificial contendo 0,1% (m/v) de Tween[®] 80. O controle positivo foi uma solução de sulfato de quinidina nas mesmas concentrações das amostras. O volume de todos os tubos foi ajustado com água do mar artificial para 5 mL. Após 24 horas realizou-se a contagem de náuplios mortos e vivos, com auxílio de lupa e iluminação incandescente.

Os valores de CL₅₀ e CL₉₀, bem como os seus intervalos de confiança (95%) e qui-quadrado, foram calculados pelo modelo Probit (FINNEY, 1971), utilizando o programa estatístico SPSS, versão 23.0. (IBM, 2015).

3.4.2 Atividade hemolítica do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L

A atividade hemolítica foi realizada conforme Banerjee e colaboradores (2008) com adaptações. Inicialmente sangue de carneiro foi lavado com solução tampão fosfato-salino pH 7,4 (PBS) (150 mM NaCl; 0,58 mM KH_2PO_4 e 3,4 mM Na_2HPO_4) e centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos, com descarte do sobrenadante. O processo

foi repetido até que o sobrenadante ficasse completamente incolor. Em seguida, a papa de hemácias obtida foi diluída a 2% (v/v) em PBS para uso no ensaio.

Uma solução-estoque de cada amostra foi preparada na concentração de 1mg.mL⁻¹, utilizando 100 µL de metanol para solubilizar as amostras e PBS para completar o volume. O controle para hemólise 100% consistiu de água deionizada, enquanto o controle negativo (branco) utilizado foi PBS contendo 100 µL de metanol.

Para o ensaio, foram utilizadas amostras nas concentrações de 10 µg.mL⁻¹; 50 µg.mL⁻¹; 100 µg.mL⁻¹ e 1000 µg.mL⁻¹, preparadas a partir das soluções-estoque. Foram transferidos 200 µL das amostras e dos controles para microtubos para centrifugação tipo Eppendorf® contendo 200 µL de hemácias a 2% (v/v). Os microtubos foram homogeneizados e incubados por 3 horas em estufa com temperatura controlada a 37 °C. Após o período de incubação, os microtubos foram centrifugados por 5 minutos a 3000 rpm em centrífuga para microtubos Minispin Plus (Eppendorf). O sobrenadante foi transferido para microplacas com 96 poços e a leitura das absorbâncias realizadas em leitor de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific) em comprimento de onda de 540 nm. O teste foi realizado em triplicata. A porcentagem de hemólise (%H) foi calculada utilizando-se a Equação (1), conforme Nogueira Sobrinho et al. (2016):

$$\%H = \frac{(Abs_A - Abs_B)}{(Abs_H - Abs_B)} * 100 \quad (1)$$

onde:

Abs_A é a absorção encontrada para as amostras

Abs_B é a absorção do controle de salina e

Abs_H a absorção do controle 100% hemólise

3.4.3 Atividade alelopática do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L

A avaliação da atividade alelopática foi realizada conforme Silva, Overbeck e Soares (2014) com adaptações. Foram verificados parâmetros iniciais na germinação e crescimento em laboratório.

Soluções-estoque das amostras foram preparadas na concentração de 1% (m/v) em água purificada contendo 1% (m/v) de Tween® 80. Para o ensaio, foram utilizadas amostras nas concentrações de 0,001%; 0,01%; 0,1% e 1% preparadas a partir das soluções-estoque diluídas em água purificada.

Para os bioensaios de germinação, placas de vidro (90 mm de diâmetro) esterilizadas, contendo papel filtro Whatman nº 6, receberam 5,0 mL de água purificada. Foram semeadas sobre cada disco de papel filtro, 50 sementes de *Lactuca sativa*, variedade *Grand rapids*, com quatro repetições para cada solução conforme Brasil (2009). Após a semeadura, foram distribuídas 3,0 mL da solução de cada concentração das amostras em dois papéis filtro colados no interior da tampa de cada placa com fita adesiva, evitando o contato direto com as sementes. (SILVA; OVERBECK; SOARES, 2014; SILVA FILHO et al., 2009).

As placas de vidro contendo as sementes foram fechadas e envolvidas com filme plástico e levadas para estufa incubadora B.O.D, com umidade relativa ($\pm 80\%$), temperatura de 25 °C e iluminação interna (160 W) constantes.

Diariamente foram contadas as sementes germinadas, tendo como critério a protusão radicular com no mínimo 2,0 mm de comprimento. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado por meio da Equação (2), conforme Hoffmann (2007) e Rosado et al. (2009):

$$IVG = \frac{G1}{N1} + \frac{G2}{N2} + \frac{G3}{N3} + \dots + \frac{Gn}{Nn} \quad (2)$$

Onde:

G1, G2, G3... Gn é o número de sementes germinadas

N1, N2, N3...Nn é o número de dias após a semeadura

A porcentagem de germinação (%G) é a relação entre o número de sementes tratadas germinadas e o número de sementes germinadas do controle.

Para os bioensaios de crescimento, as sementes foram semeadas como no teste de germinação, porém, somente após sete dias de germinação foram medidas a radícula e o hipocótilo das plântulas, conforme Macías, Castellano e Molinillo (2000).

Os dados obtidos foram sujeitos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott ($p < 0.05$), utilizando o programa Sisvar (FERREIRA, 2011).

3.4.4 Atividade larvicida do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L contra larvas de *Aedes aegypti*

A verificação da atividade larvicida da Mistura CM-L não encapsulada e seus componentes foi conduzida de acordo com o Guia para testes laboratoriais de larvicidas da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005) e Silva e colaboradores (2008).

Para obtenção das larvas, foram utilizados ovos de *A. aegypti*, espécie Rockefeller, providos pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Os ovos foram colocados em béquer plástico com capacidade de 500 mL contendo água livre de cloro, o qual foi levado para a incubadora B.O.D, com temperatura de (27 ± 2) °C e umidade relativa entre (80 ± 5) %. As larvas foram alimentadas com ração para peixes do período entre a eclosão dos ovos e o terceiro estágio. Para os testes foram utilizadas larvas no terceiro estágio.

Para o teste, soluções-estoque (5 mg.mL^{-1}) das amostras foram preparadas em água livre de cloro contendo 0,5% (m/v) de Tween[®] 80. As soluções-estoque foram transferidas para copos plásticos com capacidade de 120 mL contendo 20 larvas de *Aedes aegypti* em terceiro estágio, de maneira a obter 100 mL de amostras nas seguintes concentrações: $25 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$; $50 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$; $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$; $150 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$; $200 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$; $250 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$; $300 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$; $350 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$; $400 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $500 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os copos foram levados para incubadora B.O.D, com temperatura de (27 ± 2) °C, umidade relativa entre (80 ± 5) % e fotoperíodo de 12 horas. Após 24 horas, foram contadas o número de larvas vivas e mortas. O ensaio foi realizado em quadruplicata, tendo como branco 100 mL de água livre de cloro contendo 0,5% (m/v) de Tween[®] 80.

Os valores de CL_{50} e CL_{90} , intervalos de confiança (95%) e qui-quadrado foram calculados pelo modelo Probit (FINNEY, 1971), utilizando o programa estatístico SPSS, versão 23.0. (IBM, 2015).

3.4.4.1 Alterações morfológicas das larvas submetidas ao teste de atividade larvicida

Foram observadas e descritas as alterações morfológicas apresentadas pelas larvas de *A. aegypti* em resposta ao tratamento com cinamato de metila, linalol, mistura CM-L.

As larvas foram observadas em microscópio óptico (Olympus) e as imagens capturadas por câmera fotográfica (Nikon).

3.5 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES

3.5.1 Determinação do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) da mistura CM-L

O ensaio foi realizado segundo Zanin et al. (2002) e Fernandes et al. (2013). Emulsões contendo a mistura CM-L foram preparadas para um volume final de 20 mL, contendo 85% (m/m) de água purificada, 10% (m/m) da mistura CM-L e 5% (m/m) da mistura de tensoativos. Os valores das misturas de tensoativos variaram entre 7,79 e 12,94.

Os tensoativos foram colocados nas fases aquosas e oleosa conforme sua solubilidade. A fase aquosa foi aquecida a (75 ± 5) °C e a oleosa a (40 ± 1) °C em banho-maria. A fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa com agitação constante de 400 rpm por 15 minutos em agitador mecânico. As emulsões foram colocadas em tubos de ensaio, fechados com filme plástico e mantidas à temperatura ambiente. A estabilidade das emulsões foi avaliada após 24 horas pela análise macroscópica das mesmas (cor e aspecto visual).

Posteriormente, uma segunda série de emulsões foi preparada com um intervalo menor de EHL entre as duas emulsões mais estáveis da primeira série, repetindo-se o método. A estabilidade das emulsões foi avaliada no 1º, 30º e 60º dias após a manipulação por análise macroscópica das mesmas (cor e aspecto visual).

3.5.2 Avaliação dos parâmetros das formulações para obtenção das micropartículas flutuantes

Vários parâmetros das formulações para obtenção das micropartículas flutuantes foram alterados.

A otimização dos parâmetros das formulações desenvolvidas levou em consideração a estabilidade das emulsões primárias e a flotabilidade das micropartículas formadas. Isso permitiu a seleção dos parâmetros apropriados para a obtenção da formulação mais adequada para o transporte da mistura CM-L microencapsulada. A concentração de mistura CM-L a ser encapsulada foi definida por revisão de literatura.

A formulação inicial teve por base a proposta de Paula et al. (2012). Para o preparo das micropartículas, uma fase aquosa foi preparada dispersando o ALG e a GA em água purificada contendo Tween[®] 80. Esta fase foi mantida em aquecimento em banho-maria à 60 °C até completa hidratação dos polímeros. Em seguida, 5 mL de uma suspensão de CaCO₃ foi adicionada à fase aquosa. Em outro frasco foram pesados a mistura CM-L e o Spam[®] 60, os quais foram aquecidos em banho-maria à 60 °C por 1 minuto. Adicionou-se a esta fase Aerosil[®] 200, com homogeneização manual até completa adsorção da mistura CM-L. A fase aquosa foi vertida sobre a oleosa e agitada com auxílio de agitador mecânico em aproximadamente 750 rpm por 5 minutos. As proporções de matérias-primas utilizadas estão contidas na Tabela 1.

A emulsão formada foi gotejada sobre uma solução de 2% (m/v) de CaCl₂ contendo ácido acético 5% (v/v) com seringa de vidro (Artglass) e agulha 13 mm x 0,45 mm (Becton-Dickinson), na qual permaneceu por 30 minutos. Quando requerido, as micropartículas formadas foram transferidas para béquer contendo uma solução de quitosana previamente solubilizada em ácido acético 1% (v/v), na qual permaneceram por 30 minutos.

As micropartículas foram lavadas com água purificada e, após retirada do excesso de água, foram congeladas com nitrogênio líquido e liofilizadas por 4 horas em liofilizador Vir Tis BenchTop Pro (SP Scientific) com pressão a vácuo de 39 mm/hg e temperatura de -77,4°C. (Figura 19).

TABELA 1 - PARÂMETROS PARA A PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS

	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F4 (%)	F5 (%)	F6 (%)	F7 (%)	F8 (%)
ALG	1	1	1	1	1	1	1	1
GA	-	-	-	-	-	1	2	1
CaCO₃	1	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Span[®] 60	4	4	4	4	4	4	4	4
Tween[®] 80	1	1	1	1	1	1	1	1
CM-L	10	10	10	10	10	10	10	10
Aerosil[®] 200	-	-	-	-	-	-	-	1
Água	Qs							
Quitosana	-	-	0,5	1	2	0,5	0,5	0,5

FONTE: O Autor (2016)

LEGENDA:

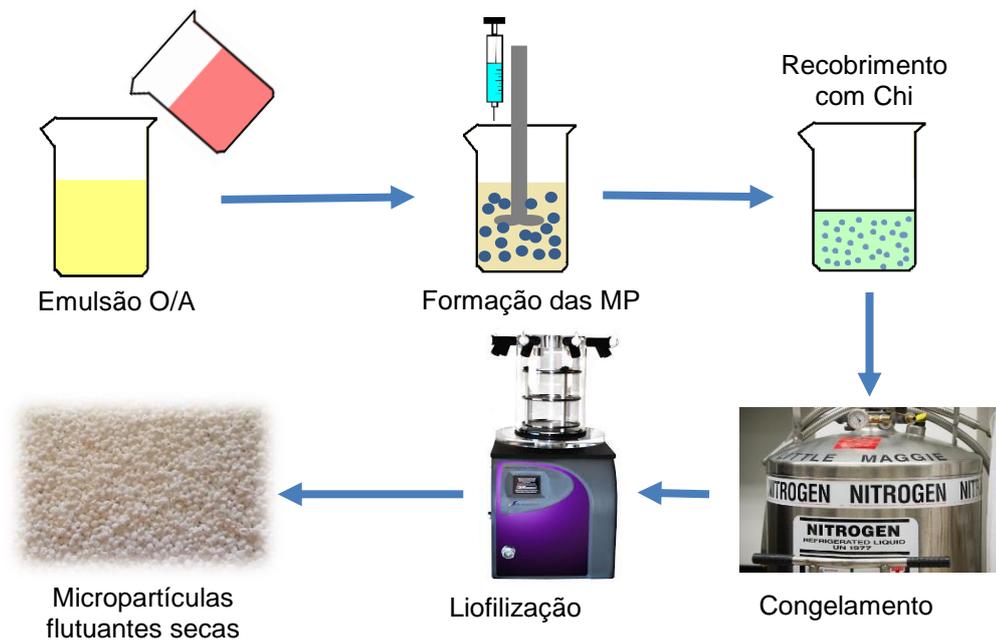
ALG = alginato de sódio

GA = goma arábica

CaCO₃ = carbonato de cálcio

CM-L = cinamato de metila e linalol em combinação (proporção 1:4)

FIGURA 19 - ESQUEMA PARA O PREPARO DE MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES



FONTE: O Autor (2016)

3.6 OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS FLUTUANTES CONTENDO A MISTURA CM-L

As micropartículas poliméricas flutuantes contendo mistura CM-L foram preparadas conforme o item 3.5.2. O mesmo procedimento foi adotado para a obtenção de micropartículas sem a mistura CM-L (branco).

As micropartículas produzidas foram caracterizadas por análises morfológicas e espectroscópicas. Foram realizados também ensaios de flotabilidade, quantidade de mistura CM-L encapsulada, eficiência de encapsulação e perfil de liberação *in vitro*. As micropartículas flutuantes contendo a mistura CM-L foram submetidas ao bioensaio com as larvas de *Aedes aegypti*.

3.7 FLOTABILIDADE

A flotabilidade das micropartículas foi avaliada visualmente pela observação de 20 micropartículas liofilizadas colocadas em um béquer contendo 20 mL de água destilada, à temperatura ambiente, com agitação ocasional. As micropartículas foram mantidas no béquer até que todas afundassem, ou por um período de 15 dias. O teste foi realizado em triplicata.

As leituras foram realizadas nos tempos 0, 12, 24, 36, 48 ... n horas até atingir as condições acima mencionadas, utilizando-se da Equação (3) para verificar a porcentagem de micropartículas flutuantes:

$$F(\%) = \left(\frac{MF}{MT} \right) * 100 \quad (3)$$

Onde:

MF é o número de micropartículas flutuantes no tempo definido

MT o número total de micropartículas

3.8 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE MISTURA CM-L MICROENCAPSULADA POR CLAE/DAD-UV

A concentração de mistura CM-L microencapsulada foi determinada a partir dos ensaios de quantificação desenvolvidos em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE/DAD-UV) Varian ProStar, modelo SYS-LC-240-E dotado de detector de arranjo de diodos, conforme os parâmetros estabelecidos na Tabela 2.

TABELA 2 - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DA MISTURA CM-L POR CLAE/DAD/UV

Características	Descrição
Detecção	UV ($\lambda = 210 \text{ nm}$)
Fluxo	0,8 mL.min ⁻¹
Coluna	Zorbax Eclipse XDB-C18, 4,6 x 250 mm, 5 μm
Fase móvel	ACN:H ₂ O (65 : 35 v/v)
Volume de injeção	20 μL

FONTE: O Autor (2016)

NOTA: UV = ultra-violeta

ACN = acetonitrila

Previamente, o método passou pelo processo de validação analítica, conforme descrito a seguir.

3.8.1 Validação do método analítico para a quantificação da Mistura CM-L microencapsulada

A validação do método de quantificação por CLAE/DAD-UV foi realizada segundo a Resolução R.E. nº 899, de 29 de maio de 2003 (ANVISA, 2003) e a *International Conference on Harmonisation* (ICH, 2005). Os parâmetros avaliados foram especificidade, linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez. Os ensaios foram realizados em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência dotado de detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD-UV) Varian ProStar, modelo SYS-LC-240-E. O sistema é equipado com um módulo de liberação de solvente (ProStar 230), um auto-injetor (ProStar 410) e um detector de arranjo de diodos (ProStar 335). Os dados foram coletados e analisados utilizando um *software* de cromatografia Varian Star Workstation (Walnut Creek, CA, USA).

a) Especificidade

Micropartículas flutuantes preparadas sem a Mistura CM-L (branco) foram trituradas em gral de vidro e imersas em solvente composto de ACN:H₂O (65:35 v/v). O solvente foi filtrado em funil de vidro contendo papel de filtro e, antes de ser injetado no cromatógrafo, filtrado novamente em filtro Chromafil® Xtra com 0,45 µm de abertura dos poros (Macherey-Nagel). As amostras foram analisadas nas mesmas circunstâncias experimentais das amostras na presença da Mistura CM-L.

b) Linearidade, Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Para o estudo da linearidade, foram elaboradas curvas analíticas em triplicata, com sete pontos de concentração para os padrões cinamato de metila e linalol, utilizando a fase móvel ACN:H₂O (65:35 v/v) como solvente. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados. Para a construção das curvas de calibração, foram feitas soluções-padrão de cinamato de metila e linalol (1 mg.mL⁻¹), as quais foram diluídas sequencialmente para a obtenção de soluções nas concentrações 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg.mL⁻¹ para o cinamato de metila; e 5, 15, 25, 50, 100, 150, 200 e 240 µg.mL⁻¹ para o linalol.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir da inclinação (S) e do desvio padrão da média de três curvas de calibração (DP), usando os fatores multiplicadores sugeridos pela norma ICH (2005), conforme demonstrado nas Equações 4 e 5:

$$LD = 3,3 \times \frac{DP}{S} \quad (4)$$

$$LQ = 10 \times \frac{DP}{S} \quad (5)$$

Onde:

LD é o limite de detecção

LQ é o limite de quantificação

DP é o desvio padrão médio

S é o coeficiente angular (inclinação da reta)

c) Precisão

Para verificar a precisão do método foram avaliadas a repetibilidade, precisão interdias e precisão entre-analistas do método.

Para avaliação da repetibilidade, três concentrações diferentes de cada substância da mistura CM-L (5, 20 e 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o cinamato de metila; e 15, 50 e 230 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o linalol) foram analisadas em triplicata em um único dia, totalizando nove determinações para cada substância, sendo o resultado expresso em termos de desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação percentual (CV%) intra-dia, calculado conforme Equação (6).

$$CV (\%) = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

DP é o desvio padrão

CMD a concentração média determinada

A determinação da precisão intermediária foi realizada comparando os resultados obtidos para análises interdias e entre-analistas. Para a determinação da precisão interdias foram realizadas análises, em triplicata e em dois dias consecutivos, de uma amostra contendo concentrações diferentes das substâncias presentes na mistura CM-L (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o cinamato de metila; e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o linalol). O teste foi realizado nas mesmas condições cromatográficas pré-determinadas.

A avaliação da precisão entre-analistas de uma amostra contendo concentrações diferentes das substâncias presentes na mistura CM-L (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o cinamato de metila; e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o linalol) foi realizada em triplicata, com analistas diferentes, e sob as mesmas condições cromatográficas previamente definidas.

d) Exatidão

A exatidão foi determinada por meio do método de recuperação, no qual uma quantidade conhecida de soluções-padrão de cinamato de metila (12,5 mg.g^{-1}) e

linalol (50 mg.g^{-1}) foram adicionadas a uma emulsão utilizada para o preparo das micropartículas. Para a recuperação das substâncias foram pesados 1 g da emulsão, sobre a qual foram adicionados 5 mL de etanol. Após homogeneização, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado por membrana $0,45 \mu\text{m}$ e recolhido em balão volumétrico de 10 mL, sendo seu volume completado com etanol. O sobrenadante foi diluído sucessivamente em balões volumétricos de 10 mL para obter soluções nas concentrações de 12,5; 25 e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o cinamato de metila; e 50, 100 e $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o linalol. O volume final foi ajustado com a fase móvel. As soluções foram elaboradas em triplicata e os resultados expressos como porcentagem de recuperação.

e) Robustez

Para a avaliação da robustez, as três concentrações das substâncias foram submetidas a diferentes condições de fluxo da fase móvel e de temperatura, e avaliadas em triplicata. O fluxo foi modificado de $0,8 \text{ mL.min}^{-1}$ para $0,75 \text{ mL.min}^{-1}$ e a proporção de solventes ACN:H₂O de 65:35 (v/v) para 70:30 (v/v). Os resultados de cada parâmetro foram analisados por meio do DPR e comparados com os valores obtidos para a condição padrão.

3.8.2 Determinação da quantidade de Mistura CM-L nas micropartículas

Uma amostra de 25 mg de micropartículas liofilizadas foi triturada em gral de vidro e adicionada de aproximadamente 10 mL de solvente ACN:H₂O (65:35 v/v). O solvente foi transferido para balão volumétrico de 25 mL, com filtração prévia em funil de vidro contendo papel filtro. O volume do balão foi completado com o mesmo solvente. Em seguida, a amostra foi filtrada novamente por filtro Chromafil® Xtra com $0,45 \mu\text{m}$ de abertura dos poros (Macherey-Nagel) e a concentração das substâncias determinada por CLAE/DAD-UV em comprimento de ondas de 210 nm. A quantificação foi realizada em triplicata, frente ao método analítico previamente validado nas faixas de concentração estabelecidas.

3.8.3 Eficiência de encapsulação

A Eficiência de Encapsulação (EE%) foi calculada a partir da diferença entre as massas das substâncias presentes na Mistura CM-L inicialmente adicionada à formulação e as massas presentes nas micropartículas, conforme Equação (7). A EE% foi calculada separadamente para cada substância da Mistura CM-L.

$$EE(\%) = \frac{\text{massa de CM ou L nas micropartículas}}{\text{massa de CM ou L na formulação}} \times 100 \quad (7)$$

3.9 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROPARTÍCULAS

3.9.1 Análises morfológicas e de superfície

As micropartículas flutuantes liofilizadas foram medidas com paquímetro digital (Jomarca). A avaliação morfológica e de superfície foi realizada no microscópico eletrônico de varredura SSX-550 Superscan (Shimadzu). As micropartículas foram levadas à estufa a vácuo TE 395 (Tecnal) e fixadas em suporte metálico. Após, foram submetidas à metalização com ouro no equipamento IC-50 Ion Coater (Shimadzu). As micrografias foram obtidas em diferentes magnificações, após a visualização das amostras, empregando voltagens de aceleração de 10 ou 15 kV. O registro das imagens ocorreu por meio da utilização do software específico.

3.9.2 Avaliação por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

As micropartículas flutuantes foram analisadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) em equipamento Nicolet iS10, com cristal de diamante, utilizando 32 varreduras na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} . As micropartículas pulverizadas foram colocadas diretamente sobre o leitor Smart Omni-Sampler. Os espectros obtidos por IVTF das micropartículas flutuantes foram avaliados frente aos espectros dos padrões de linalol e cinamato de metila, e dos polímeros de partida.

3.10 ESTUDO DE LIBERAÇÃO *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* foi realizado de acordo com Paula e colaboradores (2012) com modificações. Uma amostra de 200 mg de micropartículas liofilizadas foi colocada em béquer contendo 100 mL de água purificada. O sistema foi mantido à temperatura ambiente, com agitação ocasional. Uma alíquota de 1 mL do meio (água purificada) foi retirada em tempos pré-determinados, com reposição do meio em igual quantidade. As amostras foram analisadas em CLAE/DAD-UV em comprimento de ondas de 210 nm, nas condições descritas no item 3.8. O teste foi realizado em triplicata.

3.11 ATIVIDADE LARVICIDA DA MISTURA CM-L MICROENCAPSULADA

Foi realizado de acordo com Paula e colaboradores (2012). Em recipiente plástico com capacidade para 120 mL, foram colocados 100 mL de água livre de cloro e 20 larvas de *A. aegypti* em terceiro estágio. Foram transferidas 10, 30, 60, 100 e 150 mg de micropartículas liofilizadas contendo a Mistura CM-L para os copos, os quais foram incubados em B.O.D, com temperatura de (27 ± 2) °C, umidade relativa entre (80 ± 5) % e fotoperíodo de 12 horas. Após 24 e 72 horas, foram contadas o número de larvas vivas e mortas. O ensaio foi realizado em quadruplicata, tendo como branco 100 mL de água livre de cloro contendo 150 mg de micropartículas liofilizadas sem a mistura CM-L.

Foram calculados os valores de CL_{50} e CL_{90} , os intervalos de confiança (95%) e qui-quadrado pelo modelo Probit (FINNEY, 1971), utilizando o programa estatístico SPSS, versão 23.0. (IBM, 2015).

3.11.1 Alterações morfológicas das larvas submetidas ao teste de atividade larvicida

Foram observadas e descritas as alterações morfológicas apresentadas pelas larvas de *A. aegypti* em resposta ao tratamento com as micropartículas flutuantes contendo a mistura CM-L.

As larvas foram observadas em microscópio óptico (Olympus) e as imagens capturadas por câmera fotográfica (Nikon).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TESTE DE TOXICIDADE *IN VITRO*

4.1.1 Teste de toxicidade *in vitro* do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach

Neste trabalho, o cinamato de metila, o linalol e a mistura CM-L apresentaram valores de CL₅₀ e CL₉₀ abaixo de 1000 µg.mL⁻¹, conforme mostrado na Tabela 3.

TABELA 3 - TOXICIDADE DO CINAMATO DE METILA, LINALOL E DA MISTURA CM-L FRENTE AO MICROCRUSTÁCEO *Artemia salina*

Amostra	Concentração (µg.mL ⁻¹)	Mortalidade ^a (%) \pm DP	CL ₅₀ (µg.mL ⁻¹) (95% IC)	CL ₉₀ (µg.mL ⁻¹) (95% IC)	χ^2 (gl)
CM	25	62,7 \pm 5,8			1,5 (4) n.s.
	50	70,0 \pm 17,3			
	75	93,3 \pm 5,8	35,5	65,9	
	100	100,0 \pm 0,0	(29,5 – 41,0)	(56,4 – 83,3)	
	125	100,0 \pm 0,0			
	150	100,0 \pm 0,0			
L	25	3,3 \pm 5,8			4,9 (4) n.s.
	50	13,3 \pm 5,8			
	75	20,0 \pm 10,0	96,1	198,9	
	100	53,3 \pm 11,6	(84,9 – 109,7)	(162,1 – 280,8)	
	125	70,0 \pm 10,0			
	150	90,0 \pm 10,0			
CM-L	25	6,7 \pm 5,8			3,8 (4) n.s.
	50	30,0 \pm 10,0			
	75	66,7 \pm 5,8	57,7	101,1	
	100	93,3 \pm 5,8	(50,5 – 64,6)	(88,8 – 121,1)	
	125	96,7 \pm 5,8			
	150	100,0 \pm 0,0			

FONTE: O Autor (2015)

NOTA: Não foi observada mortalidade no grupo controle

LEGENDA:

CM = cinamato de metila

L = linalol

CM-L = CM e L em combinação (proporção 1:4)

DP = desvio-padrão

CL₅₀ = concentração capaz de matar 50% dos organismos expostos ao tratamento

CL₉₀ = concentração capaz de matar 90% dos organismos expostos ao tratamento

IC = intervalo de confiança

χ^2 = qui-quadrado

gl = graus de liberdade

n.s.= não significativa ($\alpha = 0.05$)

^aValores correspondem à média da triplicata \pm DP

De acordo com Meyer et al. (1982), quando se avalia a toxicidade de um extrato vegetal pelo bioensaio com *Artemia salina* L., valores encontrados de CL_{50} abaixo de $1000 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ sugerem a bioatividade do mesmo, sendo que esta tem sido relacionada não somente à toxicidade, mas também às atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, tripanossomicida e parasiticida (BEDNARCZUK et al., 2010); o uso do gênero *Artemia* também é importante parâmetro na avaliação da ecotoxicidade. (NUNES et al., 2006). Ainda, de acordo com Cheng et al. (2003), óleos essenciais apresentando valores de $CL_{50} < 500 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ devem ser considerados para os testes larvicidas contra *Aedes aegypti*.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com estudos prévios de Peterson et al. (2000), que realizaram este bioensaio com compostos monoterpenoides, utilizando a espécie *Artemia franciscana* Kellog, e concluíram que os ésteres do ácido citronílico e do ácido cinâmico eram os mais tóxicos, sendo que o cinamato de metila apresentou porcentagem de mortalidade de 80% e 100% nas concentrações de 10 ppm e 100 ppm, respectivamente.

Satyal et al. (2013) realizaram o teste de toxicidade com *Artemia salina* L. com os óleos essenciais de *Cinnamomum camphora*, *C. tamala* e *C. glaucescens* e seus compostos majoritários, entre eles, linalol e cinamato de metila. Os pesquisadores encontraram valores de CL_{50} igual a $(36,0 \pm 3,9) \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ para o linalol e $(20,7 \pm 3,1) \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ para o cinamato de metila. Estes valores diferem dos encontrados neste trabalho por possíveis variações nos métodos, como condições ambientais, fatores não-genéticos (temperatura, pH e composição química do meio, oxigênio, fotoperíodo, nutrientes, doenças, efeitos de população) e características genéticas dos organismos. (NUNES et al., 2006). Porém, apesar das diferenças, os dois ensaios apontaram a bioatividades das amostras, apresentando o cinamato de metila como o agente mais ativo.

Tewtrakul et al. (2005) pesquisaram o óleo volátil de rizomas secos de *Kaempferia galanga*. Dentre seus principais constituintes, foram identificados o etil-*p*-metoxicinamato (31,77%) e o cinamato de metila (23,23%). O teste de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* L. do óleo volátil apresentou um valor de CL_{50} de $26,84 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

Souza et al. (2007), Fabri et al. (2012) e Soares et al. (2012) demonstraram a bioatividade dos óleos voláteis de *Aniba duckei*, *Mitracarpus frigidus* e *Coriandrum sativum*, respectivamente, todos contendo como constituintes majoritário o linalol,

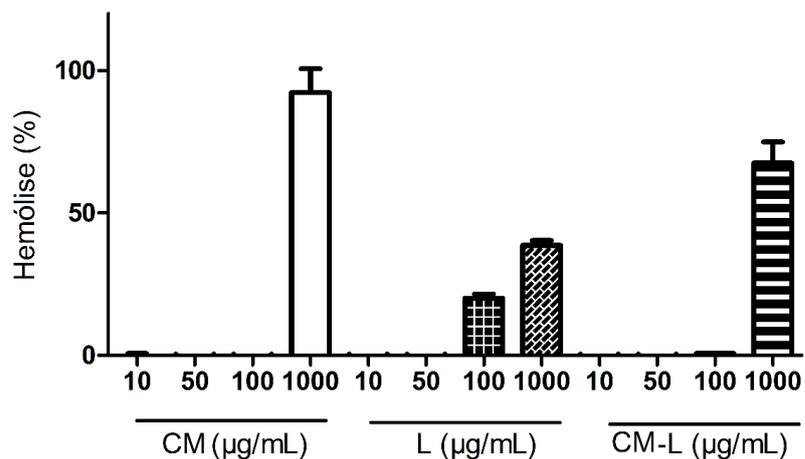
contra os microcrustáceos *A. franciscana* ou *A. salina*. As três espécies apresentaram CL_{50} inferior a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, evidenciando a bioatividade dos óleos.

Portanto, os valores de CL_{50} encontrados para o cinamato de metila e o linalol correspondem às suas atividades biológicas já relatadas, e indicam ainda a possibilidade de realização do teste larvicida, inclusive com a mistura CM-L.

4.1.2 Atividade hemolítica do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L

O cinamato de metila, o linalol e a mistura CM-L exibiram atividade hemolítica na concentração de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo que o cinamato de metila demonstrou aproximadamente 100% de hemólise nesta concentração. Quando comparado com o cinamato de metila e a mistura CM-L, o linalol exibiu o maior potencial hemolítico na concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O valor de 100% de hemólise corresponde a incubações feitas com adição de água destilada, enquanto 0% de hemólise corresponde aos valores de hemólise mecânica ocasionada pela manipulação. Os resultados encontram-se representados no Gráfico 1.

GRÁFICO 1 - PORCENTAGEM DE HEMÓLISE OCACIONADA PELO CINAMATO DE METILA, LINALOL E MISTURA CM-L EM SUSPENSÃO DE HEMÁCIAS DE CARNEIRO 2% EM RELAÇÃO AO CONTROLE



FONTE: O Autor (2015)

LEGENDA:

CM = cinamato de metila

L = linalol

CM-L = CM e L em combinação (proporção 1:4)

Portanto, apesar da significativa bioatividade apresentada pela a mistura CM-L no bioensaio com *Artemia salina* L., esta substância mostrou menor atividade hemolítica quando comparada ao cinamato de metila e ao linalol.

A estabilidade da membrana dos eritrócitos sujeitos à ação de diferentes substâncias é uma importante ferramenta na análise preliminar de citotoxicidade das mesmas. (GANDHI; CHERIAN, 2000; SHARMA; SHARMA, 2001).

A atividade hemolítica do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L pode estar relacionada às suas propriedades lipofílicas, as quais permitem sua interação com a membrana lipofílica das hemácias, alterando sua permeabilidade e resultando na lise das células. (BAKKALI et al., 2008; SHARMA; SHARMA, 2001; ANDRADE, 2013).

4.1.3 Atividade alelopática do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L

No presente estudo, as sementes de alface submetidas ao tratamento com cinamato de metila, linalol e a mistura CM-L na concentração de 1% (m/v) apresentaram inibição completa de germinação.

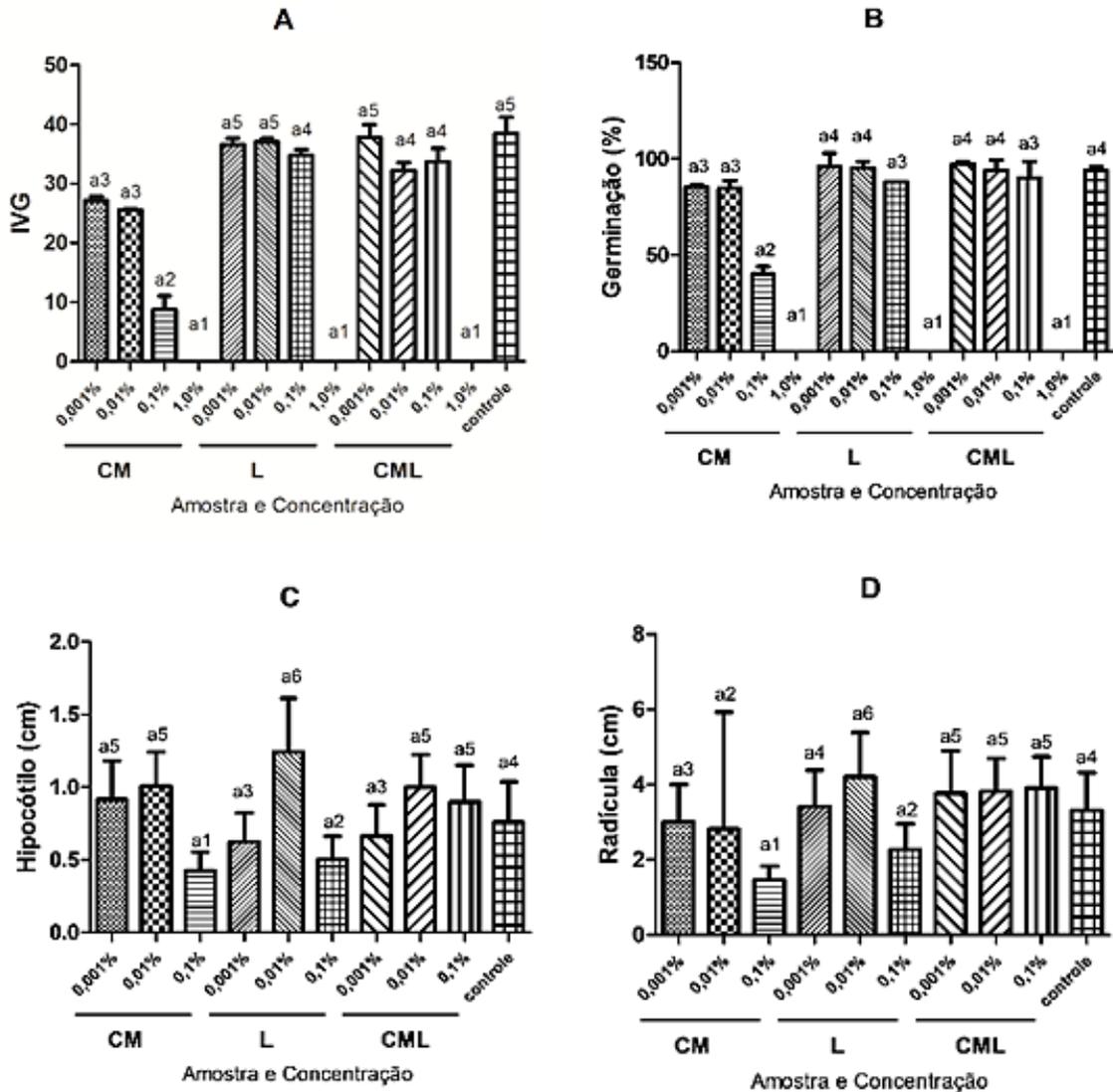
O potencial alelopático de uma substância ou composto pode indicar sua fitotoxicidade sobre espécies próximas, constituindo uma ferramenta valiosa para o setor agrícola no manejo de plantas daninhas. A utilização de herbicidas contendo aleloquímicos em substituição aos herbicidas sintéticos tradicionais é considerado vantajoso por serem considerados mais seletivos, biodegradáveis e menos poluentes. (MACÍAS; CASTELLANO; MOLINILLO, 2000; KHANH et al., 2008; TREVISAN et al., 2012). Nesse sentido, o cinamato de metila, o linalol e a mistura CM-L na concentração de 1% (m/m) podem ser considerados para uso como herbicidas naturais por apresentarem inibição total da germinação das sementes de *Lactuca sativa*.

O cinamato de metila apresentou o maior efeito inibitório sobre as sementes de *Lactuca sativa* quando comparado ao linalol e a mistura CM-L, afetando a germinação, o desenvolvimento e o comprimento de radícula e hipocótilo (Figura 20). O aumento na concentração de cinamato de metila resulta no aumento do seu efeito inibitório.

Os resultados obtidos para o cinamato de metila corroboram com os achados de Medeiros et al. (2014) e Signorini et al. (2014), que testaram a atividade alelopática

de diferentes óleos essenciais contendo como componente majoritário o cinamato de metila ou ácido cinâmico, e apontaram o efeito inibitório desses óleos na germinação e no desenvolvimento das plântulas.

FIGURA 20 - ATIVIDADE ALEOPÁTICA DO CINAMATO DE METILA, LINALOL E MISTURA CM-L



FONTE: O AUTOR (2015)

NOTA: O controle foi composto por água purificada contendo 1% de Tween[®] 80 (m/v)

Os resultados mostrados referem-se aos valores médios da triplicata \pm DP

Os tratamentos apresentando mesma letra e número não diferem significativamente de acordo com o teste Scott-Knott ($p < 0,05$)

LEGENDA:

IVG = Índice de velocidade de germinação

CM = cinamato de metila

L = linalol

CM-L = CM e L em combinação (proporção 1:4)

Alves et al. (2004), estudando a alelopatia de extratos voláteis de diferentes óleos essenciais, na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface, verificaram que o óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), contendo como composto majoritário o ácido cinâmico, apresentou potencial inibitório de germinação e de comprimento de raiz quando nas concentrações de 0,1 e 1% (m/v), resultado semelhante ao obtido com o cinamato de metila neste trabalho. No mesmo estudo, os pesquisadores observaram também que o óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*), contendo linalol como componente majoritário, teve efeito inibitório significativo sobre a germinação da alface.

O linalol e a mistura CM-L apresentaram resultados para os índices de germinação e avaliação biométrica comparáveis ao controle, com exceção de linalol a 0,01% que apresentou efeito estimulante do crescimento de radícula e hipocótilo.

Estudos prévios demonstraram a ação inibitória do linalol sobre a germinação de outras espécies, além de interferirem no desenvolvimento, peso, conteúdo de clorofila e respiração celular. (SINGH et al., 2002; VAID et al., 2005; ROSADO et al., 2009). No entanto, alguns pesquisadores destacam a ação estimulante de substâncias aleloquímicas quando em baixas concentrações, comportamento este observado no linalol. (AN; PRATLEY; HAIG, 2000; VOKOU et al., 2003; HOFFMANN et al., 2007).

Este trabalho demonstrou que o cinamato de metila apresentou a maior interferência na germinação e desenvolvimento das sementes de *Lactuca sativa*, e que a mistura CM-L mostrou a mais baixa. Estes resultados sustentam a hipótese de An, Pratley e Haig (2001), que consideram que a fitotoxicidade de uma mistura é diferente da apresentada pelos seus componentes separados devido a interação entre eles. Assim, a fitotoxicidade esperada pode ser diferente da observada.

A exposição de aleloquímicos no ambiente pode interferir não somente na germinação e crescimento das plantas, mas também nas propriedades físicas e químicas do solo, comprometendo tanto o desenvolvimento da vegetação próxima como a fauna e a água. Portanto, o estudo da atividade alelopática pelo ensaio com *Lactuca sativa* é considerado uma ferramenta para a avaliação da ecotoxicidade de resíduos domésticos e industriais e de compostos químicos derivados do metabolismo secundário das plantas. (PANDARD et al., 2006; SIMÕES et al., 2013).

4.1.4 Atividade larvicida do cinamato de metila, do linalol e da mistura CM-L contra larvas de *Aedes aegypti*

O cinamato de metila, o linalol e a mistura CM-L apresentaram atividade larvicida sobre as larvas de terceiro estágio de *A. aegypti*. A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos no teste.

Recentes revisões sobre óleos essenciais com atividade larvicida (DIAS; MORAES, 2014; PAVELA, 2015) apontam que óleos essenciais contendo cinamato de metila e/ou linalol como componentes majoritários são considerados ativos ou altamente ativos, com CL_{50} inferior a 100 mg.mL^{-1} (CAVALCANTI et al., 2004; FURTADO et al., 2005; JANTAN et al., 2005; TIWARY et al., 2007; NOUR et al., 2009; BENELLI et al., 2013).

TABELA 4 - ATIVIDADE LARVICIDA DO CINAMATO DE METILA, LINALOL E DA MISTURA CM-L SOBRE *Aedes aegypti*

Amostra	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Mortalidade (%) \pm DP	CL_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (95% IC)	CL_{90} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (95% IC)	χ^2	(gl)
CM	10	0,0			0,0	(2) n.s.
	25	8,8 \pm 8,5	35,4	49,2		
	50	91,2 \pm 7,5	(33,0 – 38,1)	(45,1 – 55,1)		
	100	100,0 \pm 0,0				
L	100	1,2 \pm 2,5			20,5	(5)
	150	8,8 \pm 4,8				
	200	5,0 \pm 4,1	275,2	442,8		
	250	47,5 \pm 6,4	(240,5 – 316,9)	(370,1 – 646,6)		
	300	62,5 \pm 10,4				
	350	67,5 \pm 15,5				
	400	88,8 \pm 11,1				
CM-L	50	0,0			1,3	(4) n.s.
	100	10,0 \pm 10,8				
	150	60,0 \pm 7,1	138,0	186,2		
	200	95,0 \pm 4,1	(131,3 – 144,6)	(175,9 – 200,4)		
	250	100,0 \pm 0,0				
	300	100,0 \pm 0,0				

FONTE: O Autor (2015)

NOTA: Não foi observada mortalidade no grupo controle

LEGENDA:

CM = cinamato de metila

L = linalol

CM-L = CM e L em combinação (proporção 1:4)

DP = desvio-padrão

CL_{50} = concentração capaz de matar 50% dos organismos expostos ao tratamento

CL_{90} = concentração capaz de matar 90% dos organismos expostos ao tratamento

IC = intervalo de confiança

χ^2 = qui-quadrado

gl = graus de liberdade

n.s.= não significante ($\alpha = 0,05$)

^aValores correspondem à média da quadruplicata \pm DP

Trabalhos prévios demonstraram também a atividade larvicida do linalol e do cinamato de metila quando avaliados isoladamente, os quais apresentaram valores de CL_{50} entre $157 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $346 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (TELES, 2009; PANDEY et al., 2013) e $16,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (JANTAN et al., 2005) respectivamente.

De maneira geral, a bioatividade dos óleos essenciais é atribuída ao seu composto majoritário. No entanto, os óleos essenciais são compostos por diferentes substâncias encontradas em maior ou menor concentração, as quais podem interagir entre si, resultando no aumento ou redução da atividade larvicida quando comparados aos seus compostos isolados (PEREIRA, 2009; DIAS; MORAES, 2014). Exemplos destas interações são mostrados por Tiwary et al. (2007) e Teles (2009), os quais observaram que apesar do linalol ser o componente majoritário dos óleos essenciais de *Zanthoxylum armatum* e *Aniba duckei*, estes apresentaram valor de CL_{50} inferior ao linalol isolado. De forma semelhante, Pereira (2009) trabalhou com a mistura dos óleos essenciais de *Pimenta dioica* e *Aniba duckei* e com os padrões de eugenol e linalol, seus componentes majoritários. Ao comparar os resultados, verificaram que a mistura de óleos apresentou CL_{50} de $113,95 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto o eugenol e o linalol apresentaram valores de CL_{50} $90,86 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $305,42 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

Do mesmo modo, neste trabalho, o linalol apresentou valor de CL_{50} superior aos do cinamato de metila e da mistura, sendo o mais ativo, o cinamato de metila (CL_{50} $35,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

No entanto, apesar do cinamato de metila exibir melhor atividade larvicida, em análises prévias apresentou atividade repelente inferior à da mistura (ANNIES et al., 2012), apontando para seu uso em conjunto com o linalol.

4.1.4.1 Alterações morfológicas das larvas submetidas ao teste de atividade larvicida

Os fitolarvicidas podem impedir a passagem das larvas para a próxima fase do ciclo de vida, assim a avaliação das alterações morfológicas em larvas expostas a óleos essenciais pode explicar o seu mecanismo de toxicidade para *Aedes aegypti*. (ACIOLE, 2009; DALARMI et al., 2015). Neste trabalho, o grupo controle negativo (larvas tratadas com água e Tween[®] 80), apresentou uma aparência vermiforme e uma cor verde-esbranquiçada. O corpo estava nitidamente dividido em cabeça, tórax e abdômen. O abdômen estava dividido em oito segmentos, sendo que o sifão respiratório e o lóbulo anal foram observados no último segmento (Figura 21A).

As larvas expostas a cinamato de metila e ao linalol em concentrações sub-letais apresentaram-se curvas, mais escuras e com abdômen mais curto quando comparado com o grupo de controle e as larvas CM-L (Figuras 21D e 21G). Estes fenômenos foram previamente relacionados com a sobreposição de cutícula dos segmentos abdominais. (BARRETO et al., 2006; GRZYBOWSKY et al., 2013). Por outro lado, as larvas submetidas a todas as substâncias em concentrações próximas ao CL₅₀ mostraram abdômen alongado e escurecimento do intestino (Figura 21J). O principal alongamento ocorreu na região da cérvix (Figura 21J). Algumas larvas também mostraram segmentos não claramente divididos (Figura 21K).

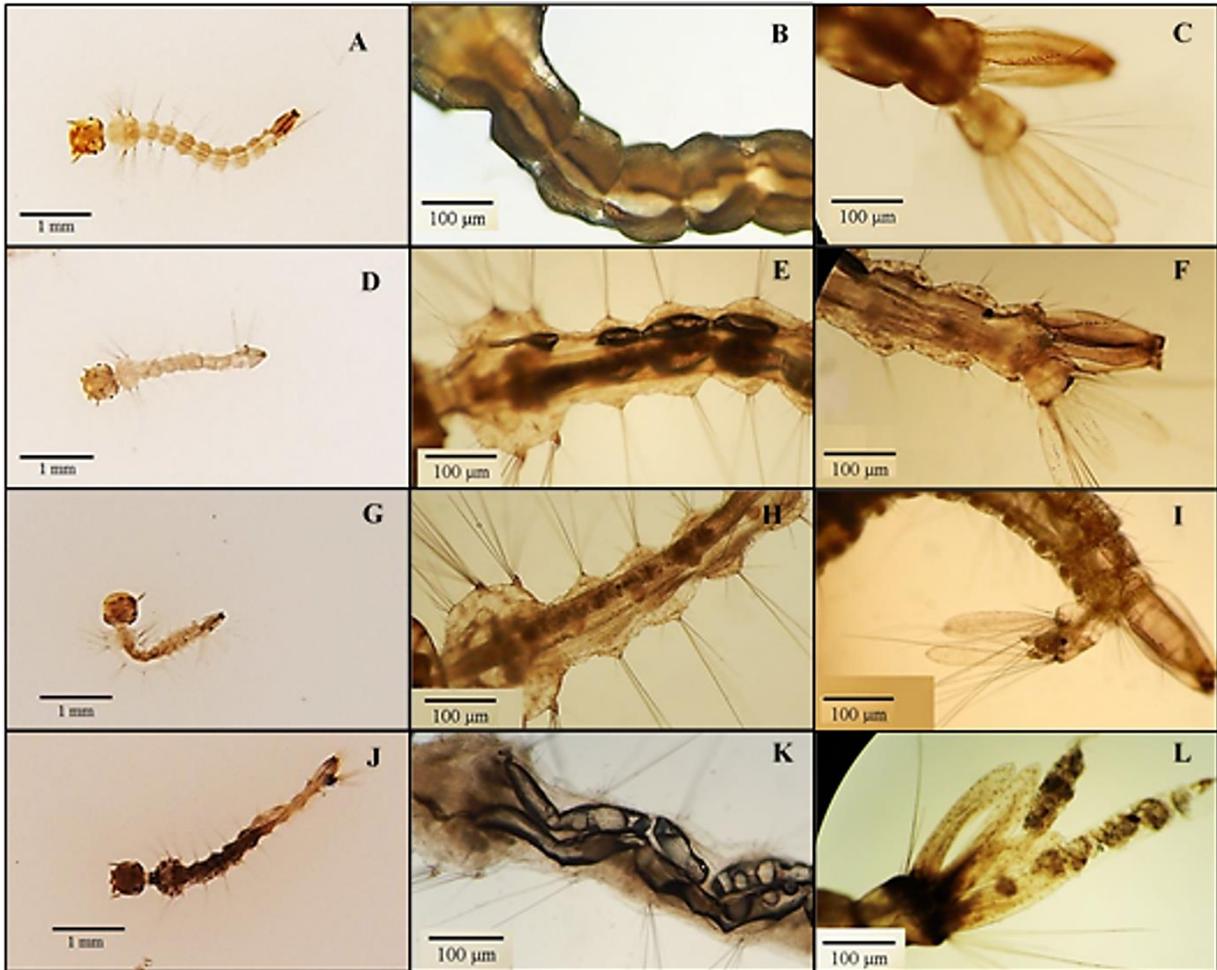
O escurecimento do intestino pode ser resultante da melanização, do dano às células epiteliais ou alterações na membrana peritrófica, sendo que a ausência da camada epitelial (Figura 21D) indica que a atividade larvicida da mistura CM-L ocorre, muito provavelmente, devido aos danos no intestino das larvas de *Aedes aegypti*. (EDWARDS; JACOBX-LORENA, 2000; ABED et al, 2007; SHAO et al., 2012; PROCÓPIO et al., 2015).

Algumas larvas exibiram eliminação total ou parcial do conteúdo intestinal envolto pela membrana peritrófica (Figura 21I e 21L). Este processo ocorre como um mecanismo inicial de defesa das larvas submetidas a substâncias tóxicas, na tentativa de eliminá-las o mais rápido possível (CHAITONG et al., 2006; PROCÓPIO et al., 2015).

As larvas tratadas com cinamato de metila, linalol e a mistura CM-L apresentaram redução da espessura do corpo gorduroso (Figura 21E, 21H e 21K). Este processo pode ser associado à perda de nutrientes devido a eliminação do conteúdo intestinal ou ao bloqueio da digestão ou absorção de nutrientes promovido pelos danos às células epiteliais do intestino, uma vez que a conversão de carboidratos à lipídios é a principal rota de lipogênese. (ARRESE; SOULAGES, 2010).

As Figuras 21E e 21K mostram o sistema traqueal translúcido, o que é indicativo de presença de água em seu interior. As larvas do grupo controle (Figura 21A e 21B) exibem o sistema traqueal opaco e escuro, indicativo de presença de ar apenas. (CORBET et al., 1995; SOUZA et al, 2012). De acordo com Corbet et al. (2000) os óleos essenciais podem afetar as larvas promovendo a inundação física do sistema traqueal, pela toxicidade química ou pela ação combinada. Neste estudo, o cinamato de metila e a mistura CM-L apresentam ação combinada, causando inundação do sistema traqueal e toxicidade às larvas.

FIGURA 21 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NAS LARVAS DE *Aedes aegypti* SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM CM, L E CM-L



Fonte: O Autor (2016)

NOTA: Grupo controle (A, B e C); larvas submetidas ao tratamento com CM apresentando sobreposição de segmentos (D), inundação do sistema traqueal e redução do corpo gorduroso (E) e alteração das papilas anais (F); larvas submetidas ao tratamento com L demonstrando abdômen curvo (G); redução do corpo gorduroso (H) e extrusão parcial da membrana peritrófica (I); larvas submetidas ao tratamento com a mistura CM-L apresentando escurecimento do intestino (J); inundação do sistema traqueal, redução do corpo gorduroso e ruptura das células epiteliais do intestino (K) e extrusão do conteúdo intestinal envolto pela membrana peritrófica (L)

4.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES

4.2.1 Determinação do valor de EHL da mistura CM-L

A primeira série de emulsões foi preparada com concentrações de tensoativos expressos na Tabela 5.

TABELA 5 - CONCENTRAÇÃO DE TENSOATIVOS E VALORES DE EHL

Emulsão	Mistura de Tensoativos		EHL
	Span® 60 (%)	Tween® 80 (%)	
1	70	30	7,79
2	60	40	8,82
3	50	50	9,85
4	40	60	10,88
5	30	70	11,91
6	20	80	12,94

FONTE: O Autor (2014)

Os resultados obtidos apontaram um valor de EHL para a Mistura CM-L próximo a 7,79 pois a emulsão formada neste valor apresentou melhores características visuais de estabilidade, conforme Figura 22.

FIGURA 22 - ESTABILIDADE DA PRIMEIRA SÉRIE DE EMULSÕES APÓS 24 HORAS



FONTE: O Autor (2014)

A partir dos resultados obtidos, uma nova série de emulsões foi preparada, conforme Tabela 6, com a redução no intervalo de valores de EHL.

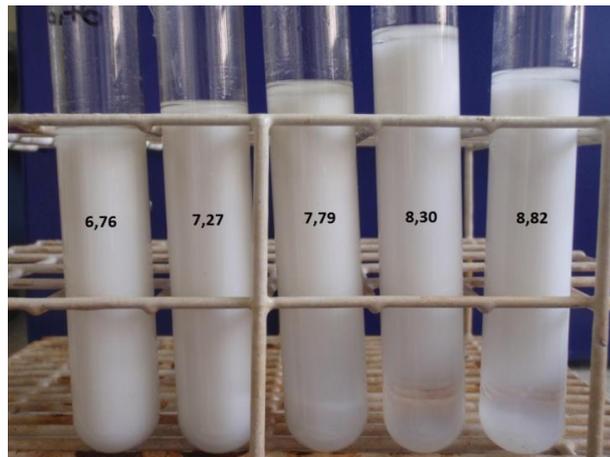
TABELA 6 - EHL DA SEGUNDA SÉRIE DE EMULSÕES

Emulsão	Mistura de Tensoativos		EHL
	Span® 60 (%)	Tween® 80 (%)	
7	80	20	6,76
8	75	25	7,27
9	70	30	7,79
10	65	35	8,3
11	60	40	8,82

FONTE: O Autor (2014)

Esta segunda série resultou em emulsões visualmente mais estáveis em valores de EHL entre 6,76 e 7,27 após 24 horas e 30 e 60 dias da manipulação das mesmas (Figura 23).

FIGURA 23- ESTABILIDADE DA SEGUNDA SÉRIE DE EMULSÕES APÓS 60 DIAS



FONTE: O Autor (2014)

De acordo com a escala de Griffin para os valores de EHL, tensoativos apresentando valores entre 3 e 6 favorecem a formação de emulsões água em óleo, enquanto os com valores entre 8 e 16 favorecem a obtenção de emulsões óleo em água. (LAWRENCE; REES, 2000; HOLMBERG et al., 2002). Assim, levando em consideração a necessidade de produzir uma emulsão óleo em água estável, e os valores de EHL limítrofes obtidos para a mistura CM-L, testes com valores de EHL inferiores a 6,76 não foram realizados.

A determinação do EHL de uma substância é uma etapa fundamental para o desenvolvimento de sistemas emulsificados, uma vez que sua estabilidade pode ser

melhor alcançada utilizando-se tensoativos com EHL igual ou muito próximo ao da fase oleosa da emulsão. (ORAFIDIYA; OLADIMEJI, 2002).

As emulsões são uma importante forma de veiculação de ativos nas áreas farmacêuticas, cosmética e alimentícia. Elas podem por si só ser o produto final, como uma emulsão hidratante ou uma nutrição parenteral, como também a fase inicial dos processos de encapsulação de ativos. (VELLOSO, 2009; BOUYER et al., 2012; FUJIWARA et al., 2013).

Quando da formulação de uma emulsão, a separação das fases aquosa e oleosa é o primeiro sinal de instabilidade que se pode observar (CHAN, 2011), sendo a verificação deste processo fundamental, pois interfere em todas as demais características do produto final. (SANCTIS, 1999).

O uso de surfactantes no processo de microencapsulação pode favorecer a estabilidade da emulsão formada, a dispersão apropriada do cálcio na técnica de gelificação interna, a formação de micropartículas com maior conteúdo de encapsulado e a redução da taxa de liberação do encapsulado. (WAN; HENG; CHAN, 1994; PETCHSOMRIT; SERMKAEW; WIWATTANAPATAPEE, 2013; LUPO et al., 2014).

Assim, os resultados obtidos neste trabalho indicaram que emulsões fisicamente estáveis contendo a mistura CM-L podem ser formuladas com uma combinação de tensoativos composta de 80% (m/m) de Spam[®] 60 e 20% (m/m) de Tween[®] 80, a qual apresenta valor de EHL igual a 6,76. Essas emulsões estáveis foram, posteriormente, utilizadas para a obtenção de micropartículas flutuantes.

4.2.2 Avaliação dos parâmetros das formulações para obtenção das micropartículas flutuantes

4.2.2.1 Determinação da concentração de mistura CM-L para formulação das micropartículas

A concentração da mistura CM-L utilizada neste trabalho foi de 10% (m/m) em relação a quantidade total de emulsão inicial produzida.

Estudos prévios de microencapsulação de óleos essenciais pela técnica de gelificação iônica utilizando o alginato de sódio como matriz polimérica, demonstraram que a eficiência de encapsulação e o perfil de liberação estão relacionadas ao tipo de

material encapsulante, a quantidade deste material e a quantidade de óleo a ser encapsulado. (CHANG; DOBASHI, 2003; PASQUALIM et al.; 2010; CHAN, 2011; BENAVIDES et al., 2016).

Pasqualim et al. (2010) demonstraram a possibilidade de encapsulação de até 20% de óleo de semente de uva quando utilizada uma solução de alginato de sódio a 1%, enquanto Chan (2011) obteve melhores resultados com uma concentração de alginato a 2,5% e de óleo a 30%.

No entanto, Peniche et al. (2004) observaram que micropartículas contendo óleo de fígado de tubarão, produzidas com alginato de sódio a 6% (m/m) e formuladas com óleo em quantidade igual ou superior a 15% (m/m), apresentavam exsudação de seu conteúdo após 48 horas de sua preparação, enquanto as com 10% (m/m) mantinham-se íntegras.

Considerando o exposto, optou-se por trabalhar com a encapsulação da mistura CM-L na concentração de 10% (m/m) para obtenção de micropartículas com adequada eficiência de encapsulação e estabilidade física.

4.2.2.2 Influência da quantidade do agente formador de gás (CaCO_3) na estrutura e flotabilidade das micropartículas

As concentrações de agente formador de gás carbônico (CaCO_3), polímeros e tensoativos foram avaliados nas diferentes formulações com o objetivo de obter micropartículas com boa flotabilidade, eficiência de encapsulação e perfil de liberação.

Micropartículas preparadas com a presença de agentes formadores de gás tendem a ser maiores e mais porosas, sendo que o aumento da porosidade pode acarretar em alterações na flotabilidade, estabilidade e perfil de liberação do material encapsulado. (CHOI et al., 2002; GADAD et al., 2009; KRISHNAN et al., 2010; PAULA et al., 2012).

No processo de gelificação iônica interna, a quantidade de cálcio liberado na matriz polimérica pela acidificação do meio não deve ser excessiva, pois a alta porosidade pode fragilizar a estrutura das micropartículas, porém, deve ser o suficiente para reduzir a densidade das mesmas. (CHAN; LEE; HENG, 2002; GADAD et al., 2009).

As micropartículas F1 e F2 (item 3.5.2) não apresentaram diferença significativa em relação ao seu tamanho, porém, as com maior concentração de cálcio (F2) mostraram flotabilidade superior a 48 horas (Tabela 7).

TABELA 7 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CaCO_3 SOBRE A FLOTABILIDADE DAS MICROPARTÍCULAS

Tempo (horas)	Flotabilidade (%)	
	F1	F2
0	100,0	100,0
24	61,7 + 12,6	81,7 + 7,6
48	1,7 + 2,9	51,7 + 10,4

FONTE: O Autor (2015)

Os resultados obtidos corroboram com os trabalhos de Choi et al. (2002) e Paula et al. (2012), os quais avaliaram os efeitos do CaCO_3 em diferentes concentrações, nas características físico-químicas de micropartículas de alginato de cálcio. Os pesquisadores observaram também que, apesar do aumento de porosidade, a maior concentração de CaCO_3 resultou em uma liberação mais sustentada da substância encapsulada.

Esse comportamento foi atribuído à maior disponibilidade de íons Ca^{+2} no interior da matriz polimérica para interação com resíduos carboxílicos do alginato durante o processo de gelificação interna, resultando em uma rede polimérica mais compacta, a qual dificultaria a liberação do encapsulado.

Portanto, as micropartículas com maior concentração de CaCO_3 foram preteridas para continuação dos trabalhos.

4.2.2.3 Influência do recobrimento com quitosana sobre a flotabilidade das micropartículas

As micropartículas de alginato de cálcio são muito utilizadas para encapsulação de diversas substâncias, como óleos, fármacos, células e proteínas e materiais bioativos. (LÓPEZ; FERNANDEZ, 2001; PONCELET 2009). No entanto, a liberação do material encapsulado é normalmente rápida devido a alta porosidade da membrana. (RIBEIRO et al., 1999). Assim, estratégias como o revestimento das micropartículas, ou a utilização de uma mistura de polímeros ou de material de

preenchimento pode ser necessário para alcançar o perfil de liberação desejado. (TU et al., 2005; DOHNAL; STEPANEK, 2010; MENNINI et al., 2012).

Nesse sentido, as micropartículas F2 foram revestidas com quitosana em diferentes proporções (F3, F4 e F5) e avaliadas quanto a flotabilidade. As micropartículas apresentaram menor flotabilidade com o aumento na proporção de quitosana em relação ao alginato (Tabela 8), característica que pode estar relacionada com a espessura do revestimento sobre a membrana de alginato.

TABELA 8- EFEITO DE DIFERENTES PROPORÇÕES DE QUITOSANA: ALGINATO (m/m) SOBRE A FLOTABILIDADE DAS MICROPARTÍCULAS

Tempo (horas)	Flotabilidade (%)		
	F3 (0,5:1 m/m)	F4 (1:1 m/m)	F5 (2:1 m/m)
0	100,0	100,0	100,0
24	100,0	85,0 ± 5,0	80,0 ± 5,0
48	90,0 ± 5,0	73,3 ± 7,6	56,7 ± 16,1
72	66,7 ± 7,6	55,0 ± 5,0	33,3 ± 15,3
96	38,3 ± 5,8	23,3 ± 7,6	6,7 ± 5,8
120	8,3 ± 2,9	0	0

FONTE: O Autor (2015)

Sahasathian, Praphairaksit e Muangsin (2010) verificaram que micropartículas preparadas com alginato de sódio a 1% (m/m) revestidas com quitosana a 0,25% (m/m) e 1% (m/m) apresentavam flotabilidade inferior às revestidas com quitosana a 0,5% (m/m). De acordo com os pesquisadores, a baixa flotabilidade das micropartículas poderia ser resultado da incapacidade do revestimento de impedir a saída das bolhas de ar da matriz devido a baixa concentração de quitosana, ou do aumento de peso das micropartículas devido a formação de um revestimento mais espesso sobre elas.

Portanto, apesar de pesquisas prévias demonstrarem que o revestimento de quitosana em maior concentração favorece a liberação mais sustentada do encapsulado (SAHASATHIAN; PRAPHAIRAKSIT; MUANGSIN, 2010), optou-se por trabalhar com o revestimento de quitosana em menor concentração devido ao comportamento de flotabilidade.

4.2.2.4 Influência da incorporação de goma arábica na flotabilidade das micropartículas

A incorporação de material de preenchimento ou a utilização de uma mistura de polímeros nos processos de microencapsulação tende a melhorar a estabilidade física e o perfil de liberação das micropartículas. (ESPINOSA-ANDREWS et al., 2010; CALIJA et al., 2011; FUJIWARA, 2012). A utilização da mistura alginato de sódio-goma arábica para produção de micropartículas tem sido explorada devido as propriedades de biodegradação, biocompatibilidade e mucoadesão desses polímeros. (NAYAK; DAS; MAJI, 2012; CHUN; KIM; CHO, 2014; CHOPRA et al., 2015).

A goma arábica apresenta natureza ligeiramente aniônica devido a presença de resíduos dos ácidos polissacarídicos presentes em sua estrutura. Assim, íons Ca^{+2} disponíveis na solução gelificante podem interagir com os grupos carboxila carregados negativamente tanto do alginato de sódio quanto da goma arábica, formando uma rede tridimensional com intensas ligações. (NAYAK; DAS; MAJI, 2012; CORNELSEN et al., 2015).

Neste trabalho foram testadas formulações com diferentes proporções de alginato/goma arábica, 1:1 (m/m) e 1:2 (m/m). A formulação F7 da Tabela 1 (item 3.5.2), com maior proporção de goma, apresentou-se como uma emulsão de alta viscosidade, a qual não propiciou boa formação de micropartículas e sendo também observadas gotículas de óleo não encapsuladas na solução gelificante, sendo esta desconsiderada para a produção de micropartículas flutuantes.

De acordo com Chopra et al. (2015), um aumento na concentração de goma arábica na mistura de polímeros aumenta o tamanho da partícula e a eficiência de encapsulação devido a interação polimérica ou ao aumento da viscosidade do meio. No entanto, uma elevada viscosidade da solução polimérica pode impedir a adequada interação com os íons Ca^{+2} da solução gelificante, resultando numa baixa eficiência de encapsulação.

Ao comparar a flotabilidade das micropartículas F6 (proporção alginato/goma arábica 1:1) com as F3 (sem goma arábica), observou-se que as primeiras apresentavam melhor flotabilidade em até 120 horas (Tabela 9), optando-se por dar continuidade ao trabalho com as mesmas.

TABELA 9 - EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE GOMA ARÁBICA SOBRE A FLOTABILIDADE DAS MICROPARTÍCULAS

Tempo (horas)	Flotabilidade (%)	
	F3	F6
0	100,0	100,0
24	100,0	100,0
120	8,9 ± 7,7	84,4 ± 16,8

FONTE: O Autor (2015)

4.2.2.5 Incorporação de dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200) na formulação

As micropartículas F8 apresentaram melhor flotabilidade que as micropartículas F6 (Tabela 10).

TABELA 10 - EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE AEROSIL® 200 SOBRE A FLOTABILIDADE DAS MICROPARTÍCULAS

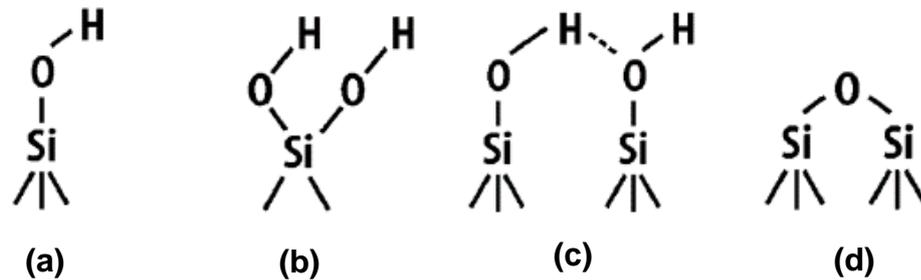
Tempo (horas)	Flotabilidade (%)	
	F6	F8
0	100,0	100,0
24	100,0	100,0
120	84,4 ± 16,8	93,3 ± 6,7

FONTE: O Autor (2016)

O dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200) é uma substância comumente utilizada nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia como adsorvente, estabilizante de emulsões, anti-aglutinante, agente suspensor e de viscosidade. (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Quimicamente é formado por dois tipos de grupos de moléculas funcionais: o silanol e o siloxano (Figura 21), os quais conferem ao Aerosil® uma natureza hidrofílica (silanol) e hidrofóbica (siloxano). A quantidade de grupos silanol predomina no Aerosil®, fazendo prevalecer seu comportamento hidrofílico. (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009; TRIBOLI, 2014).

FIGURA 24 – REPRESENTAÇÃO DOS GRUPOS SILANOL LIVRE (a), GEMINAL (b), VICINAIS UNIDOS POR PONTE DE HIDROGÊNIO E GRUPO SILOXANO



FONTE: Adaptado de TRIBOLI (2014)

O Aerosil® 200 é utilizado também como adjuvante no processo de micro/nanoencapsulação para evitar a adesão das partículas nas paredes do *spray-dryer* (DOMINGUES et al., 2008), como agente gelificante no preparo de sistemas auto-emulsionáveis para liberação modificada de fármacos (PATIL; JOSHI; PARADKAR, 2004) e como matriz encapsulante em conjunto com outros polímeros, como a quitosana e o alginato de sódio, para aumento do tempo de liberação do encapsulado. (ALBERTINI et al., 2004; COSTA NETO, 2014).

Outro importante uso do Aerosil® 200 é como agente gelificante na formação de organogéis e xerogéis para carreamento e liberação controlada de substâncias hidrofóbicas. (ANAND et al., 2001; KIRILOV et al., 2008; SAGIRI et al., 2015). Xerogel é um sistema formado com a remoção do líquido de um gel, resultando em uma estrutura porosa capaz de reter uma substância ativa em sua rede. (ALLEN JÚNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2007; FONSECA et al., 2008). Os xerogéis podem ainda ser encapsulados em sistemas poliméricos, como as micro e nanopartículas com a finalidade de aumentar a proteção do fármaco e seu tempo de liberação. (FONSECA et al., 2008).

Organogéis, ou também óleogel ou lipogel, são géis compostos por uma fase líquida hidrofóbica, como a parafina, miristato de isopropila ou óleos vegetais, aprisionada em uma rede de gel tridimensional formada por agentes gelificantes. (GOUPALE; RAJKAPOOR, 2011). São normalmente preparados pela dissolução direta do gelificante no óleo à alta temperatura, seguida de resfriamento da solução. No entanto, o processo pode ser realizado a frio, dependendo das características do agente gelificante. (ANAND et al., 2001; KIRILOV et al., 2008; SIQUEIRA-MOURA et al., 2013).

Os organogéis são principalmente utilizados nos sistemas de liberação modificada de fármacos como matrizes para o transporte transdérmico ou em sistemas micro/nanoparticulados. (ANAND et al., 2001; SAGIRI et al., 2015). A utilização de organogéis microencapsulado permite melhorar a eficiência de encapsulação e o controle de liberação de óleos de micropartículas de alginato de cálcio. (SAGIRI et al., 2015).

Assim, as micropartículas F8 foram selecionadas para dar continuidade do trabalho.

4.3 OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS FLUTUANTES CONTENDO A MISTURA CM-L

A obtenção de micropartículas pelo processo de gelificação externa consiste na emulsificação de uma solução aquosa de alginato contendo o encapsulado disperso ou solubilizado numa fase contínua não aquosa (oleosa). Posteriormente, essa emulsão é gotejada em solução gelificante de CaCl_2 para a formação das micropartículas. Na técnica de gelificação iônica interna, sais pouco solúveis de cálcio em água, como o carbonato e o citrato de cálcio, são dispersos na solução aquosa juntamente com o material a ser encapsulado. Com a acidificação da emulsão, os sais de cálcio são solubilizados, liberando íons Ca^{+2} e CO_2 no interior do sistema. Os íons Ca^{+2} interagem com os resíduos gulurônicos do alginato para a formação das micropartículas e aprisionamento do encapsulado, enquanto o CO_2 liberado na rede polimérica pode produzir bolhas de gás ou poros nas micropartículas formadas, auxiliando em sua flotabilidade. (AHMED et al., 2013; GUAN et al., 2011; FUJIWARA et al., 2013).

Neste trabalho as micropartículas flutuantes foram produzidas pelos métodos de gelificação iônica externa e interna combinadas. A emulsão contendo CaCO_3 na fase aquosa foi gotejada sobre uma solução ácida de CaCl_2 , resultando na imediata formação de micropartículas. Os prótons presentes na solução gelificante penetram pela rede polimérica, fazendo a solubilização do CaCO_3 no interior da micropartícula, resultando no aumento da interação entre o alginato e os íons Ca^{+2} disponíveis.

4.4 FLOTABILIDADE

As micropartículas flutuantes F8 (item 3.5.2) apresentaram flotabilidade média de $88,9 \pm 3,8\%$ em 7 dias e $42,2 \pm 3,8\%$ em 15 dias.

Micropartículas flutuantes são frequentemente utilizadas na área farmacêutica como uma forma dos sistemas de liberação controlada, para melhorar a absorção de fármacos. (CHOI et al., 2002; YAO et al., 2012; BISWAS; SAHOO, 2016). Estas partículas apresentam densidade inferior ao do fluido gástrico, característica que faz com que permaneçam flutuando no estômago enquanto liberam o fármaco no meio e em índice apropriado. (CHOI et al., 2002; PAULA et al., 2012; ABOU EL ELA; HASSAN; EL-MARAGHY, 2014).

A utilização deste sistema para liberação de larvicidas mostra-se promissora por propiciar a permanência do ativo por mais tempo na superfície da água, local no qual as larvas de *Aedes aegypti* se mantêm para respirar e alimentar. (PAULA et al., 2012).

Neste sentido, Paula e colaboradores (2012) testaram micropartículas flutuantes de alginato e goma de cajueiro contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* contra larvas de *A. aegypti*. Os pesquisadores concluíram que as micropartículas secas por congelamento, formadas com baixa quantidade de goma e alta conteúdo de cálcio apresentaram 100% de flotabilidade em até 4 dias, e ao comparar a atividade larvicida das micropartículas flutuantes com as não flutuantes, as primeiras apresentaram resultado superior às últimas, sendo capazes de matar cerca de três vezes mais larvas de *Aedes aegypti*, o que evidencia a importância da flotabilidade das micropartículas.

4.5 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE MISTURA CM-L MICROENCAPSULADA POR CLAE/DAD-UV

4.5.1 Validação do método analítico para a quantificação da Mistura CM-L microencapsulada por CLAE/DAD-UV

a) Especificidade

As Figuras 25 a 28 mostram os cromatogramas obtidos para uma solução-padrão de cinamato de metila, solução-padrão de linalol, solução-padrão da mistura CM-L, para uma solução de micropartículas sem adição da Mistura CM-L (branco) e para uma solução de micropartículas contendo a mistura CM-L em CLAE/DAD-UV conforme condições estabelecidas no item 3.8.

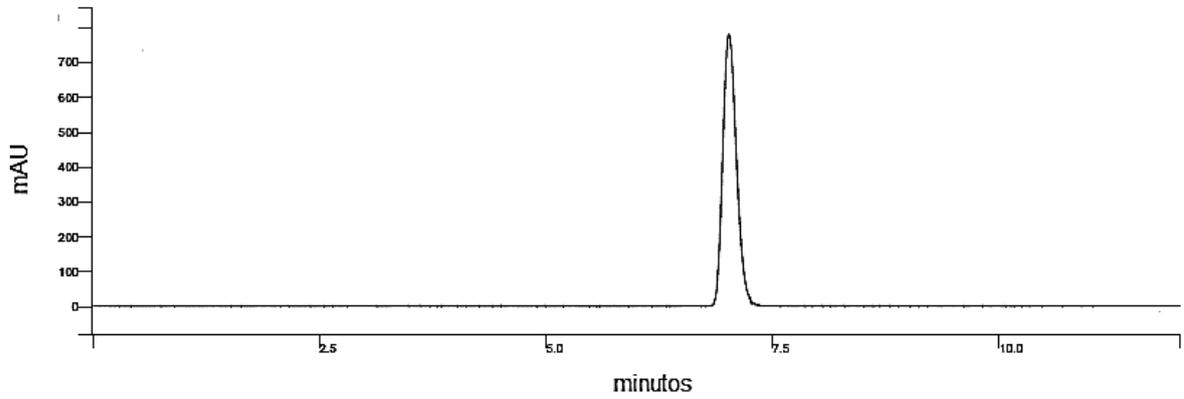
Nos cromatogramas obtidos para a solução-padrão de cinamato de metila (Figura 25) observou-se um pico característico no comprimento de onda de 210 nm, com tempo de retenção entre 6,90 e 7,00 minutos.

O cromatograma obtido para a solução-padrão de linalol (Figura 26) em 210 nm demonstrou um pico característico, com tempo de retenção entre 7,59 e 7,69 minutos.

A Figura 27 apresenta o cromatograma obtido para a solução-padrão da mistura CM-L no comprimento de onda de 210 nm. É possível observar a presença de dois picos, que são referentes ao cinamato de metila (tempo de retenção entre 6,90 e 7,00 minutos) e ao linalol (tempo de retenção entre 7,59 e 7,69).

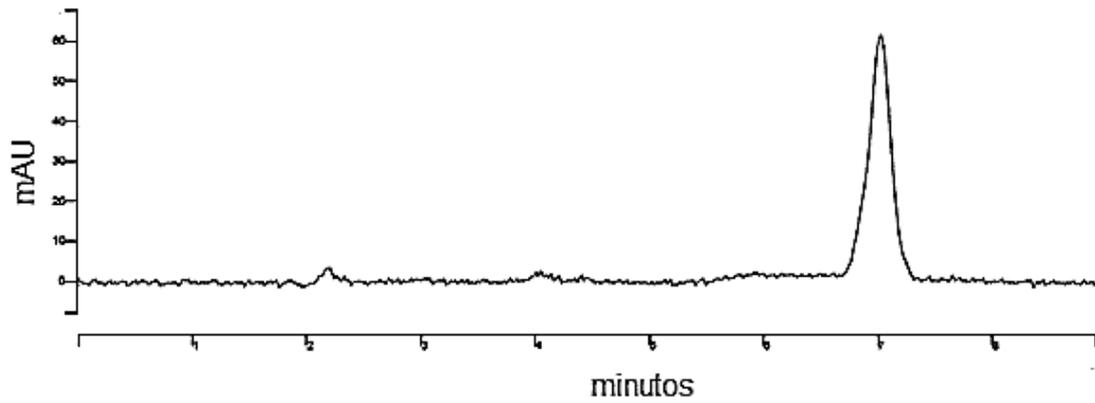
Os cromatogramas das soluções de micropartículas contendo ou não a mistura CM-L (Figura 28) mostraram que os componentes da formulação não apresentam interferência no método, comprovando a sua especificidade.

FIGURA 25 - CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO-PADRÃO DE CINAMATO DE METILA ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) EM $\lambda = 210 \text{ nm}$

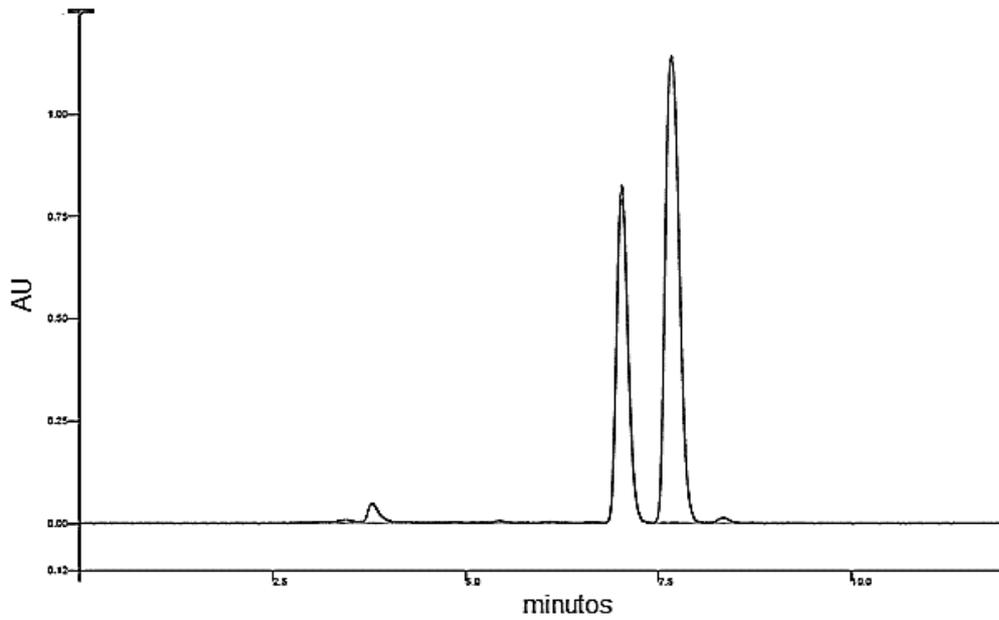


FONTE: O Autor (2016)

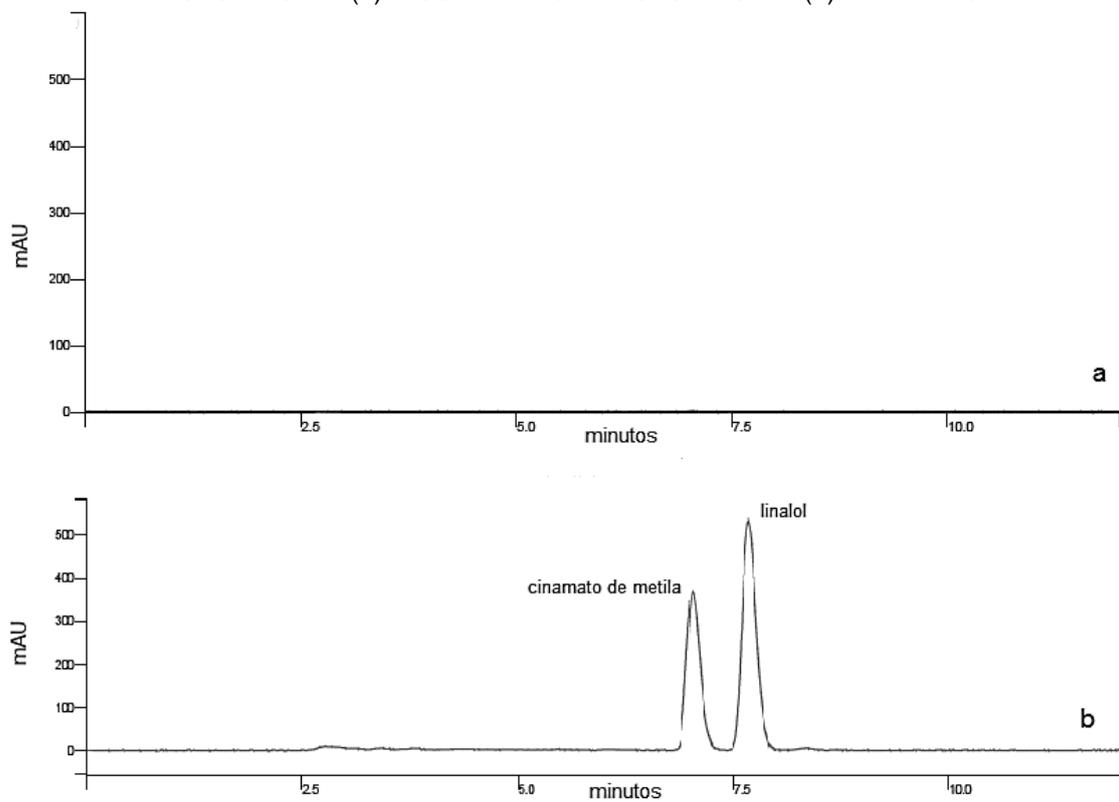
FIGURA 26 - CROMATOGRAMAS DA SOLUÇÃO-PADRÃO DE LINALOL ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) EM $\lambda = 210 \text{ nm}$



FONTE: O Autor (2016)

FIGURA 27 - CROMATOGRAMAS DA SOLUÇÃO-PADRÃO DA MISTURA CM-L EM $\lambda = 210$ nm

FONTE: O Autor (2016)

FIGURA 28 - CROMATOGRAMAS DA SOLUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS SEM A ADIÇÃO DE MISTURA CM-L (a) E CONTENDO A MISTURA CM-L (b) EM $\lambda = 210$ nm

FONTE: O Autor (2016)

b) Linearidade, Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Nas Tabelas 11 e 12 são apresentados os valores das áreas obtidas pelas diferentes concentrações de cinamato de metila e linalol.

TABELA 11 - VALORES DAS ÁREAS REFERENTES AO PICO DE CINAMATO DE METILA PARA CONSTRUÇÃO DE CURVA ANALÍTICA DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Área (mAU)	Área média \pm DP	DPR (%)
5	6357495	6269656,7 \pm 89218,63	1,42
	6179119		
	6272356		
10	12580481	12384707 \pm 416864,9	3,36
	12667649		
	11905991		
20	24909910	24972963 \pm 344031,3	1,38
	24664820		
	25344160		
30	37329912	36510852 \pm 709874,1	1,94
	36073452		
	36129192		
40	48530368	47893860 \pm 574353,2	1,20
	47414284		
	47736928		
50	63903152	61382525 \pm 2192925	3,57
	60331376		
	59913048		
60	71375088	72090584 \pm 1384701	1,92
	73686656		
	71210008		

FONTE: O Autor (2016)

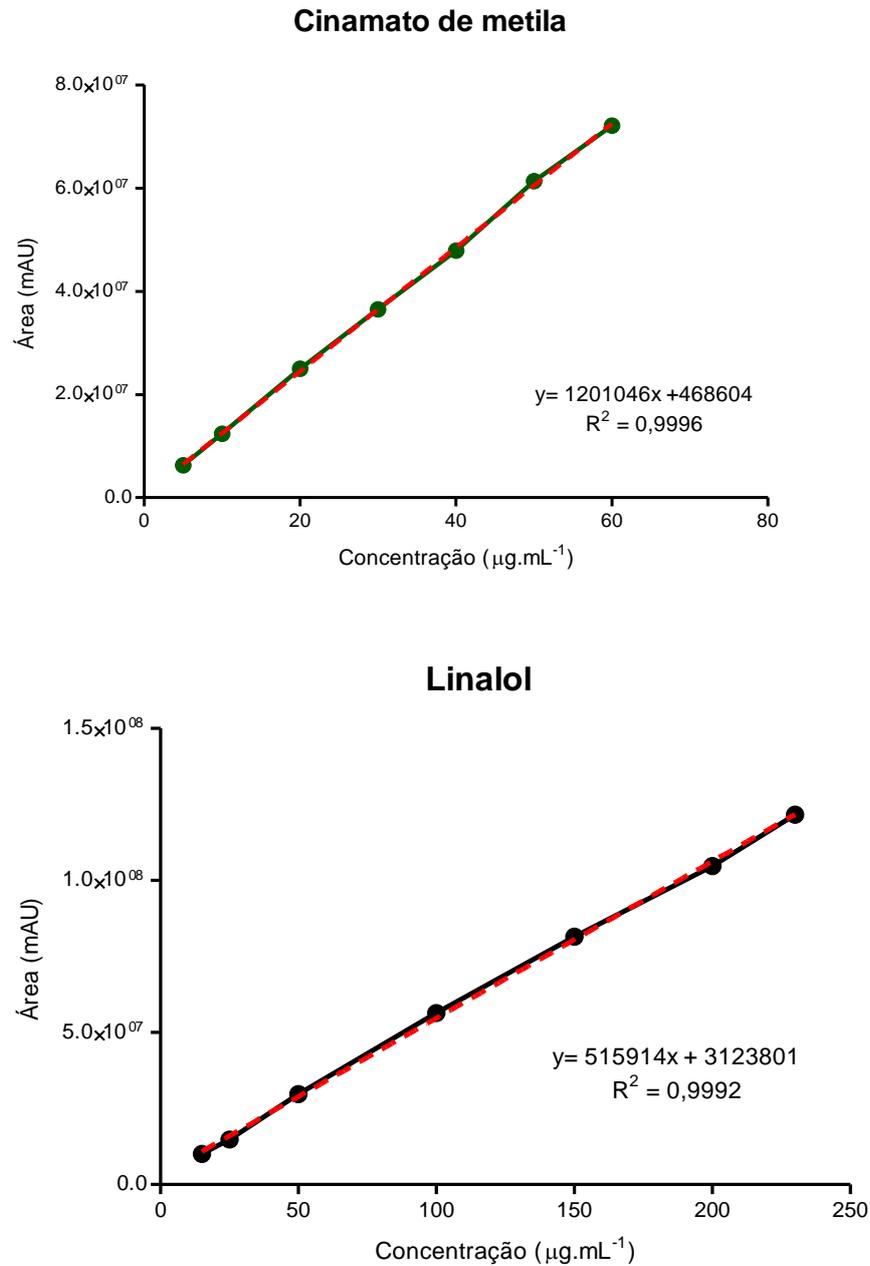
TABELA 12 -VALORES DAS ÁREAS REFERENTES AO PICO DE LINALOL PARA CONSTRUÇÃO DE CURVA ANALÍTICA DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Área (mAU)	Área média \pm DP	DPR (%)
15	10461719	10079187 \pm 334531,2	3,32
	9934427		
	9841414		
25	14909552	14849408 \pm 215936,4	1,45
	14609776		
	15028897		
50	30393558	29731912 \pm 1229675	4,13
	28313078		
	30489102		
100	57503292	56445239 \pm 2108548	3,73
	54017168		
	57815256		
150	82427656	815540024 \pm 2583110	3,17
	78647384		
	83587032		
200	106026720	104778632 \pm 2687092	2,56
	101694472		
	106614704		
230	120113288	121682381 \pm 1423050	1,17
	122044400		
	122889456		

FONTE: O Autor (2016)

Os valores das áreas médias obtidas para cada substância foram plotados em gráficos, sendo calculados as equações das retas e os coeficientes de regressão (R^2), sendo este com valor maior a 0,99 (Figura 29).

As concentrações mais baixas calculadas, nas quais o CM pode ser detectado (LD) e quantificado (LQ) foram 0,806 e 2,444 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O LD e o LQ para linalol foram 5,241 e 15,883 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Estes resultados representam que o método cromatográfico possui sensibilidade e precisão aceitáveis para detectar e quantificar CM e L nas concentrações testadas.

FIGURA 29 -CURVA ANALÍTICA PARA O CINAMATO DE METILA E O LINALOL EM $\lambda = 210 \text{ nm}$ 

FONTE: O Autor (2016)

c) Precisão

A precisão do método foi determinada pela repetibilidade e precisão entre-analistas, sendo os resultados expressos em termos de Desvio Padrão Relativo (DPR). As análises de repetibilidade foram realizadas em um mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista. Os resultados estão apresentados na Tabela 13.

TABELA 13 – RESULTADOS OBTIDOS PARA A VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO POR CLAE/DAD-UV

CINAMATO DE METILA				
Ensaio	Parâmetro Analisado	Especificação		Resultados Obtidos
Precisão	Repetibilidade	DPR* ≤ 5%	5 µg/mL	1,40
			20 µg/mL	4,03
			60 µg/mL	1,93
	Entre-analistas	DPR* ≤ 5%	Analista A	3,68
			Analista B	
	Interdias	DPR* ≤ 5%	Dia 1	4,03
Dia 2			1,40	
Exatidão	Adição de padrão	Recuperação 95 a 105%	15 µg/mL	103,22
			25 µg/mL	104,45
			50 µg/mL	104,16
Robustez	Proporção da fase móvel	DPR* ≤ 5%		0,61
			Fluxo	DPR* ≤ 5%
LINALOL				
Ensaio	Parâmetro Analisado	Especificações		Resultados Obtidos
Precisão	Repetibilidade	DPR* ≤ 5%	15 µg/mL	4,82
			50 µg/mL	2,48
			230 µg/mL	1,20
	Entre-analistas	DPR* ≤ 5%	Analista A	3,75
			Analista B	
	Interdias	DPR* ≤ 5%	Dia 1	4,03
Dia 2			1,40	
Exatidão	Adição de padrão	Recuperação 95 a 105%	60 µg/mL	99,64
			100 µg/mL	99,30
			200 µg/mL	99,15
Robustez	Proporção da fase móvel	DPR* ≤ 5%		0,35
			Fluxo	DPR* ≤ 5%

FONTE: O Autor (2016)

NOTA: *DPR = desvio padrão relativo dos ensaios em triplicata

Os valores obtidos nas análises de precisão interdias e entre-analistas estão dispostos na Tabela 13, e foram obtidos com as mesmas condições experimentais e de laboratório, em dias consecutivos (interdias) com mesmo analista e com analistas diferentes (entre-analistas).

Os resultados apresentaram valores de DPR foram inferiores a 5%, demonstrando a repetibilidade e a precisão intermediária do método analítico empregado (ANVISA, 2003).

d) Exatidão

A exatidão foi avaliada usando um método de recuperação, o qual demonstrou valores de porcentagem de recuperação variando entre 99 % e 106 % (Tabela 13)

para os três níveis de concentração avaliados, o que caracteriza o método como exato, segundo preceitos do ICH (2005) e da ANVISA (2003).

e) Robustez

A avaliação da robustez do método teve por base os valores de DPR (%) obtidos a partir da alteração dos parâmetros de análise, fluxo isocrático (0,75 e 0,8 mL.min⁻¹) e proporção de acetonitrila na fase móvel (65% v/v e 70% v/v). Com relação a estes parâmetros, os valores de DPR foram inferiores a 5%, o que caracteriza o método como robusto conforme resumido na Tabela 13.

4.5.2 Quantidade de cinamato de metila e linalol incorporado nas micropartículas e eficiência de encapsulação

A quantidade de fármaco incorporado nas micropartículas ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) e a eficiência de encapsulação (EE%) das micropartículas flutuantes liofilizadas F8 (item 3.5.2) foram realizadas pelo método de CLAE/DAD-UV previamente validado e estão resumidas na Tabela 14.

TABELA 14 – QUANTIDADE DE CM E L INCORPORADO NAS MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

	Quantidade incorporada \pm DP ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Quantidade inicial ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)	EE (%)
CM	55,1 \pm 2,1	64,6	85,2
L	192,9 \pm 6,6	298,0	64,7

FONTE: O Autor (2016)

Neste trabalho, verificou-se que a eficiência de encapsulação para o cinamato de metila e o linalol foi de 85,2% e 66,7%, respectivamente. A eficiência de encapsulação de micropartículas obtidas pelo método de gelificação iônica pode aproximar-se de 100% (PIORNOS et al., 2017), porém normalmente encontra-se na faixa de 65 a 75% (PENICHE et al., 2004; CHAN 2011), valores condizentes com os encontrados neste trabalho.

Outros métodos usualmente utilizados para a obtenção de micropartículas contendo óleos incluem a emulsificação com evaporação de solvente e o por *spray-drying*. (CHAN, 2011; NOPPAKUNDILOGRAT et al., 2015). No entanto, devido a

temperatura utilizada nesses processos, as micropartículas produzidas costumam apresentar uma eficiência de encapsulação menor que as obtidas pelo método de gelificação iônica. (CHAN 2011; NOPPAKUNDILOGRAT et al., 2015; PIORNOS et al., 2017).

Trabalhos prévios apontam que fatores como a concentração da solução de alginato de sódio, o efeito do recobrimento de quitosana, a quantidade e as características físico-químicas do óleo encapsulado podem afetar a eficiência de encapsulação. (PENICHE et al., 2004; CHAN, 2011; SOLIMAN et al., 2013; BENAVIDES et al., 2016; PIORNOS et al., 2017).

As micropartículas de alginato de cálcio apresentam estrutura porosa, o que permite a rápida saída do óleo encapsulado. (RIBEIRO et al., 1999). A aplicação de um revestimento sobre as micropartículas, ou a utilização de uma mistura de polímeros pode reduzir a porosidade das micropartículas, evitando a saída do óleo. (SIMSEK-EGE; BOND; STRINGER, 2002; CALIJA et al., 2011; MENNINI et al., 2012).

Foi observado também que a concentração de alginato de sódio está diretamente relacionada com a eficiência de encapsulação. No entanto, a alta viscosidade da solução polimérica influencia negativamente a encapsulação. (PENICHE et al., 2004; CHAN, 2011; JEROBIN et al., 2012; PIORNOS et al., 2017).

De acordo com Peniche et al. (2004) e Benavides et al. (2016), a eficiência de encapsulação pode ser reduzida quando ocorre um aumento na quantidade de óleo a ser encapsulado. Micropartículas com alta concentração de óleo encapsulado apresentam maior quantidade de óleo superficial, que pode ser perdido por exsudação e/ou volatilização durante o processo de secagem, reduzindo assim a eficiência de encapsulação.

Neste trabalho, a eficiência de encapsulação do linalol foi menor que a do cinamato de metila, provavelmente devido a maior solubilidade em água do linalol. Jaiswal et al. (2009) e Jyothi et al. (2010) explicam que a solubilidade de uma substância encapsulada, em conjunto com o processo de obtenção de micropartículas, interferem diretamente na eficiência de encapsulação. Sendo assim, um fármaco hidrofílico tende a migrar facilmente para o meio aquoso ao seu redor, resultando na sua baixa incorporação e eficiência de encapsulação da micropartícula.

Portanto, as micropartículas flutuantes obtidas neste trabalho apresentaram valores de eficiência de encapsulação compatíveis com o método escolhido, a

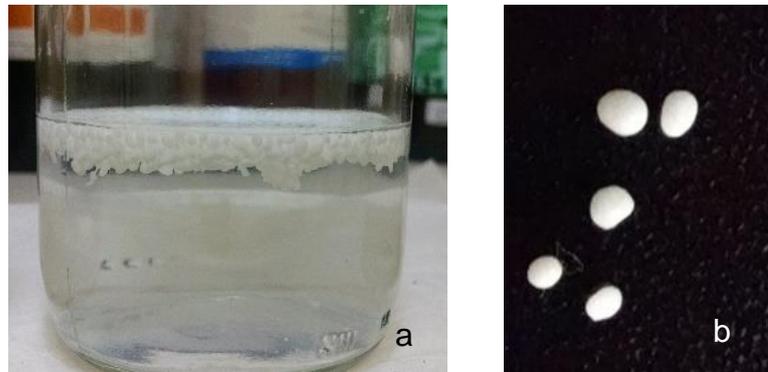
concentração e a viscosidade da solução polimérica, a quantidade de mistura CM-L na formulação e o recobrimento com quitosana.

4.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES

4.6.1 Análises Morfológica e de Superfície das Micropartículas Flutuantes

As micropartículas flutuantes F8 liofilizadas apresentaram formato arredondado e de tamanho aproximado de $1,728 \pm 0,232$ mm (Figura 30).

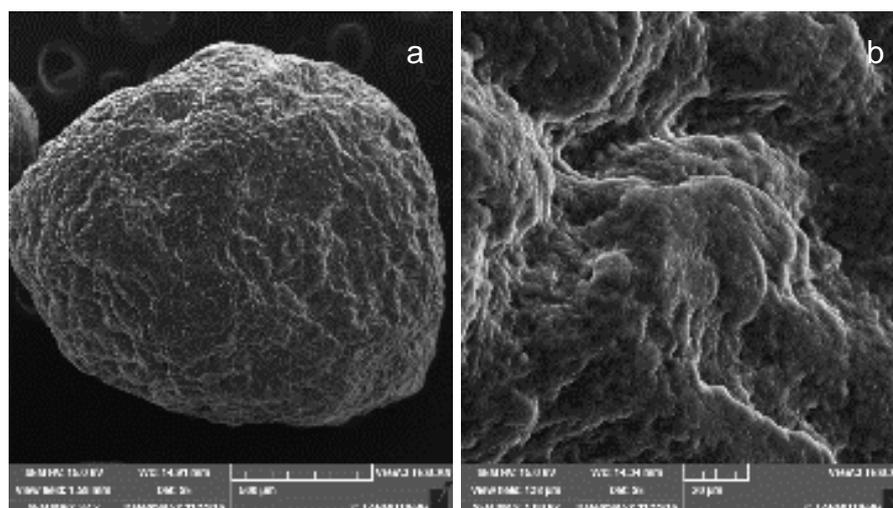
FIGURA 30 - MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES



FONTE: O Autor (2015)

Ao MEV, as micropartículas flutuantes F8 liofilizadas apresentaram formato esférico, com superfície rugosa (Figura 31). A presença de poros isolados na superfície foi observada, mesmo com o revestimento de quitosana.

FIGURA 31 - MICROPARTICULAS FLUTUANTES COM REVESTIMENTO DE QUITOSANA, EM MEV



FONTE: O Autor (2016)

NOTA: (a) aumento de 87x; (b) aumento de 1000x

Micropartículas flutuantes produzidas com a introdução de agentes formadores de gás na matriz polimérica são altamente porosas, sendo esta característica diretamente relacionada à fragilidade da estrutura, a flotabilidade e ao perfil de liberação das micropartículas. (CHOI et al., 2002; TU et al., 2005; CHAN et al., 2011; BISWAS; SAHOO, 2016).

A presença de poros na superfície das micropartículas facilita tanto a flotabilidade das micropartículas quanto a saída do material encapsulado. Assim, uma alta porosidade pode resultar em uma baixa eficiência de encapsulação e rápida liberação da substância ativa. (KRISHNAN et al., 2010; BISWAS; SAHOO, 2016). O recobrimento das micropartículas de alginato com quitosana permite a redução da porosidade das micropartículas, resultando na liberação mais sustentada do óleo e retenção de CO₂ na matriz polimérica, diminuindo a densidade das micropartículas e mantendo sua flotabilidade. (SAHASATHIAN; PRAPHAIRAKSIT; MUANGSIN, 2010).

Portanto, a presença de poros isolados nas micropartículas flutuantes corrobora com trabalhos prévios, sendo estes importantes para a manutenção da flotabilidade e liberação sustentada da mistura CM-L.

4.6.2 Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho

Nas Figuras 32 e 33 são apresentados os espectros obtidos para os polímeros isolados, os padrões de linalol e cinamato de metila e as micropartículas flutuantes. A

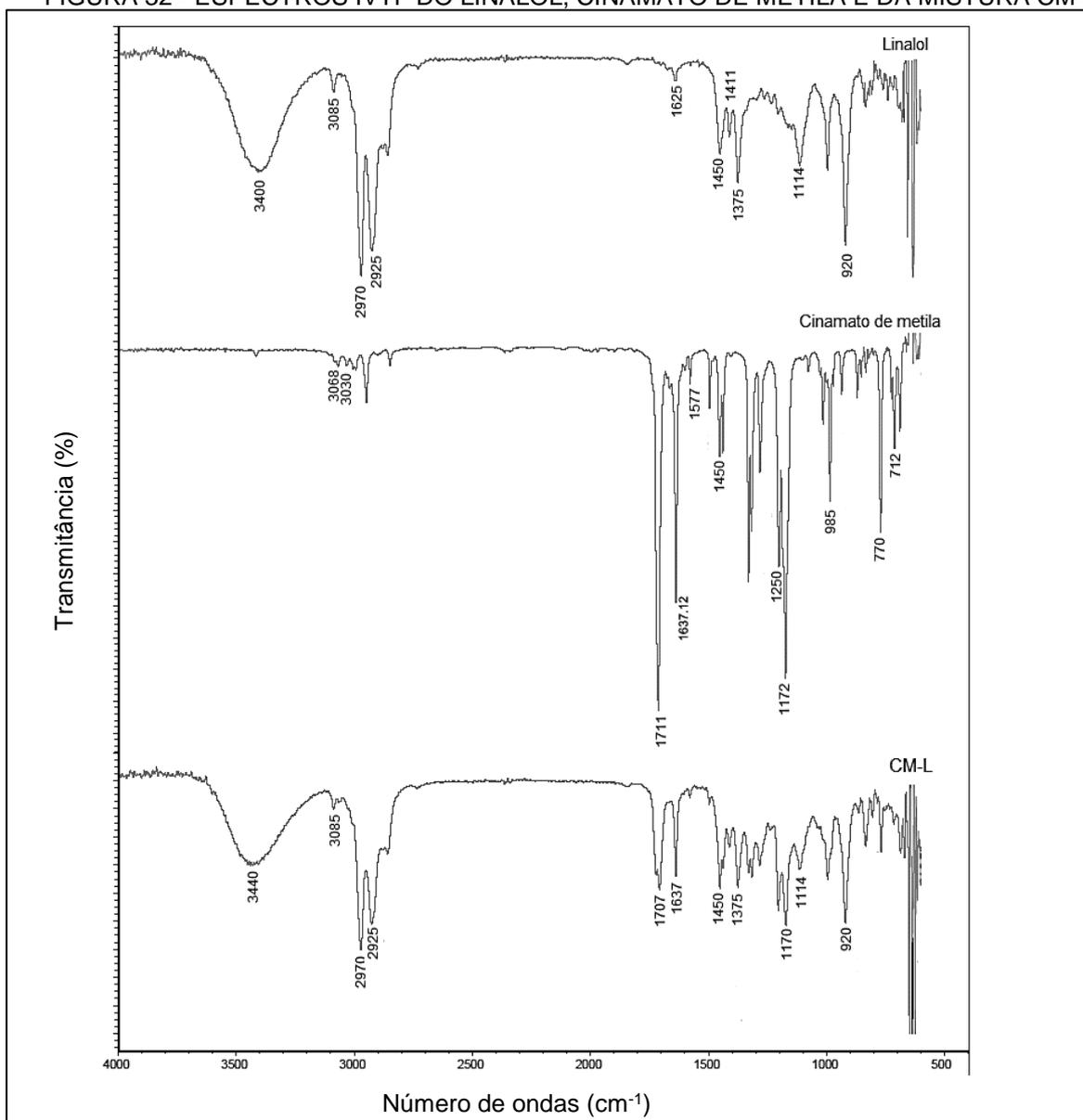
análise por espectroscopia IVTF foi realizada com o objetivo de avaliar possíveis interações entre os polímeros após a formação das micropartículas.

O espectro IVTF do padrão linalol apresentou forte banda de absorção em 3400 cm^{-1} atribuída ao estiramento OH. As bandas em 2970 e 2925 cm^{-1} são atribuídas aos estiramento C-H de alifáticos, enquanto o em 3085 cm^{-1} corresponde à ligação C-H vinílico. A banda fraca em 1625 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C=C e em 1450 e 1375 cm^{-1} aos estiramentos de CH_3 . Em 1411 cm^{-1} é possível visualizar uma banda fraca correspondente à deformação das ligações C-O-H, e em 920 e 1114 cm^{-1} os pontos ao estiramento C-O do grupo alcoólico. (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001; CHAAR, 2000; TELES, 2009).

O espectro IVTF do padrão cinamato de metila mostrou a presença de um grupo éster, com deformação axial em 1711 cm^{-1} referente ao grupo carbonila conjugado com alcenos e aromáticos, e duas bandas, uma em 1250 cm^{-1} e outra 1172 cm^{-1} correspondente à presença do grupo C-O de ésteres insaturados e aromáticos. A presença do anel aromático foi caracterizada pelas bandas em 1577 e 1450 cm^{-1} , correspondente às duplas ligações, e bandas fracas em 3068 e 3030 cm^{-1} relacionadas às ligações CH. A banda em 985 cm^{-1} indica uma p-substituição do anel aromático, que está relacionada também à presença das bandas em 770 e 712 cm^{-1} referente ao anel aromático monossustituído. (PAVIA; LAMPMAN; KRIS, 2001; SANTOS, 2010; SITRALLAH; MERZA, 2016).

A Mistura CM-L apresentou espectro semelhante ao linalol, seu composto majoritário, e as bandas características dos ésteres insaturados aromáticos.

FIGURA 32 - ESPECTROS IVTF DO LINALOL, CINAMATO DE METILA E DA MISTURA CM-L



FONTE: O Autor (2017)

O espectro IVTF do alginato de sódio mostrou banda larga em 3400 cm^{-1} referente aos grupos OH, em 2934 cm^{-1} devido as vibrações C-H, em 1600 e 1400 cm^{-1} devido as vibrações COOH assimétricas e simétricas e em 1030 cm^{-1} em decorrência das vibrações C-O-C. (SAHASATHIAN; PRAPHAIRAKSIT; MUANGSIN, 2010; NAYAK; DAS; MAJI, 2012; HOSSEINI et al., 2013).

O espectro IVTF da quitosana mostrou bandas na região de 3400 cm^{-1} , o qual corresponde ao estiramento dos grupos OH e NH sobrepostos; em 2875 cm^{-1} devido ao estiramento C-H; em 1630 cm^{-1} relacionados ao estiramento C=O da amida e em 1595 e 1380 cm^{-1} atribuídas às deformações NH₂ e C-H, respectivamente. (KRISHNA

RAO et al., 2006; DIMZON; KNEPPER, 2015; MÉNDEZ et al., 2017). A banda em 1150 cm^{-1} corresponde ao estiramento simétrico C-O-C, enquanto as bandas em 1070 cm^{-1} e 1020 cm^{-1} são associadas às vibrações de C-O. (ESPINOSA-ANDREWS et al., 2010).

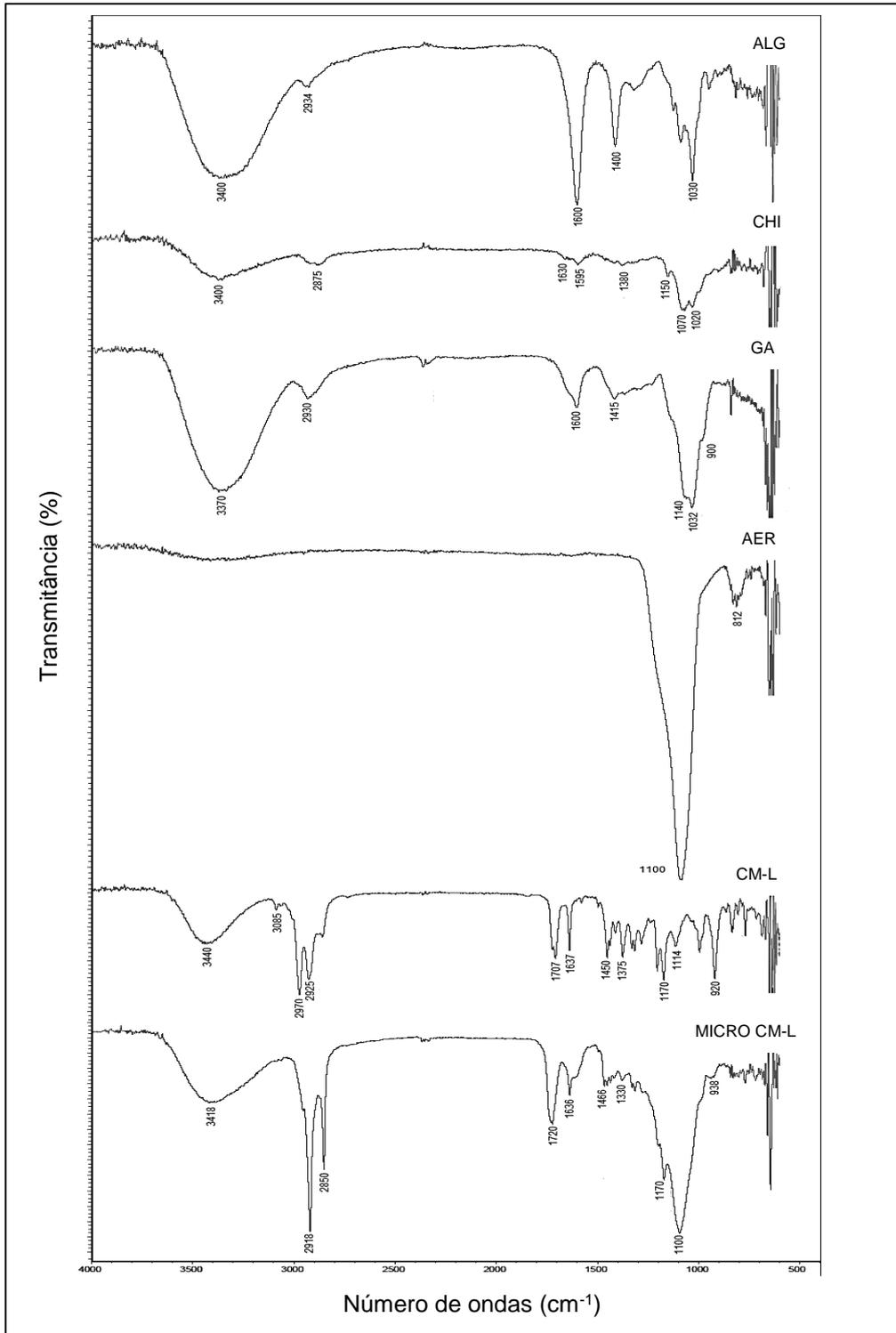
O espectro IVTF da goma arábica apresentou banda larga em 3370 cm^{-1} relativa às hidroxilas livres dos grupos terminais da D-galactose formados por L-arabinose e L-ramnose, e em 2930 cm^{-1} devido a presença dos açúcares e também aos estiramentos C-H. A goma apresenta banda característica em 1600 e 1400 cm^{-1} , as quais indicam os estiramentos C=O assimétrico e simétrico, respectivamente. (SINGH; SINGH, 2011; NAYAK; DAS; MAJI, 2012; QUINTANILHA, 2015). Uma banda larga entre 900 e 1150 cm^{-1} pode ser considerada a “impressão digital” da goma arábica, sendo o ombro em 1140 cm^{-1} atribuída ao estiramento C-O de arabinogalactanas e a banda em 1032 cm^{-1} relacionado à flexão OH dos ácidos glicurônicos. (SINGH; SINGH, 2011; QUINTANILHA, 2015; DAOUB et al., 2016).

A forte banda em 1100 cm^{-1} no espectro IVTF do Aerosil® 200 mostrou as intensas vibrações das ligações covalentes entre o silício e o oxigênio. Já o estiramento simétrico do Si-O-Si aparece em 800 cm^{-1} . (SMITHA et al., 2008; COSTA NETO, 2014).

O alginato de sódio e a goma arábica são polissacarídeos de natureza aniônica que apresentam grupos carboxílicos capazes de interagir com íons Ca^{+2} e NH^{+3} da quitosana. (PAULA et al., 2012; BUTSTRAEN; SALAÜN, 2014). O espectro das micropartículas com a Mistura CM-L apresentou banda larga característica a 3418 cm^{-1} relacionada aos grupos OH dos três polímeros, sobrepostas à banda de estiramento NH da quitosana. (NAYAK; DAS; MAJI, 2012; BUTSTRAEN, SALAÜN, 2014; CAETANO; ALMEIDA; GONÇALVES, 2016). Além disso, as bandas em 1595 , 1600 e 1400 cm^{-1} correspondentes aos grupos NH^{+3} , e vibração de estiramento -COO assimétrica e simétrica, respectivamente, desapareceram, indicando a interação entre os grupos NH^{+3} da quitosana e os grupos carboxila do alginato e da goma arábica. (ESPINOSA-ANDREWS et al., 2010).

As micropartículas flutuantes contendo a Mistura CM-L apresentaram ainda as bandas características do linalol (3400 , 2900 e 2850 cm^{-1}) e do cinamato de metila (1720 e 1636 cm^{-1}).

FIGURA 33 - ESPECTROS IVTF DOS POLÍMEROS, DA MISTURA CM-L E DAS MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES CONTENDO A MISTURA CM-L



FONTE: O Autor (2017)

NOTA: ALG = alginato de sódio

CHI = quitosana

GA = goma arábica

AER = Aerosil® 200

CM-L = Mistura cinamato de metila + linalol (1:4)

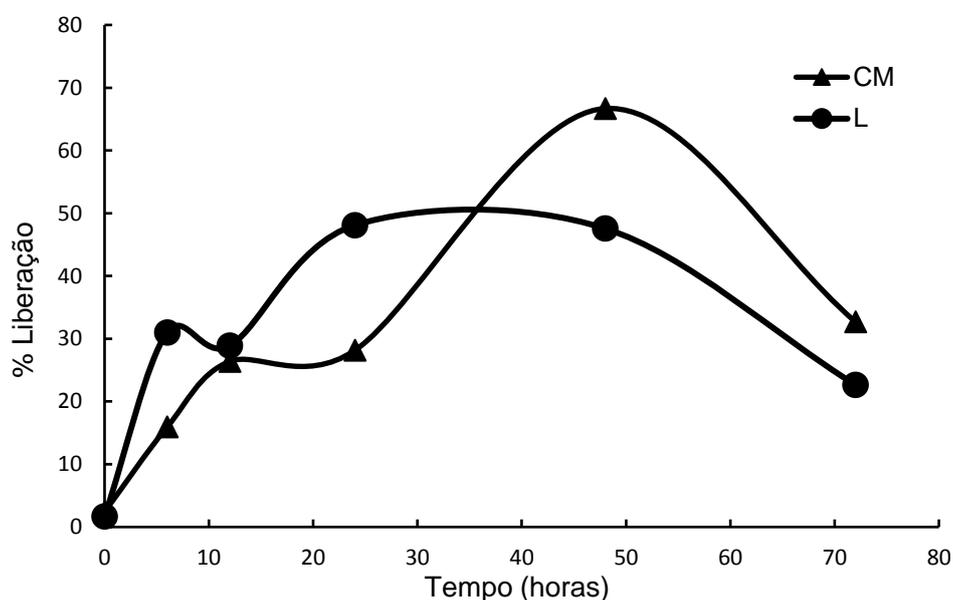
MICRO CM-L = micropartículas flutuantes contendo a Mistura CM-L

4.7 ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

O estudo de liberação de uma substância ativa em seu meio específico é necessário para compreender o comportamento de liberação e o mecanismo através do qual essa liberação ocorre. (HORST, 2009).

O perfil de liberação obtido para as micropartículas flutuantes F8 está apresentado no Gráfico 2.

GRÁFICO 2 – PERFIL DE LIBERAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES F8



FONTE: O Autor (2016)

As micropartículas flutuantes apresentaram liberação média de 66,7% de cinamato de metila e de 48% de linalol em 48 horas, tempo no qual as concentrações das substâncias atingiram o equilíbrio com o meio.

A liberação de um fármaco a partir de micropartículas pode ser afetada por fatores como as características físico-químicas das micropartículas e da substância encapsulada, e a interação polímero-substância encapsulada. (FREIBERG; ZHU, 2004; LOPES; LOBO; COSTA, 2005; LIRA, 2007).

Os resultados obtidos neste trabalho são similares aos encontrados por Paula e colaboradores (2010), que preparam micropartículas de alginato e de alginato com goma de cajueiro contendo óleo essencial de *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. As micropartículas atingiram seu patamar de liberação em 4 horas, liberando 57 e 32%

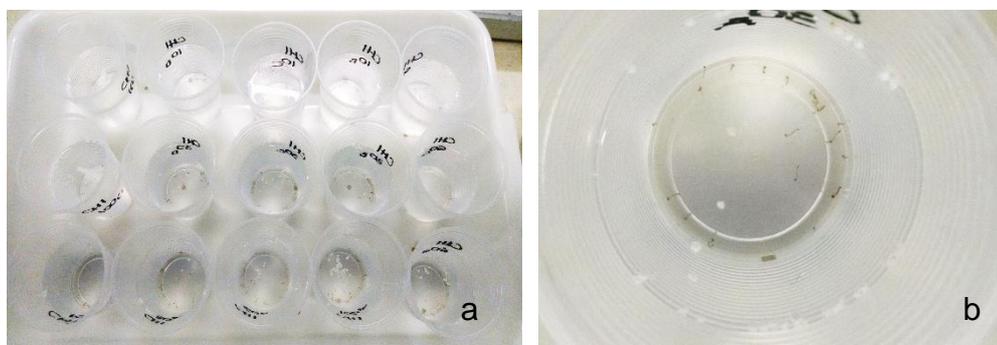
de óleo, respectivamente. Os pesquisadores atribuíram a baixa liberação de óleo a sua retenção parcial na porção hidrofóbica de micelas formadas durante o processo de emulsificação para a formação das micropartículas, as quais ficaram retidas na rede tridimensional do alginato de cálcio, dificultando a liberação do óleo em meio aquoso.

No entanto, apesar das micropartículas flutuantes contendo a mistura CM-L apresentarem liberação aquém da esperada, esta característica não interferiu em sua atividade larvívora, como discutido a seguir.

4.8 ATIVIDADE LARVÍVORA DA MISTURA CM-L MICROENCAPSULADA

A Figura 34a mostra uma visão ampla do teste realizado, enquanto na Figura 34b podemos observar larvas mortas de *A. aegypti* no fundo do copo quando submetidas ao tratamento com $0,60 \text{ mg.mL}^{-1}$ de micropartículas flutuantes contendo a mistura CM-L.

FIGURA 34 - ATIVIDADE LARVÍVORA DAS MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES CONTENDO A MISTURA CM-L SOBRE O *Aedes aegypti*. (a) VISÃO GERAL DO ENSAIO E (b) LARVAS MORTAS 24 HORAS



FONTE: O Autor (2015)

Os valores de CL_{50} e CL_{90} para as micropartículas flutuantes após 24 e 72 horas, expressos em miligramas (mg) de micropartículas flutuantes por mililitro (mL) de água estão dispostos na Tabela 15, sendo que não foi observada mortalidade de larvas com as micropartículas sem a mistura CM-L.

Após 72 horas de exposição, a mortalidade larval encontrada para concentrações a partir de $0,30 \text{ mg.mL}^{-1}$ foi superior a 85%. Este resultado indica que, apesar das micropartículas terem liberado seu conteúdo total em 48 horas, conforme

perfil de liberação mostrado no item 4.7, a sua presença no meio permite a manutenção da atividade larvicida por um período mais prolongado.

TABELA 15 - ATIVIDADE LARVICIDA DAS MICROPARTICULAS FLUTUANTES F8 SOBRE *Aedes aegypti* EM 24 E 72 HORAS

F8	Quantidade de MP (mg/mL)	Mortalidade (%) ± DP	CL ₅₀ (mg/mL) (95% IC)	CL ₉₀ (mg/mL) (95% IC)	x ²	(gl)
24 horas	0,1	2,5 ± 2,9	0,497 (0,258 - 0,786)	1,07 (0,697 - 4,54)	17,8	(3)
	0,3	18,75 ± 13,8				
	0,6	51,25 ± 10,3				
	1	91,25 ± 7,5				
	1,5	100,0				
72 horas	0,1	46,3 ± 16,5	0,108 (0,015 - 0,199)	0,466 (0,260 - 2,03)	9,9	(3)
	0,3	87,6 ± 13,2				
	0,6	86,5 ± 11,1				
	1	98,8 ± 2,5				
	1,5	100,0				

FONTE: O Autor (2016)

NOTA: Não foi observada mortalidade no grupo controle

LEGENDA:

MP = micropartículas flutuantes

CM = cinamato de metila

L = linalol

CM-L = CM e L em combinação (proporção 1:4)

DP = desvio-padrão

CL₅₀ = concentração capaz de matar 50% dos organismos expostos ao tratamento

CL₉₀ = concentração capaz de matar 90% dos organismos expostos ao tratamento

IC = intervalo de confiança

x² = qui-quadrado

gl = graus de liberdade

^aValores correspondem à média da quadruplicata ± DP

Ao extrapolar as concentrações de cinamato de metila e de linalol incorporados nas micropartículas flutuantes (de acordo com o item 4.5.2) e compararmos os valores de CL₅₀ para as substâncias livres e microencapsuladas, verificamos que as micropartículas ocasionaram a redução desses valores (Tabela 16).

Esses resultados corroboram com o trabalho de Paula et al. (2012), os quais observaram que micropartículas flutuantes contendo óleo de *Lippia sidoides* eram capazes de matar três vezes mais larvas do que micropartículas não flutuantes num período de até 48 horas.

TABELA 16 – VALORES DE CL₅₀ (µg.mL⁻¹) OBTIDOS PARA CM E L LIVRES E MICROENCAPSULADOS APÓS 24 HORAS

Amostra	Livre	Microencapsulada
	CL ₅₀ (µg.mL ⁻¹) (95% IC)	CL ₅₀ (µg.mL ⁻¹) (95% IC)
CM	35,4 (33,0 – 38,1)	27,4 (14,2 – 43,3)
L	275,2 (240,5 – 316,9)	95,8 (49,8 – 151,6)

FONTE: O Autor (2016)

NOTA: Não foi observada mortalidade no grupo controle

LEGENDA:

CM = cinamato de metila

L = linalol

CL₅₀ = concentração capaz de matar 50% dos organismos expostos ao tratamento

IC = intervalo de confiança

Assim, as micropartículas flutuantes contendo a mistura CM-L apresentaram efeito larvicida sobre o *Aedes aegypti*, promovendo ainda a atividade sustentada e redução nos valores de CL₅₀ do cinamato de metila e do linalol.

4.8.1 Alterações morfológicas das larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao tratamento com as micropartículas flutuantes

As larvas submetidas ao tratamento com as micropartículas apresentaram alterações morfológicas semelhantes à mistura CM-L não encapsulada (Figura 35).

As larvas do grupo controle apresentaram o corpo nitidamente dividido em cabeça, tórax e abdômen. Na Figura 35B foi possível observar o sistema traqueal opaco e escuro, e o intestino com conteúdo envolto pela membrana peritrófica e células intestinais. As papilas anais e sifão respiratório apresentaram características normais (Figura 35C).

As larvas submetidas ao tratamento com as micropartículas flutuantes contendo a mistura CM-L apresentaram alongamento dos segmentos, principalmente do cérvix (Figura 35D), inundação do sistema traqueal (Figura 35E) e extrusão do conteúdo intestinal juntamente com a membrana peritrófica (Figura 35F). Estes resultados são similares aos relatados por outros autores. (PROPHIRO, 2008; ACIOLE, 2009; GUARIDO, 2009; OLIVEIRA, 2015).

FIGURA 35 – ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NAS LARVAS DE *Aedes aegypti* SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM MICROPARTÍCULAS FLUTUANTES



FONTE: O Autor (2016)

NOTA: Grupo controle (A, B e C); larvas expostas às micropartículas flutuantes contendo a mistura CM-L apresentando alongamento de cervice (D), inundação traqueal e alongamento de segmentos; e extrusão do conteúdo intestinal envolto pela membrana peritrófica (F).

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho apresentou a toxicidade do linalol, do cinamato de metila e de uma mistura composta por cinamato de metila e linalol (CM-L), na proporção 1:4, sobre larvas de *Aedes aegypti*. Foram avaliadas também a atividade alelopática e a toxicidade *in vitro* pelo bioensaio com *Artemia salina* L. e pela atividade hemolítica das três substâncias. O cinamato de metila, o linalol e a mistura CM-L induziram alterações morfológicas nas larvas expostas a elas, mesmo em concentrações subletais, sendo os danos ao intestino médio e a inundação do sistema traqueal os principais mecanismos envolvidos na atividade larvicida, interferindo na sobrevivência e desenvolvimento das larvas.

O cinamato de metila demonstrou a maior atividade larvicida, porém apresentou também os maiores efeitos tóxicos nos ensaios *in vitro*. O linalol apresentou menor atividade larvicida e toxicidade nos ensaios de letalidade com *A. salina* e fitotoxicidade, porém apresentou maior potencial hemolítico. A mistura CM-L exibiu atividade larvicida moderada e baixa toxicidade nos testes preliminares *in vitro*, sugerindo sua utilização como alternativa aos larvicidas sintéticos.

Foram realizados estudos para otimização dos parâmetros do processo de obtenção das micropartículas. A determinação do EHL da mistura CM-L é um importante parâmetro para a formulação de uma emulsão estável, etapa inicial do processo de microencapsulação. A incorporação e o efeito de diferentes concentrações de polímeros na formulação foram avaliados em função da flotabilidade das micropartículas formadas, característica desejável para manutenção da mistura CM-L por maior período de tempo na superfície da água.

As micropartículas poliméricas flutuantes contendo a mistura CM-L foram obtidas com sucesso a partir da otimização dos parâmetros da formulação, sendo as denominadas F8, as que apresentaram as melhores características de flotabilidade.

Um método por CLAE/DAD-UV foi validado de acordo com as especificações da ICH (2005) e ANVISA (2003) para a quantificação de cinamato de metila e linalol liberados em água, o que possibilita não somente a quantificação dessas encapsuladas, mas também a presença dos resíduos dessas substâncias no ambiente aquático.

A eficiência de encapsulação média e o perfil de liberação do cinamato de metila e do linalol foram determinados a partir do método de quantificação validado.

As micropartículas flutuantes demonstraram atividade larvicida sobre as larvas de *Aedes aegypti* por até 72 horas, promovendo também a redução nos valores de CL₅₀ do cinamato de metila e do linalol em 24 horas.

Assim, os resultados obtidos neste trabalho indicam a possibilidade de uso da mistura CM-L como larvicida, em substituição aos pesticidas sintéticos, e que as micropartículas flutuantes são uma proposta viável para veiculação e aplicação da mistura em locais com água parada.

REFERÊNCIAS

- ABED, R. A. Alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pela atividade larvicida do óleo-resina da planta medicinal *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae). **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, p. 75-86, 2007.
- ABOU EL ELA, A. E. S. F.; HASSAN, M. A.; EL-MARAGHY, D. A. Ketorolac tromethamine floating beads for oral application: characterization and in vitro/in vivo evaluation. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 22, p. 349–359, 2014.
- ABOUELATTA, S. M. et al. Floating lipid beads for the improvement of bioavailability of poorly soluble basic drugs: In-vitro optimization and in-vivo performance in humans. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 89, p. 82–92, 2015.
- ACIOLE, S. D. G. **Avaliação da Atividade Inseticida dos Óleos Essenciais das Plantas Amazônicas Annonaceae, Boraginaceae e de Mata Atlântica Myrtaceae como Alternativa de Controle às Larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Anvisa registra primeira vacina contra dengue no Brasil**. Brasília, 2016. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-registra-primeira-vacina-contra-dengue-no-brasil/219201. Acessado em 10 de janeiro de 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**, 02 de junho de 2003.
- AHMED, M. M. Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium–sodium alginate microparticles. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 61–69, 2013.
- AKHTAR, M. S.; KHAN, M. A.; MALIK, M. T. Hypoglycaemic activity of *Alpinia galanga* rhizome and its extracts in rabbits. **Fitoterapia**, v. 73, p. 623–628, 2002.
- ALBERTINI, B. et al. Effect of AerosilR on the properties of lipid controlled release microparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 100, p. 233-246, 2004.
- ALCÂNTARA, J. M.; YAMAGUCHI, K. L.; VEIGA JÚNIOR, V. F. Composição química de óleos essenciais de espécies de *Aniba* e *Licaria* e suas atividades antioxidante e antiagregante plaquetária. **Química Nova**, v.33, p. 141-145, 2010.
- ALI, B. H.; ZIADA, A.; BLUNDEN, G. Biological effects of gum arabic: A review of some recent research. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1-8, 2009.

ALI, N. A. M. et al. Antimicrobial activity of *Cinnamomum Impressicostatum* and *C. pubescens* and bioassay-guided isolation of bioactive (E)-methyl cinnamate. **Journal of Biological Science**, v. 10, p. 101–106, 2010.

ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ALVES, M. C. S. et al. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.1083-1086, 2004.

ALVIANO, W. S. et al. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth Linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, p. 101-105, 2005.

AMAZONAS, D. R. **Variabilidade química e atividade antimicrobiana de espécimes indicados como pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) do oeste do Pará**. 70 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 2012.

AN, M.; PRATLEY, J. E.; HAIG, T. Phytotoxicity of *Vulpia* residues: III. Biological activity of identified allelochemicals from *Vulpia myuros*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, p. 383-394, 2001.

ANAND, B.; PISAL, S. S.; PARADKAR, A. R.; MAHADIK, K. R. Applications of organogels in pharmaceuticals. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 60, p. 311-318, 2001.

ANDRADE, M. A. **Óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke e *Siparuna guianensis* Aublet: composição química, caracterização das estruturas secretoras e avaliação do potencial biológico**. 227 f. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

ANDREO FILHO, N.; OLIVEIRA, A. G. Sistemas de micro/nanoencapsulação de fármacos. **Infarma**, Brasília, v. 9, n. 1/5, p. 18-21, 1999.

ANJOS, P. J. C. et al. Cardiovascular effects induced by Linalool in normotensive and hypertensive rats. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 68, p. 181-190, 2013.

ANNIES, V. et al. Avaliação do efeito de repelência do óleo essencial de *O. basilicum* L. e dos componentes majoritários frente ao *Aedes aegypti*. **35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2012.

APARÍCIO, R. M. et al. In vitro studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 1063–1067, 2005.

ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolism and regulation. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 207-225, 2010.

- BADAWY, M. E. I. et al. Larvicidal activity of temephos released from new chitosan/alginate/gelatin capsules against *Culex pipiens*. **International Journal of Mosquito Research**, v. 2, p. 45-55, 2015.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BANERJEE, A. et al. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, p. 134-139, 2008.
- BARRETO, C. F. et al. Estudo das alterações morfo-histológicas e larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponária* Lin (Sapindaceae). **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, p. 37-57, 2006.
- BASKETTER, D. A. et al. Investigation of the skin sensitizing activity of Linalool. **Contact Dermatitis**, v. 47, p. 161-164, 2002.
- BATHIA, S.P. et al. Fragrance material review on methyl cinnamate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. S113-S119, 2007.
- BATISTA, P. A. **Participação dos receptores glutamatérgicos e dos receptores de potencial transitório na ação antinociceptiva do (-) Linalol**. 100 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- BEDNARCZUK, V.O. et al. Tests *in vitro* and *in vivo* used in the toxicological screening of natural products. **Visão Acadêmica**, v.11, p. 43-50, 2010.
- BENAVIDES, S. et al. Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. **Food Chemistry**, v. 204, p. 77-83, 2016.
- BENELLI, G. et al. Larvicidal and repellent activity of the essential oil of *Coriandrum sativum* L. (Apiaceae) fruits against the filariasis vector *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 112, p. 1155-1161, 2013.
- BERA, H. et al. Alginate–sterculia gum gel-coated oil-entrapped alginate beads for gastroretentive risperidone delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 120, p. 74-84, 2015.
- BESERRA, E. B. et al. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia, série zoologia**, v. 99, p. 281-285, 2009.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, p. 504-507, 2013.
- BICKERS, D. et al. A toxicologic and dermatologic assessment of linalool and related esters when used as fragrance ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 919–942, 2003.

BIRNBAUM, D. T.; BRANNON-PEPPAS, L. Microparticle drug delivery systems. In: BROWN, D.M. (ed.) **Drug delivery systems in cancer therapy**. Totowa: Humana Press, p. 117-135, 2003.

BISWAS, N.; SAHOO, R. K. Tapioca starch blended alginate mucoadhesive-floating beads for intragastric delivery of Metoprolol Tartrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 83, p. 61-70, 2016.

BJORKMAN, Y. A. et al. Air-oxidized Linalool elicits eczema in allergic patients – a repeated open application test study. **Contact Dermatitis**, v. 70, p. 129-138, 2014.

BOUYER, E. et al. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, p. 359-378, 2012.

BRADY, O. J. et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, e1760, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela**. 2ª ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Vigilância em saúde: zoonoses. Série B. Textos Básicos de Saúde - Cadernos de Atenção Básica n. 22**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Febre pelo vírus Zika: uma revisão narrativa sobre a doença. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 26, 2015a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Reemergência da Febre Amarela Silvestre no Brasil, 2014/2015: situação epidemiológica e a importância da vacinação preventiva e da vigilância intensificada no período sazonal. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, nº 29, 2015b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica de ocorrência de microcefalias no Brasil, 2015. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 34, 2015c.

BRASIL. **Ministério da Saúde confirma relação entre vírus Zika e microcefalia**. Brasília, 2015d. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21014-ministerio-da-saude-confirma-relacao-entre-virus-zika-e-microcefalia>. Acessado em 06 de janeiro de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Nota Informativa nº 143/CGPNI/DEVIT/SVS/MS**. 2016a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2015. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 3, 2016b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança**. 5ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2016c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 3, 2017a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Febre Amarela: Situação Epidemiológica/Dados** 2017b. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-febre-amarela>. Acessado em: 01 de março de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública sobre Microcefalias. **Monitoramento dos casos de Microcefalia no Brasil**. Informe Epidemiológico, n. 57, 2017c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública sobre Febre Amarela. **Monitoramento dos casos de Microcefalia no Brasil**. Informe n. 31, 2017d.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 15, 2017. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 14, 2017e.

BRASILEIRO, J. S. L. **Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas**. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Lisboa, 2011.

BRUM, L. F. S. et al. Effects of linalool on glutamate release and uptake in mouse cortical synaptosomes. **Neurochemical Research**, v. 26, p. 191-194, 2001.

BRUNI, R. et al. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**, v. 85, p. 415-421, 2004.

BURGOS, L. **Avaliação das propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias do (-)-Linalol**. 49 f. Dissertação (Mestrado e Genética e Toxicologia) – Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2009.

BUSHRA, S.; TARIQ, M. Use of essential oils for the management of different species of dengue mosquito. **International Journal of Advances in Biology** v. 1, p. 29-41, 2014

BUTSTRAEN, C.; SALAÜN, F. Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum Arabic and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 608-616, 2014.

CAETANO, L. A.; ALMEIDA, A. J.; GONÇALVES, L. M. D. Effect of experimental parameters on alginate/chitosan microparticles for BCG encapsulation. **Marine Drugs**, v. 14, 2016. doi:10.3390/md14050090

CALIJA, B. et al. An investigation of formulation factors affecting feasibility of alginate-chitosan microparticles for oral delivery of naproxen. **Archives of Pharmaceutical Research**, v.34, p. 919-929, 2011.

CAMARGO, S. B.; VASCONCELOS, D. F. S. A. Atividades biológicas de Linalol: conceitos atuais e possibilidades futuras deste monoterpene. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, p. 381-387, 2014.

CANELLA, K. M. N. de C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel: influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v.24, p.13-17, 2001.

CARVALHO et al. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 569-571, 2003.

CARVALHO, E. B. et al. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrado de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, p. 149-152, 2007.

CASTRO, D. P. **Atividade inseticida de óleos essenciais de *Achillea millefolium* e *Tymus vulgaris* sobre *Spodoptera frugiperda* e *Schizaphis graminum***. 87 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

CAVALCANTI, E. S. B. et al. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 541-544, 2004.

CENTRO DE INFORMAÇÕES ESTRATÉGICAS EM VIGILÂNCIA EM SAÚDE (CENTRAL/CIEVS-SP). Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. **Nota Informativa: Febre pelo Zika vírus no Estado de São Paulo**. Maio, 2015.

CHAAR, J. S. **Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans**. 150 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

CHAITONG, U. et al. Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, v. 31, p. 138-144, 2006.

CHAN, E. S. Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 1267-1275, 2011.

CHAN, L. W.; LEE, H. Y.; HENG, P. W. S. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 259-262, 2002.

CHANG, C. P.; DOBASHI, T. Preparation of alginate complex capsules containing eucalyptus essential oil and its controlled release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 32, p. 257-262, 2003.

CHANG, M-Y.; SHEN, Y-L. Linalool Exhibits Cytotoxic Effects by Activating Antitumor Immunity. **Molecules**, v. 19, p. 6694-6706, 2014.

CHEN, Y. Y. et al. Methyl Cinnamate Inhibits Adipocyte Differentiation via Activation of the CaMKK2-AMPK Pathway in 3T3-L1 Preadipocytes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 955- 963, 2012.

CHENG, B.; SHEEN, L.; CHANG, S. Evaluation of anxiolytic potency of essential oil and S-(p)-linalool from *Cinnamomum osmophloeum* ct. linalool leaves in mice. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 5, p. 27-34, 2015.

CHENG, S. et al. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Technology**, v. 89, p. 99-102, 2003.

CHRISTENSSON, J. B. et al. Air-oxidized Linalool – a frequent cause of fragrance contact allergy. **Contact Dermatitis**, v. 67, p. 247-259, 2012.

CHOI, B. Y. et al. Preparation of alginate beads for floating drug delivery system: effects of CO₂ gas-forming agentes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 239, p. 81-91, 2002.

CHOPRA, M. et al. Alginate/gum acacia bipolymeric nanohydrogels—Promising carrier for zinc oxide nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 827-833, 2015.

CHUN, H.; KIM, C. H.; CHO, Y.H. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* DKL 109 using external ionic gelation method. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 34, p. 692-699, 2014.

COELHO, V. et al. Neurobehavioral and genotoxic evaluation of (-)-Linalool in mice. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, p. 876-880, 2013.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e Caracterização de Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural**. 268 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

CORBET, S. A. et al. Surface films as mosquito larvicides: partitioning the mode of action. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 94, p. 295-307, 2000.

CORBET, S. A. et al. Surfactant-enhanced essential oils as mosquito larvicides. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 75, p. 229-236, 1995.

CORNELSEN, P. A. Native and structurally modified gum arabic: exploring the effect of the gum's microstructure in obtaining electroactive nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 119, p. 35-43, 2015.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, v. 13, p. 500-506, 2011.

COSTA NETO, B. P. da. **Micropartículas de quitosana estruturadas com Aerosil®**: estabilidade, adsorção, encapsulação e liberação de substâncias ativas. 187 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

COSTA, Z. G. A. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, p. 11-26, 2011.

CRCAREVSKA, M. S.; DODOV, M. G.; GORACINOVA, K. Chitosan coated Ca-alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 565-578, 2008.

DALARMI, L. et al. Larvicidal activity of *Dalbergia brasiliensis* (Fabaceae - Papilionoideae) on *Aedes aegypti*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, p. 881-885, 2015.

DALL'AGNOL, E. C. et al. Microencapsulação do pesticida cipermetrina em blendas de P(3HB/PCL): caracterização e ensaio de liberação *in vitro*. **Polímeros**, v. 26, p. 269-276, 2016.

DAOUB, R. M. A. et al. Characterization and functional properties of some natural Acacia gums. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2016.05.002>

DEKKER, T. et al. Identification of mosquito repellent odours from *Ocimum forskolei*. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 1-7, 2011.

DENG VAXIA: pó liofilizado injetável. Responsável técnico Silvia Regina Brollo. Val de Reuil: SANOFI PASTEUR, 2015. 1 bula de remédio.

DEY, S. K. et al. Floating mucoadhesive alginate beads of amoxicillin trihydrate: A facile approach for *H. pylori* eradication. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 622-631, 2016.

DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. **Parasitology Research**, v. 113, p. 565-592, 2014.

DIAS, D. et al. Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 13, p. 31-37, 2017.

DIETRICH, F. et al. Utilização de inseticidas botânicos na agricultura orgânica de Arroio do Meio/RS. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.17, p.251-255, 2011.

DIMZON, I. K.; KNEPPER, T. P. Degree of deacetylation of chitosan by infrared spectroscopy and partial least squares. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 939-945, 2015.

DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (DIVE). **Guia de orientação para treinamento de técnicos de laboratório de entomologia**. Santa Catarina: 2008.

DOHNAL, J.; STEPANEK, F. Inkjet fabrication and characterization of calcium alginate microcapsules. **Powder Technology**, v. 200, p. 254-259, 2010.

DOMINGUES, G. S. et al. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, v. 31, p. 1966-1972, 2008.

DUFFY, M. R. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 2536-2543, 2009.

DURÁN, N. et al. Nanobiotechnology Solutions against *Aedes aegypti*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 1139-1149, 2016.

EDWARDS, M. J.; JACOBS-LORENA, M. Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, p. 1313-1320, 2000.

EL-SHIEKH, Y.W. A. et al. Antifungal activity of some Naturally Occurring Compounds against Economically Important Phytopathogenic Fungi. **Nature and Science**, v. 10, p. 114-123, 2012.

ESPINOSA-ANDREWS, H. et al. Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, 541–546, 2010.

FABRI, R. L. et al. Essential oil of *Mitracarpus frigidus* as a potent source of bioactive compounds. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, p. 1073-1080, 2012.

FAHELBUM, I. M. S.; JAMES, S. P. The absorption and metabolism of methyl cinnamate. **Toxicology**, v. 7, p. 123-132, 1977.

FERNANDES, C. P. et al. HLB value, an important parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.23, p.108-114, 2013.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, S. G. et al. An environmentally safe larvicide against *Aedes aegypti* based on in situ gelling nanostructured surfactant systems containing an essential oil. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 456, p. 190-196, 2015.

FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. Cambridge University Press: Cambridge, 1971.

FONSECA, L. S. da. Nanocapsule@xerogel microparticles containing sodium diclofenac: A new strategy to control the release of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 358, p. 292-295, 2008.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutic**, v. 218, p. 1-18, 2004.

FREITAS, A. M. P. **Estudo do efeito do ácido cinâmico e cinamato de metila no metabolismo glicolípídico em camundongos**. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

FUJIWARA, G. M. et al. Production and characterization of alginate-starch-chitosan microparticles containing stigmasterol through the external ionic gelation technique. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, p. 537-547, 2013.

FUJIWARA, G. M. **Microencapsulação de estigmasterol utilizando alginato de sódio, quitosana e amido**. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas**. 3ª ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), 2001.

FUNDUEANU, G. et al. Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. **Biomaterials**, v. 20, p. 1427-1435, 1999.

FURTADO, R. F. et al. Atividade larvicida dos óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 843-847, 2005.

GADAD, A. P. et al. Sodium alginate polymeric floating beads for the delivery of cefpodoxime proxetil. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 114, p. 1921-1926, 2009.

- GALLARDO, A.; PICOLLO, M. I.; MOUGABURE-CUETO, G. Lethal activity of individual and mixed monoterpenoids of geranium essential oil on *Musca domestica*. **Parasitology Research**, v. 114, p. 1229-1232, 2015.
- GANDHI, V. M.; CHERIAN, K. M. Red cell haemolysis test as an in vitro approach for the assessment of toxicity of karanja oil. **Toxicology In Vitro**, v. 14, p. 513-516, 2000.
- GOLDANI, L. Z. Yellow fever outbreak in Brazil, 2017. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, p. 123-124, 2017.
- GONSALVES, J. K. M. C. et al. Microencapsulação do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck pelo método da coacervação simples. **Scientia Plena**, v. 5, p. 1-8, 2009.
- GOUPALE, D. C.; RAJKAPOOR, B. Evaluation of Physical Stability of Oleogels Containing Diclofenac Diethylamine. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 2, p. 92-99, 2011.
- GOVINDARAJAN, M. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). **Experimental Parasitology**, v. 134, p. 7-11, 2013.
- GRISOTTI, M. Doenças infecciosas emergentes e a emergência das doenças: uma revisão conceitual e novas questões. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 15, supl. 1, p. 1095-1104, 2010.
- GRZYBOWSKI, A. et al. Synergistic larvicidal effect and morphological alterations induced by ethanolic extracts of *Annona muricata* and *Piper nigrum* against the dengue fever vector *Aedes aegypti*. **Pest Management Science**, v. 69, p. 589-601, 2013.
- GUAN, H. et al. Encapsulated ecdysone by internal gelation of alginate microspheres for controlling its release and photostability. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, p. 94–101, 2011.
- GUARIDO, M. M. **Atividade inseticida de extratos de *Annona foetida* Mart. (Annonaceae) sobre imaturos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- GUILHERME, L. R. G. et al. Contaminação de microbacia hidrográfica pelo uso de pesticidas. **Informe Agropecuário (Belo Horizonte)**, v. 21, p. 40-50, 2000.
- GUZMAN, M. G. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**. S7-S16, 2010.

HELDWEIN, C. G. et al. S-(+)-Linalool from *Lippia alba*: sedative and anesthetic for silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 41, p. 621-629, 2014.

HERZFELD, D.; SARGENT, K. **Private Pesticide Applicator Training Manual**. 19^a ed. Pesticide Safety and Environmental Education Program. University of Minnesota Extension. 2011. Cap. 4 Pesticide formulation. p. 85-108.

HIRSCH, M. M. **Obtenção e caracterização de formulações de liberação controlada de atrazina e avaliação dos perfis de liberação**. 87 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

HOFERL, M.; KRIST, S.; BUCHBAUER, G. Chirality influences the effects of Linalool on physiological parameters of stress. **Planta Medica**, v. 72, p.1188-1192, 2006.

HOFFMANN, C. E. F. et al. Atividade alelopática de *Nerium Oleander* L. e *Dieffenbachia picta* schott em sementes de *Lactuca Sativa* L. e *Bidens pilosa* L. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 6, p. 11-21, 2007.

HOLMBERG, K. et al. **Surfactants and Polymers in Aqueous Solution**. 2^a ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2002.

HORST, B. L. **Microencapsulação do corante natural antocianina em matriz polimérica de quitosana e quitosana/alginato através das técnicas de impregnação, coacervação e spray drying**. 102 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

HOSSEINI, S. M. et al. Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 582-588, 2013.

HOSSEINZADEH, H. et al. Effect of linalool on morphine tolerance and dependence in mice. **Phytotherapy Research**, v. 26, p. 1399-1404, 2012.

HUA, S.; YANG, H.; WAN, A. A pH-sensitive nanocomposite microsphere based on chitosan and montmorillonite with in vitro reduction of the burst release effect Chitosan/montmorillonite nanocomposite microspheres. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, p. 1106–1114, 2010.

HUANG, Q. S. et al. Inhibitory Effects of Methyl *trans*-Cinnamate on Mushroom Tyrosinase and Its Antimicrobial Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 2565-2569, 2009.

IBM CORPORATION. **IBM SPSS Statistics for Windows**, versão 23.0. Armonk, NY, 2015.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**, 2005.

INVIVO (2015). **Febre Chikungunya**. 04 de fevereiro de 2015. Disponível em: <http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1415&sid=8&tpl=printerview>. Acessado em 02 de setembro de 2015.

IOOS, S. *et al.* Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 44, p. 302-307, 2014.

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

JAISWAL, D. *et al.* Formulation and evaluation of oil entrapped floating alginate beads of ranitidine hydrochloride. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 1, S. 1, p. 128-140, 2009.

JANSEN, C. C.; BEEBE, N. W. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 272-279, 2010.

JANTAN, I. B. *et al.* Insecticidal activities of the leaf oils of eight *Cinnamomum* species against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, p. 526–532, 2005.

JEROBIN, J. *et al.* Biodegradable polymer based encapsulation of neem oil nanoemulsion for controlled release of Aza-A. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 1750-1756, 2012.

JUN, H. *et al.* Aromatic terpenoid Linalool is an agonistic ligand for PPAR α that reduces plasma triglyceride levels and rewires the hepatic transcriptome and plasma metabolome. **Journal of Lipid Research**, v. 55, p. 1098-1110, 2014.

JYOTHI, N. V. N. *et al.* Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, p. 187-197, 2010.

KAJALE, A. D.; CHANDEWAR, A. V. Formulation and evaluation of oral floating beads of tramadol hydrochloride. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**, v. 6, p. 7-16, 2016.

KANG, M. K.; DAI, J.; KIM, J. Ethylcellulose microparticles containing chitosan and gelatin: pH-dependent release caused by complex coacervation. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, p. 355–359, 2012.

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Química Nova**, v. 31, p. 134-143, 2008.

KHANH, T. D. *et al.* Weed-Suppressing Potential of Dodder (*Cuscuta hygrophilae*) and its Phytotoxic Constituents. **Weed Science**, v.56, p.119-127, 2008.

KIM, J.; SEO, S.; PARK, I. Nematicidal activity of plant essential oils and components from *Gaultheria fragrantissima* and *Zanthoxylum alatum* against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Nematology**, v. 13, p. 87-93, 2011.

KIM, S. et al. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Stored Products Research**, v. 39, p. 293- 303, 2003.

KIRILOV, P. et al. A new type of colloidal dispersions based on nanoparticles of gelled oil. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 328, p. 1-7, 2008.

KONG, J. et al. Nematicidal activity of Cassia and Cinnamon oil compounds and related compounds toward *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). **Journal of Nematology**, v. 39, p. 31-36, 2007.

KRISHNA RAO, K. S. V. et al. Novel chitosan-based pH-sensitive interpenetrating network microgels for the controlled release of cefadroxil. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 333-344, 2006.

KRISHNAN, S.; KSHIRSAGAR, A. C.; SINGHAL, R. S. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agente. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 309-315, 2005.

KRISHNAN, V. et al. Effect of pore forming agents on the physical characteristics and release kinetics of levofloxacin hemihydrate from floating alginate drug delivery system - an *in vitro* study. **Trends in Biomaterials & Artificial Organs**, v. 24, p. 139-145, 2010.

KUMAR, B. P. Microparticulate drug delivery system: a review. **Indian Journal of Pharmaceutical Science & Research**, v. 1, p. 19-37, 2011.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

KUMIRSKA, J. et al. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1567-1636, 2010.

KURODA, K. et al. Sedative effects of the jasmine tea odor and (R)-(-) Linalool, one of its major odor components, on autonomic nerve activity and mood states. **European Journal of Applied Physiology**, v. 95, p.107-114, 2005.

LAPCZYNSKI, A. et al. Fragrance material review on l-linalool. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, S195-S196, 2008.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, p. 89-121, 2000.

LEE, H. Y. et al. Influence of viscosity and uronic acid composition of alginates on the properties of alginate films and microspheres produced by emulsification. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, p. 192-227, 2006.

- LIMA, E. P. et al. Resistência do *Aedes aegypti* ao Temefós em municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 259-263, 2006.
- LIMA, F. J. B. et al. Antispasmodic and myorelaxant effects of the flavoring agente methyl cinnamate in gut: Potential inhibition of tyrosine kinase. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 192-199, 2014.
- LIMA-CAMARA, T. N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, p. 1-7, 2016.
- LINCK, V. M. et al. Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. **Phytomedicine**, v. 17, p. 679-683, 2010.
- LIRA, A. A. M. **Desenvolvimento, avaliação e caracterização de sistemas microestruturados para veiculação de ácido retinóico na pele**. 142 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- LONG, D.; LONG, B.; KOYFMAN, A. Zika vírus: what do emergency physicians need to know? **The Journal of Emergency Medicine**, v. 50, p. 832-838, 2016.
- LOPES, C. M.; LOBO, J. M.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 143-154, 2005.
- LOPES, N.; LINHARES, R. E. C.; NOZAWA, C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, p. 55-64, 2014.
- LÓPEZ, A. et al. Insecticidal activity of microencapsulated *Schinus molle* essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 209-216, 2014.
- LÓPEZ, C. R.; FERNANDEZ, A. M. J. Microencapsulacion. In: VILA JATO, J. L. **Tecnología Farmacéutica I: aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas**. Madrid: Sintesis, 2001. p. 577-608.
- LUCIA, A. et al. Sensitivity of *Aedes aegypti* adults (Diptera: Culicidae) to the vapors of Eucalyptus essential oils. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6083-6087, 2009.
- LUNA, E. J. A. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, p. 229-243, 2002.
- LUNKENBEIN, S. et al. Cinnamate metabolism in ripening fruit. Characterization of a UDPglucose; cinnamate glucosyltransferase from strawberry. **Plant Physiology**, v. 140, p. 1047-1058, 2006.

LUPO, B. et al. Preparation of alginate microspheres by emulsification/internal gelation to encapsulate cocoa polyphenols. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 56-65, 2014.

MACÍAS, F., CASTELLANO, D., MOLINILLO, J. M. G. Search for a Standard Phytotoxic Bioassay for Allelochemicals. Selection of Standard Target Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2512–2521, 2000.

MACORIS, M. L. G. Resistance of *Aedes aegypti* from the State of São Paulo, Brazil, to Organophosphates Insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 703-708, 2003.

MAGILL, M. Microencapsulamento. **Cosmetics & Toiletries**, v. 3, 1991.

MAHMOOD, S. A. I. **Dengue**: an epidemic is larged a failure in public health administration! The role of Dhaka City Corporation, DCC of Bangladesh. World Health & Population, 2006. Disponível em: <http://www.longwoods.com/product.php?productid=17900>. Acessado em 02 de setembro de 2015.

MAITI, S. et al. Analysis of cytotoxicity and genotoxicity on *E. coli*, human blood cells and *Allium cepa* suggests a greater toxic potential of hair dye. **Ecotoxicology and**

MALAKAR, J. et al. Floating capsules containing alginate-based beads of salbutamol sulfate: In vitro–in vivo evaluations. International Journal of Biological **Macromolecules**, v. 64, p. 181-189, 2014.

MARASCHIN, L. **Avaliação do grau de contaminação por pesticidas na água dos principais rios formadores do Pantanal Mato-Grossense**. 90 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente do Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2003.

MARQUES, F. A. et al. 2014. Composição pesticida, repelente, fungicida e vermífuga e uso da mesma. WO 2014094100 A2.

MASCARENHAS, M. C. C. N. **Utilização de surfactantes na produção de microencapsulados de óleo rico em ômega 3 por coacervação complexa com aplicação em emulsões**. 167 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

MASUDA, M. **Microencapsulation of Pesticides for Controlling Release from Coatings**. 71 f. Tese (Degree of Doctor of Philosophy) - Applied Surface Chemistry. Department of Chemical and Biological. Göteborg: Engineering Chalmers University of Technology, 2011.

MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. **Acta Tropica**, v. 166, p. 155-163, 2017.

McNAMEE, B.; O'RIORDAN, E. D.; O'SULLIVAN, M. Emulsification and Microencapsulation Properties of Gum Arabic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4551-4555, 1998.

MEDEIROS, C. H. et al. **Alelopatia do óleo essencial de diferentes espécies de manjeriço na germinação de tomate**. In: XVI Encontro de Pós-Graduação, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

MENDES, L. G. **Microencapsulação do corante natural de urucum: uma análise da eficiência da goma do cajueiro como material de parede**. 132 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

MÉNDEZ, P. A. et al. Chitosan/OA nanoparticle as delivery system for celecoxib: Parameters affecting the particle size, encapsulation, and release. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, p. 1-11, 2017.

MENEZES, E. L. A. **Inseticidas Botânicos: Seus Princípios Ativos, Modo de Ação e Uso Agrícola**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 58p.

MENNINI, N. et al. Quality by design approach for developing chitosan-Ca-alginate microspheres for colon delivery of celecoxib-hydroxypropyl- β -cyclodextrin-PVP complex. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, p. 67-75, 2012.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MONTEIRO, F. J. C. **Monitoramento da dispersão de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) e da dengue no município de Macapá, Amapá, Brasil**. 78 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade Tropical) – Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2014.

MUKUND, J. Y.; KANTILAL, B. R.; SUDHAKAR, R. N. Floating microspheres: a review. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 17-30, 2012

MURUGAN, K. Fabrication of nano-mosquitocides using chitosan from crab shells: Impact on non-target organisms in the aquatic environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 132, p. 318-328, 2016.

NADAL, J. M. **Desenvolvimento tecnológico, caracterização e avaliação *in vitro* e *in vivo* de sistemas poliméricos contendo ácido ferúlico**. 248 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

NARUSUYE, K. et al. Linalool suppresses voltage-gated currents in sensory neurons and cerebellar Purkinje cells. **Journal of Neural Transmission**, v. 112, p. 193-203, 2005.

NAYAK, A. K.; DAS, B.; MAJI, R. Calcium alginate/gum Arabic beads containing glibenclamide: Development and in vitro characterization International Journal of Biological Macromolecules, v. 51, p. 1070-1078, 2012.

NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**, v.101, p.372-378, 2010.

NEVES, A. L. P. et al. Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 445, p. 34-39, 2014.

NOGUEIRA SOBRINHO, A. C. et al. Chemical composition, antioxidant, antifungal and hemolytic activities of essential oil from *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. (Asteraceae). **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 108-115, 2016.

NOPPAKUNDILOGRAT, S. et al. Encapsulated eucalyptus oil in ionically cross-linked alginate microcapsules and its controlled release. **Carbohydrate Polymers** v. 131, p. 23–33, 2015.

NOUR, A. H. et al. A Study of the essential oils of four Sudanese accessions of basil (*Ocimum basilicum* L.) against *Anopheles* mosquito larvae. **American Journal of Applied Sciences**, v. 6, p. 1359-1363, 2009.

NUNES, B. S. et al. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, v.144, p. 453-462, 2006.

NYASEMBE, V. O. et al. Development and assessment of plant-based synthetic odor baits for surveillance and control of malaria vectors. **PLoS ONE**, v. 9, p. 898-18, 2014.

OCAMPO, C. B. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. **Acta Tropica**, v. 118, p. 37-44, 2011.

OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveillance**, v. 19, p. 1-3, 2014.

OLIVEIRA, C. F. **Morfoanatomia, caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas de *Psychotria fractistipula* L.B. Sm., Klein & Delprete (Rubiaceae)**. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

ORAFIDIYA, L. O.; OLADIMEJI, F. A. Determination of the required HLB values of some essential oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 237, p. 241-249, 2002.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **SIDS initial assessment report for SIAM 14: Linalool**. 2002. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/78706.pdf>. Acessado em: 23 maio de 2013.

PANDA, D. et al. Design of floating drug delivery systems: an update on polymeric advancements with special reference from natural origin. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 39, p. 125-132, 2016.

PANDADR, P. et al. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. **Science of the Total Environment**, v. 363, p. 114-125, 2006.

PANDEY, S. K. et al. Structure–activity relationships of monoterpenes and acetyl derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Pest Management Sciences**, v. 69, p. 1235–1238, 2013.

PANT, M. et al. Encapsulation of neem and karanja oil mixture for synergistic as well as larvicidal activity for mosquito control. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 71, p. 348-352, 2012.

PARANÁ. SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE (SESA-PR). Situação da Dengue, Chikungunya e Zika vírus no Paraná - 2016/2017. **Informe técnico 38**, 2017. Disponível em: http://www.dengue.pr.gov.br/arquivos/File/boletimdengue_160517.pdf. Acessado em: 15 de maio de 2017.

PARANAGAMA, P. A. et al. A comparison of essential oil constituents of bark, leaf, root and fruit of cinnamon (*Cinnamomun zeylanicum* Blum) grown in Sri Lanka. **Journal of Natural Science Foundation of Sri Lanka**, v. 29, p. 147-153, 2001.

PASQUALIM, P. et al. Microcápsulas de alginate de cálcio e óleo vegetal pela técnica de gelificação iônica: um estudo da capacidade de encapsulamento e aplicação dermatológica. **Visão Acadêmica**, v.11, p. 23-37, 2010.

PASSI, D. et al. Zika Virus Diseases – The New Face of an Ancient Enemy as Global Public Health Emergency (2016): Brief Review and Recent Updates. **International Journal of Preventive Medicine**, 2017. Doi: 10.4103/2008-7802.199641

PATEL, M. A. et al. The effect of ionotropic gelation residence time on alginate cross-linking and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 362–371, 2017.

PATIL, P.; JOSHI, P.; PARADKAR, A. Effect of formulation variables on preparation and evaluation of gelled self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) of ketoprofen. **AAPS PharmSciTech**, v. 5, p. 1-8, 2004.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GAGRG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: emerging arboviruses in the New World. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. 17, p. 671-679, 2016.

PAULA, H. C. B. et al. Esferas (Beads) de Alginato como Agente Encapsulante de Óleo de Croton Zehntneri Pax et Hoffm. **Polímeros**, v. 20, p. 112-120, 2010.

PAULA, H. C. B. et al. Alginate/ cashew gum floating bead as a matrix for larvicide release. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, p. 1421-1427, 2012.

PAULA, H. C. B. et al. Preparation and characterization of chitosan/cashew gum beads loaded with *Lippia sidoides* essential oil. **Materials Science and Engineering C**, v.31, p.173–178, 2011.

PAULA, H. C. B.; PAULA, R. C. M.; BEZERRA, S. K. F. Swelling and Release Kinetics of Larvicide-Containing Chitosan/Cashew Gum Beads. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 102, p. 395-400, 2006.

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 174-187, 2015.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy: A guide for students of organic chemistry**. 3^a ed. Thomsom Learning, 2001.

PAZ, F. A. Z.; BERCINI, M. A. Doenças emergentes e reemergentes no contexto da saúde pública. **Boletim Saúde**, v. 23, p. 9-13, 2009.

PEANA, A. T. et al. Effects of (-)-Linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageen an, L-glutamate and prostaglandin E2. **European Journal of Pharmacology**, v. 485, p. 165-174, 2004.

PEANA, A. T. et al. (-)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. **Life Sciences**, v. 78, p.719-723, 2006.

PENICHE, C. et al. Formation and stability of shark liver oil loaded chitosan/calcium alginate capsules. **Food Hydrocolloids**, v.18, p. 865-871, 2004.

PEREIRA, A. G. S. **Estudo analítico e avaliação da atividade larvicida da mistura dos óleos essenciais das folhas da *Pimenta dióica* Lindl e dos galhos de *Aniba duckei* Kostermans frente ao mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)**. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2009.

PERETTO, G. et al. Optimization of Antimicrobial and Physical Properties of Alginate Coatings Containing Carvacrol and Methyl Cinnamate for Strawberry Application. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 984-990, 2014.

PETCHSOMRIT, A.; SERMKAEW, N.; WIWATTANAPATAPEE, R. Effect of alginate and surfactant on physical properties of oil entrapped alginate bead formulation of curcumin. **International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering**, v. 7, p. 864-868, 2013.

PETERSON, C. J.; TSAO, R.; EGGLE, A. L.; COATS, J. R. Insecticidal Activity of Cyanohydrin and Monoterpenoid Compounds. **Molecules**, v. 5, p. 648-654, 2000.

PIACENTINI, E. et al. Microencapsulation of oil droplets using cold water fish gelatine/gum arabic complex coacervation by membrane emulsification. **Food Research International**, v. 53, p. 362-372, 2013.

PINHO, J. P. M. et al. Antinociceptive and antispasmodic effects of the essential oil of *Ocimum micranthum*: Potential anti-inflammatory properties. **Planta Medica**, v. 78, p. 681-685, 2012.

PIORNOS, J. A. et al. Highly efficient encapsulation of linseed oil into alginate/lupin protein beads: Optimization of the emulsion formulation. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 139-148, 2017.

POKHREL, S.; YADAV, P. N.; ADHIKARI, R. Applications of Chitin and Chitosan in Industry and Medical Science: A Review Shanta. **Nepal Journal of Science and Technology**, v. 16, p. 99-104, 2015.

PONCELET, D. Microencapsulation: fundamentals, methods and applications. **Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science**, parte 1, p. 23-34, 2006. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/kv2k46g687k21467/96>, 2009.

PRABAKARAN, G.; PADMANABHAN, V.; BALARAMAN, K. Development of a self floating slow release formulation of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis and its larvicidal activity. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 39, p. 82-84, 2001.

PRAKASH, B. et al. Efficacy of chemically characterized *Ocimum gratissimum* L. essential oil as na antioxidant and a safe plant based antimicrobial against fungal and aflatoxin B1 contamination of spices. **Food Research International**, v. 44, p. 385–390, 2011b.

PRAKASH, B. et al. Safety assessment of *Zanthoxylum alatum* Roxb. essential oil, its antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activity and efficacy as antimicrobial in preservation of *Piper nigrum* L. fruits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 183-191, 2011a.

PROCÓPIO, T. F et al. *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. **Plos One**, v. 10, e0126612, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0126612.

PROPHIRO, J. S. **Susceptibilidade de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) a organofosforado e a atividade inseticida de produtos de origem botânica.** 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Univesidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

QUINTANILHA, R. C. **A utilização de goma arábica como agente estabilizante de nanocompósitos de poli(anilina).** 146 f. Tese (Doutorado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

RACOVITA, S. et al. Polysaccharides based on micro and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 54, p. 709-718, 2009.

REIS, C. P. et al. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginates particles. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, p. 245-257, 2006.

REKHA, B. et al. *In-Vitro* Pharmacological Activity of Essential Oil –Linalool from *Jasminum polyantham*. **Pharmacology & Toxicology Research**, v. 1, p. 1-6, 2014.

RESENDE, J. M. V. **Óleo essencial de *Lychnophora pinastra* March.: caracterização química, atividade antibacteriana, antifúngica, antiocrotaxinogênica e hemolítica**. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

RIBEIRO, A. J. et al. Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 187, p. 115-123, 1999.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymers Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.

ROCHA, D. S. **Ação antiespasmódica do Linalol sobre músculo liso de traqueia isolada de ratos**. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

RODRIGUES, K. M. S. **Ação do Linalol sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos**. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

ROGERS, D. J. The global distribution of yellow fever and dengue. **Advances in Parasitology**, v. 62, p. 181-220, 2006. doi:10.1016/S0065-308X(05)62006-4.

ROSA, M. do S. S. et al. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 6, p. 1895-1901, 2003.

ROSADO, L.D.S. et al. Alelopatia do extrato aquoso e do óleo essencial de folhas do manjeriço “Maria Bonita” na germinação de alface, tomate e melissa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, p.422-428, 2009.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6. Ed. Londres: Pharmaceutical Press: 2009.

SAGIRI, S. S. et al. Core–shell-type organogel–alginate hybrid microparticles: a controlled delivery vehicle. **Chemical Engineering Journal**, v. 264, p. 134-145, 2015.

SAHASATHIAN, T.; PRAPHAIRAKSIT, N.; MUANGSIN, N. Mucoadhesive and floating chitosan-coated alginate beads for the controlled gastric release of amoxicillin. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, p. 889-899, 2010.

SANCTIS, D. S. Emulsões para uso externo. **Revista Racine**, v. 9, p. 53-62, 1999.

SANTOS, A. J. **Nanocompósitos contendo óleo essencial de *Syzygium aromarticum* : obtenção, caracterização e atividade larvicida contra o *Aedes aegypti***. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2014.

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas: uma alternativa viável. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, ano 3, 2000.

SANTOS, D. C. **Estudo químico do extrato hexânico e avaliação da atividade biológica dos extratos orgânicos da própolis marrom clara e escura da Bahia**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

SANTOS, F. **Aplicação de pesticidas em agricultura**. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2000.

SANTOS, Z. M. et al. Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 2591-2595, 2009.

SANYAOLU A. et al. Chikungunya Epidemiology: A Global Perspective. **SM Journal of Public Health and Epidemiology**, v.2, p.1028-1034, 2016.

SATYAL, P. et al. Bioactivities and Compositional Analyses of *Cinnamomum* Essential Oils from Nepal: *C. camphora*, *C. tamala*, and *C. glaucescens*. **Natural Product Communications**, v. 8, p. 1777-1784, 2013.

SCHOUBBEN, A. et al. Development of a scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, p. 363-369, 2010.

SELVAKUMARAN, S.; MUHAMAD, I. I. Optimization of formulation of floating hydrogels containing gas forming agente using response surface methodology. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 526-530, 2014.

SENHORINI, G. A. **Micropartículas poliméricas de PHBV e emulsões contendo extrato vegetal de *Carapa guianensis*: desenvolvimento, caracterização e aplicação**. 105 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SHAO, Q. et al. Hindgut innate immunity and regulation of fecal microbiota through melanization in insects. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 14270-14279, 2012.

SHARMA, P. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 403-423, 2011.

SHARMA, P.; SHARMA, J. D. In vitro hemolysis of human erythrocytes - by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 239-243, 2001.

SIGNINI, R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Características e propriedades de quitosanas purificadas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 2, p. 58-64, 2001.

SIGNORINI, C. B. et al. Ação alelopática dos óleos essenciais de duas espécies de manjerição sobre germinação de alface (*Lactuca sativa*). In: **XVI Encontro de Pós-Graduação**, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

SILVA FILHO, C. R. M. da et al. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L. Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p.919- 923, 2009.

SILVA, B. C. da. **Estudo físico-químico das propriedades emulsificantes dos polissacarídeos de goma acácia negra oriunda de plantações brasileiras**. 66 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 39, p. 1-20, 2003.

SILVA, E. R.; OVERBECK, G. E.; SOARES, G. L. G. Phytotoxicity of volatiles from fresh and dry leaves of two Asteraceae shrubs: Evaluation of seasonal effects. **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 14–18, 2014.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SILVA, W. J. et al. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3251–3255, 2008.

SIMAS, N. K. et al. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenoides e fenilpropanoides. **Química Nova**, v. 27, p. 46-49, 2004.

SIMÕES, M. S. Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando alface. **Revista Biotemas**, v. 26, p. 29-36, 2013.

SIMPSON, N. E. et al. The role of the CaCl₂-guluronic acid interaction on alginate encapsulated β TC3 cells. **Biomaterials**, v. 25, p. 2603-2610, 2004.

SIMSEK-EGE, F. A.; BOND, G. M.; STINGER, J. Polyelectrolyte complex formation between alginate and chitosan as a function of pH. **Journal of Applied Polymer Science**, v.88, p.346-351, 2003.

SINGH, H. P. et al. Comparative phytotoxicity of four monoterpenes against *Cassia occidentalis*. **Annals of Applied Biology**, v. 141, p. 111-116, 2002.

SINGH, V.; SINGH S. K. Synthesis and characterization of gum acacia inspired silica hybrid xerogels for Mercury (II) adsorption. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p. 445-451, 2011.

SIQUEIRA, R. J. et al. Linalool-rich rosewood oil liduces vago-vagal bradycardic and depressor reflex in rats. **Phytotherapy Research**, v. 28, p. 42-48, 2014.

SIQUEIRA-MOURA, M. P. et al. Gelled oil particles: A new approach to encapsulate a hydrophobic metallophthalocyanine. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 401, p. 155–160, 2013.

SITRALLAH, S.; MERZA, J. Isolation and Identification of Methyl cinnamate from Syrian *Ocimum basilicum*. **Chemistry and Materials Research**, v. 8, p. 13-19, 2016.

SKOLD, M. et al. Studies on the autoxidation and sensitizing capacity of the fragrance chemical Linalool, identifying a Linalool hydroperoxide. **Contact Dermatitis**, v. 46, p. 267-272, 2002.

SMITHA, S. et al. Sol-gel synthesis of biocompatible silica-chitosan hybrids and hydrophobic coatings. **Journal of Material Research**, v. 23, p. 2053-2060, 2008.

SOARES, B. V. et al. Antifungal activity, toxicity and chemical composition of the essential oil of *Coriandrum sativum* L. fruits. **Molecules**, v.15, p. 8439-8448, 2012.

SOKOVIC, M. et al. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. **Molecules**, v. 15, p. 7532-7546, 2010.

SOLIMAN, E. A. et al. Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and in Vitro Evaluation of Antifungal Activity. **Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences**, v. 3, p. 48-55, 2013.

SOPEÑA, F.; MAQUEDA, C.; MORILLO, E. Controlled release formulations of herbicides based on micro-encapsulation. **Ciência e Investigación Agraria**, v. 36, p. 27-42, 2009.

SOUZA, A. C. R. **Contribuição para o uso da goma de cajueiro como um insumo industrial**. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

SOUZA, C. R. F.; FERRAZ-FREITAS, P. N.; OLIVEIRA, W. P. Complexos de inclusão binários, terciários e quaternários contendo óleo essencial de *Lippia sidoides*. **Química Nova**, v. 39, p. 979-986, 2016.

SOUZA, K. S. et al. Atividade biológica de extratos, hidrolatos e óleos voláteis de pau-rosa (*Aniba duckei* Kostermans) e quantificação do linalol no hidrolato de folhas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, p.1-7, 2007.

SOUZA, T. M. et al. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* of m-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds. **Pest Management Science**, v. 68, p. 1380-1384, 2012.

SPIN-NETO, R.; PAVONE, C.; FREITAS, R. M.; MARCANTONIO, R. A. C.; MARCANTONIO-JÚNIOR, E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 37, p. 155-161, 2008.

STORPIRTIS, S. et al. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2009.

SUAVE, J. et al. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, Joinville, v. 7, p. 12-20, dez. 2006.

TADROS, T. F. Disperse systems in pesticidal formulations. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 32, p. 205-234, 1990.

TANKAM, J. M.; ITO, M. Inhalation of the Essential Oil of *Piper guineense* from Cameroon Shows Sedative and Anxiolytic-Like Effects in Mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, p. 1608-1614, 2013.

TELES, R. de M. **Caracterização química, avaliação térmica e atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* do óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans**. 97 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

TEWTRAKUL, S. et al. Chemical components and biological activities of volatile oil of *Kaempferia galanga* Linn. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, supl. 2, p. 503-507, 2005.

TIWARY, M. et al. Chemical composition and larvicidal activities of the essential oil of *Zanthoxylum armatum* DC (Rutaceae) against three mosquito vectors. **Journal of Vectors and Borne Diseases**, v. 44, 198-204, 2007.

TREVISAN, R. R. et al. Avaliação da atividade fitotóxica com enfoque alelopático do extrato das cascas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent Ulmaceae e purificação de dois triterpenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14 p.494-499, 2012.

TRIBOLI, E. P. R. **Estudo e otimização de processo de secagem de iogurte por atomização com secador em escala piloto**. 340 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

TU, J. et al. Alginate microparticles prepared by spray-coagulation method: preparation, drug loading and release characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 303, p.171-181, 2005.

VAID, S. et al. Allelopathic effect of linalool against *Parthenium hysterophorus* L. **International Journal of Bioscience Report**, v.1, p.76-81, 2005.

VELLOSO, F. T. **Desenvolvimento e caracterização de microcápsulas de alginato/quitosana contendo ácido retinoico e óleo de babaçu**. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

VIEIRA, P. R. N. et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from *Ocimum* species. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 267–271, 2014.

VOKOU, D. et al. Effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, p. 2281-2301, 2003.

WAN, L. S. C.; HENG, P. W. S.; CHAN, L. W. Surfactant effects on alginate microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 103, p. 267-275, 1994.

WITTAYA-AREEKUL, S.; KRUEENATE, J.; PRAHSARN, C. Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 312, p. 113-118, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides**. Genebra: 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Genebra: 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **A global brief on vector-borne diseases**. Genebra: 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chikungunya. **Fact Sheet**, nº 327. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>. Acessado em 02 de setembro de 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Microcephaly. **Fact Sheet**. 2016a. Disponível em: <http://who.int/mediacentre/factsheets/microcephaly/en/>. Acessado em 14 de fevereiro de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Yellow fever. **Fact Sheet**. 2016b. Disponível em: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>. Acessado em 14 de fevereiro de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WESTERN PACIF REGION (WPRO). Zika virus. **Fact Sheet**. 18 de maio de 2015. Disponível em: http://www.wpro.who.int/mediacentre/factsheets/fs_05182015_zika/en/. Acessado em 02 de setembro de 2015.

WU, Q. et al. Linalool attenuates lung inflammation induced by *Pasteurella multocida* via activating Nrf-2 signaling pathway. **International Immunopharmacology**, v.21, p. 456-463, 2014.

YANG, T. S.; CHAO, L. K-P.; LIU, T-T. Antimicrobial activity of the essential oil of *Glossogyne tenuifolia* against selected pathogens. **Journal of Science Food and Agriculture**, v. 94, p. 2965-71, 2014.

YAO, H. et al. Preparation and evaluation of a novel gastric floating alginate/poloxamer inner-porous beads using foam solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 422, p. 211-219, 2012.

YUSOFF, M. M.; IBRAHIM, H.; HAMID, N. A. Chemical characterization and antimicrobial activity of rhizome essential oils of very closely allied Zingiberaceae species endemic to Borneo: *Alpinia ligulata* K. Schum. and *Alpinia nieuwenhuizii* Val. **Chemistry & Biodiversity**. v. 8, p. 916-923, 2011.

ZANIN, S. M. W. et al. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. **Visão Acadêmica**, v.3, p. 13-18, 2002.

ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. **ChemBioEng Reviews**, v. 2, p. 204-226, 2015.

ZU, X. et al. Sedative effects of *Arachis hypogaea* L. stem and leaf extracts on sleepdeprived rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 6, p. 601-605, 2013.

APÊNDICE - MANUSCRITO**Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate / linalool in combination against *Aedes aegypti***

Artigo publicado no periódico ***Ecotoxicology and Environmental Safety***
Volume 139, p. 238–244, 2017
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.046>

Gislene M Fujiwara^{a*}; Vinícius Annies^b; Camila F de Oliveira^a; Ricardo A Lara^a; Maria M Gabriel^a; Fernando C M Betim^a; Jéssica M Nadal^c; Paulo V Farago^c; Josiane F G Dias^a; Obdulio G Miguel^a; Marilis D Miguel^a; Francisco A Marques^b; Sandra M W Zanin^a

^aPostgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacy, Federal University of Paraná, 80210-170, Curitiba, PR, Brazil

^bDepartment of Chemistry, Federal University of Paraná, 81531-990, Curitiba, PR, Brazil

^cPostgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brazil

*email: gifujiwara@gmail.com (G. M. Fujiwara)

Abstract

The frequent use of synthetic pesticides to control *Aedes aegypti* population can lead to environmental and / or human contamination and the emergence of resistant insects. Linalool and methyl cinnamate are presented as an alternative to the synthetic pesticides, since they can exhibit larvicidal, repellent and / or insecticidal activity and

are considered safe for use. The aim of this study was to evaluate the larvicidal activity of methyl cinnamate, linalool and methyl cinnamate/linalool in combination (MC-L) (1:4 ratio, respectively) against *Aedes aegypti*. The *in vitro* preliminary toxicity through brine shrimp lethality assay and hemolytic activity, and the phytotoxic potential were also investigated to assess the safety of their use as larvicide. Methyl cinnamate showed significant larvicidal activity when compared to linalool (LC₅₀ values of 35.4 µg/mL and 275.2 µg/mL, respectively) and to MC-L (LC₅₀ 138.0 µg/mL). Larvae morphological changes subjected to the specified treatments were observed, as the flooding of tracheal system and midgut damage, hindering the larval development and survival. Preliminary *in vitro* toxicity through brine shrimp showed the high bioactivity of the substances (methyl cinnamate LC₅₀ 35.5 µg/mL; linalool LC₅₀ 96.1 µg/mL) and the mixture (MC-L LC₅₀ 57.7 µg/mL). The results showed that, despite the higher larvicidal activity of methyl cinnamate, the use of MC-L as a larvicide seems to be more appropriate due to its significant larvicidal activity and low toxicity.

Key-words: Methyl cinnamate; linalool; *Artemia salina*; toxicity; hemolysis; *Aedes aegypti*

1. Introduction

Aedes aegypti Linnaeus (Diptera: Culicidae) is the main vector of dengue, Chikungunya and Zika virus, which are responsible for significant human morbidity and mortality in many countries (Brasil, 2015; WHO, 2016). These mosquitoes are common in tropical and subtropical areas, where environmental and climatic conditions of

temperature and humidity allow them to proliferate (Jansen and Beebe, 2010; Silva *et al.*, 2014; Brasil, 2015).

Virus transmission by *Ae. aegypti* can be reduced or prevented with environmental management and by the use of synthetic insecticides belonging to the group of organophosphates and pyrethroids, such as Temephos (Lima *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2014) to minimize the spread of the mosquitoes and human contact (WHO, 2009). However, frequent use of these insecticides can result in phytotoxicity, human poisoning and emerging of resistant insects (Lima *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2014). In this context, researchers have worked to develop alternative strategies to control *Ae. aegypti* proliferation, such as the use of phytolarvicides composed of plant essential oils or their compounds (Nour *et al.*, 2009; Grzybowski *et al.*, 2013; Kabir *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2014).

Linalool and methyl cinnamate are used in pharmaceutical, cosmetic and food industries (Letizia *et al.*, 2003; Bathia *et al.*, 2007) and some authors have reported their repellent, insecticidal and larvicidal activities (Peterson *et al.*, 2000; Nour *et al.*, 2009; Dekker *et al.*, 2011; Kwon *et al.*, 2011).

Recent researches have demonstrated the bioactivity of different substances used in combination, aiming to verify the existence of synergistic or additive effect between them (Azeredo and Soares, 2013; Grzybowski *et al.*, 2013; Mitsopoulou *et al.*, 2014). Annies *et al.* (2012) evaluated the repellent activity of linalool and methyl cinnamate, and reported that when the substances were used in combination, it was observed a higher repellent activity than when the substances were used separated.

Considering the repellent activity of linalool and methyl cinnamate used in combination and the lack of studies about their larvicidal activity, this study aimed to evaluate the larvicidal activity of methyl cinnamate, linalool, and methyl

cinnamate/linalool in combination (MC-L) (ratio 1:4) against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) and the morphological changes of the larvae exposed to these treatments. Toxicological assays were also assessed, since the use of MC-L as larvicide involves exposing it to the environment, which may result in toxicity to plants, aquatic species and mammals, due to direct contact during application or the presence of its residues in water.

2. Material and Methods

2.1 Reagents

Methyl cinnamate and the racemic mixture of linalool were obtained from Sigma-Aldrich. Marine salt was purchased from Qingdao. Span[®] 60 (Croda), Methanol (Vetec), Tween[®] 80 (Galena), NaCl (Vetec), KH₂PO₄ (Vetec) and Na₂HPO₄ (Vetec) were used in analytical grade. Water was purified by reverse osmosis (Gehaka) before use.

2.2 Brine Shrimp Lethality Assay

The assay was performed according to Meyer *et al.* (1982) with modifications. Cysts of *Artemia salina* L. (200 mg) were incubated in 400 mL artificial sea water (38 g marine salts dissolved in 1000 mL purified water). The system was kept under constant stirring and aeration at 30 °C for 48 h for hatching. After hatching, 10 nauplii of *A. salina* L. were transferred to tubes containing different concentrations of the substances for evaluation, which were solubilized in artificial sea water with 0.5%

Tween® 80 (m/v) added. Quinidine sulfate was used as a positive control at the same concentrations as the samples, and artificial sea water containing 0.5% Tween® 80 (m/v) was used as a negative control. After 24 h, the live and dead nauplii were counted.

2.3 Hemolytic Activity

The assay was conducted according to Banerjee *et al.* (2008). Sheep erythrocytes were obtained commercially (Newprov) and washed with phosphate buffered saline (PBS) (150 mM NaCl, 0.58 mM KH₂PO₄ and 3.4 mM Na₂HPO₄, pH 7.4). After washing, a 2% (v/v) suspension of red blood cells was prepared in PBS.

Standard solutions (1 mg/mL) were prepared using samples solubilized in 100 µL of methanol and PBS, which were subsequently diluted to concentrations of 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL and 1000 µg/mL in PBS. A 100% hemolysis sample was prepared with distilled water, and the negative control consisted of PBS solution containing methanol.

For each sample concentration, 200 µL of a 2% suspension of red blood cells and 200 µL of the sample solution were placed in Eppendorf tubes. The samples were homogenized and incubated at 37 °C for 3 h. Following the incubation, the tubes were centrifuged for 5 min at 3000 rpm and the supernatant transferred to 96-well microplates. The samples absorbance was measured in a Multiskan FC spectrophotometer (Thermo Scientific) at 540 nm. The hemolysis percentage was calculated as follows:

$$\%Hemolysis = \frac{Abs_t - Abs_n}{Abs_w - Abs_n} * 100$$

Where Abs_t is the absorbance of test sample, Abs_n the absorbance of control (saline) and Abs_w the absorbance of control (distilled water).

2.4 Phytotoxicity Assay

The phytotoxicity assay was determined according to Silva *et al.* (2014), with modifications. The samples were emulsified with Tween[®] 80 in a 1:1 (m/v) proportion and diluted with purified water in concentrations of 0.001%, 0.01%, 0.1% and 1.0% (m/v). A 1% (m/v) solution of Tween[®] 80 was used as a negative control. For the germination assays, 50 seeds of *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids were displaced in sterile Petri dishes (θ 90 mm) containing a sheet of Whatman No. 1 filter paper moistened with 5 mL of purified water. After the seeding, 3 mL of the solution of each sample concentration was placed on two filter papers attached (by double-sided adhesive tape) in the inner side of the cover of the dish, avoiding direct contact with the seeds. The dishes were wrapped with Parafilm[®] and incubated in BOD incubator (Novatecnica) at 25 °C.

Each day the germinated seeds were counted; the criterion for germination was a protruding radicle at least 2.0 mm long. The Speed of Germination Index (SGI) was calculated according to Hoffmann *et al.* (2007) and the Percentage of Germination (%G) according to Rosado *et al.* (2009).

The same procedure was adopted to check the growth of seedlings, and the hypocotyl and radicle lengths were evaluated after 7 days of incubation. The assay was performed in quadruplicate.

2.5 Toxicity against *Aedes aegypti*

The larvicidal activity against the third-stage larvae of *Aedes aegypti* was evaluated according to the World Health Organization (WHO, 2005) and Silva *et al.* (2008). Eggs of *Aedes aegypti*, Rockefeller strain, provided by the Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, were placed in a plastic beaker containing 500 mL of chlorine-free water. The beaker was placed in a BOD incubator at 27 °C and 80% relative humidity. The larvae were fed with fish food from hatching to the third stage.

For each concentration tested, 100 mL of the sample and 20 third-stage larvae of *Aedes aegypti* were placed in a plastic container of 120 mL capacity. The samples were placed in a BOD incubator, temperature 27°C, relative humidity 80% and photoperiod of 12 h. After 24 h, the number of living and dead larvae was determined. Each test was conducted in quadruplicate, with a control consisting of 100 mL chlorine-free water containing 0.5% (m/v) Tween[®] 80.

2.6 Morphological analysis

The larvae of *Aedes aegypti* were evaluated by comparing photos (taken with a Nikon Coolpix AW110) of the control group and treated groups. For structural studies, an Olympus CX41 microscope (100x magnification) was used.

2.7 Statistical analysis

The Probit method (Finney, 1971) was used to determine the LC₅₀ and LC₉₀ values, as well as the corresponding 95% confidence intervals and chi square values

for the assays with *Artemia salina* L. and *Aedes aegypti*, using the SPSS Statistical Software Package version 23.0.

The data obtained in the evaluation of phytotoxicity were subjected to analysis of variance, and the means were compared by the Scott-Knott test ($p < 0.05$), using the software Sisvar (Ferreira, 2000).

Results

3.1 Brine Shrimp Lethality Assay

The bioassay demonstrated the bioactivity of the substances, and Table 1 shows the LC_{50} and LC_{90} values of methyl cinnamate, linalool and methyl cinnamate/linalool in combination (ratio 1:4).

Table 1–Toxicity of MC, L and the MC-L to *Artemia salina* Leach

Sample	Concentration (µg/mL)	Mortality (%) ± SD	LC ₅₀ (µg/mL) (LCL - UCL)	LC ₉₀ (µg/mL) (LCL - UCL)	x ²	(df)
MC	25	62.7 ± 5.8			1.5	(4) n.s.
	50	70.0 ± 17.3				
	75	93.3 ± 5.8	35.5	65.9		
	100	100.0 ± 0.0	(29.5 - 41.0)	(56.4 - 83.3)		
	125	100.0 ± 0.0				
	150	100.0 ± 0.0				
L	25	3.3 ± 5.8			4.9	(4) n.s.
	50	13.3 ± 5.8				
	75	20.0 ± 10.0	96.1	198.9		
	100	53.3 ± 11.6	(84.9 - 109.7)	(162.1 - 280.8)		
	125	70.0 ± 10.0				
	150	90.0 ± 10.0				
MCL	25	6.7 ± 5.8			3.8	(4) n.s.
	50	30.0 ± 10.0				
	75	66.7 ± 5.8	57.7	101.1		
	100	93.3 ± 5.8	(50.5 - 64.6)	(88.8 - 121.1)		
	125	96.7 ± 5.8				
	150	100.0 ± 0.0				

No mortality was observed in the control

MC = methyl cinnamate

L = linalool

MC-L = MC and L in combination (ratio 1:4)

SD = standard deviation

LC₅₀ = lethal concentration that kills 50% of the exposed organisms

LC₉₀ = lethal concentration that kills 90% of the exposed organisms

UCL = 95% upper confidence limit

LCL = 95% lower confidence limit

x² = chi square

df = degrees of freedom

n.s. = not significant (α = 0.05)

^aValues are mean ± SD of three replicates

3.2 Hemolytic Activity

Methyl cinnamate, linalool and the MC-L (ratio 1:4) showed no or low hemolytic activity at concentrations up to 100 µg/mL. All samples showed activity at 1000 µg/mL, and methyl cinnamate showed the highest one (Fig. 1).

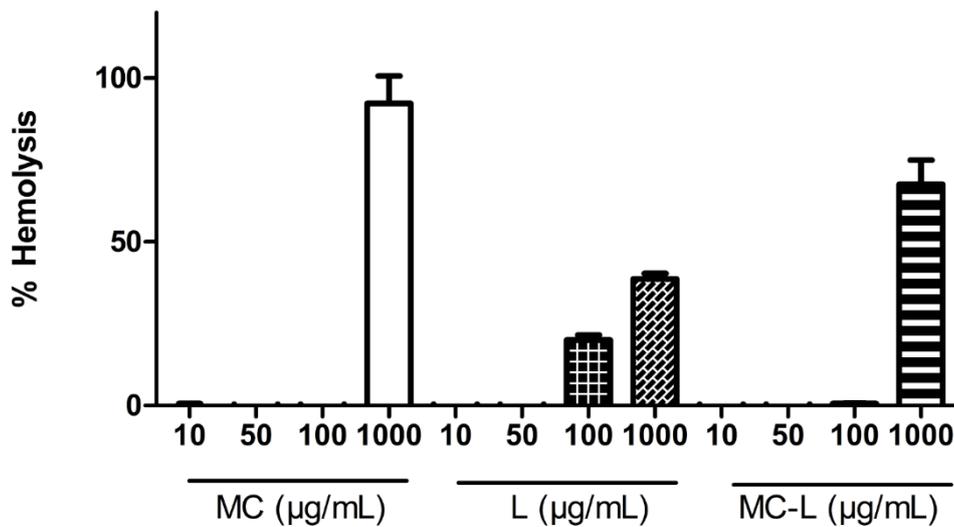


Fig. 1 – Percentage hemolysis caused by MC, L and an MC-L on a 2% suspension of sheep red blood cells

Note: MC = methyl cinnamate; L = linalool; MC-L = MC and L in combination

3.3 Phytotoxicity assay

In this study, methyl cinnamate showed the highest inhibitory effect on *Lactuca sativa* seeds when compared to linalool and MC-L, affecting seed germination, seedling growth and hypocotyl and radicle lengths (Fig. 2). Increasing methyl cinnamate concentration resulted in an increase in the inhibition effect.

Linalool and MC-L exhibited results for the germination indices and the biometric assessment (radicle and hypocotyl) comparable to the control, except for linalool at 0.01% that exhibited a stimulatory effect.

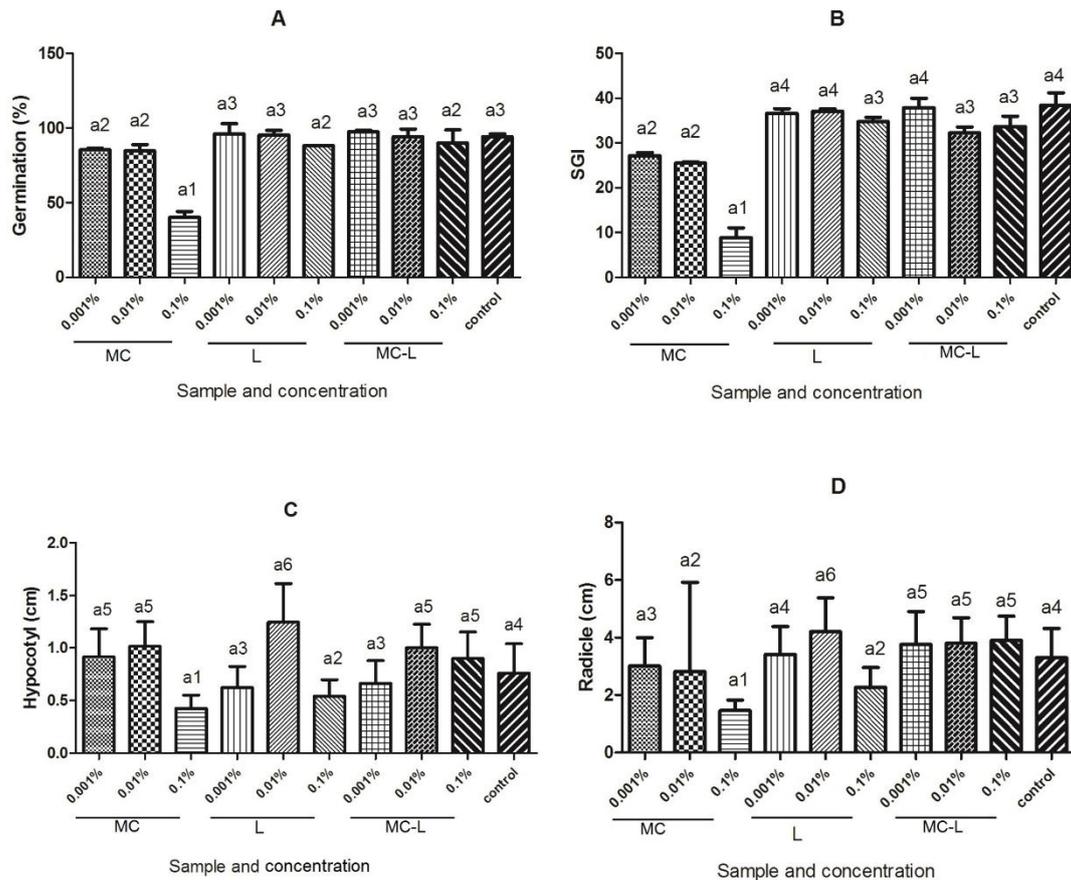


Fig. 2 – Effect of MC, L and MC-L at 0.001% (m/v), 0.01% (m/v) and 0.1% (m/v) on seeds of *Lactuca sativa*. Results obtained are mean value \pm standard deviation. Treatments sharing the same number and letter do not differ significantly according to Scott-Knott test ($p < 0.05$).

Note: MC = methyl cinnamate; L = linalool; MC-L = MC and L in combination

3.4 Toxicity against *Aedes aegypti*

Methyl cinnamate, linalool and MC-L showed larvicidal activity against third-stage larvae of *Ae. aegypti*, as shown in Table 2.

Table 2 – Larvicidal activity of MC, L and MC-L on larvae of *Ae. aegypti* after 24 hours

Sample	Concentration (µg/mL)	Mortality (%) ± SD	LC ₅₀ (µg/mL) (LCL - UCL)	LC ₉₀ (µg/mL) (LCL - UCL)	x ²	(df)
MC	10	0.0			0.0	(2) n.s.
	25	8.8 ± 8.5	35.4	49.2		
	50	91.2 ± 7.5	(33.0 - 38.1)	(45.1 - 55.1)		
	100	100.0 ± 0.0				
L	100	1.2 ± 2.5			20.5	(5)
	150	8.8 ± 4.8				
	200	5.0 ± 4.1				
	250	47.5 ± 6.4	275.2	442.8		
	300	62.5 ± 10.4	(240.5 - 316.9)	(370.1 - 646.6)		
	350	67.5 ± 15.5				
	400	88.8 ± 11.1				
MC-L	50	0.0			1.3	(4) n.s.
	100	10.0 ± 10.8				
	150	60.0 ± 7.1	138.0	186.2		
	200	95.0 ± 4.1	(131.3 - 144.6)	(175.9 - 200.4)		
	250	100.0 ± 0.0				
	300	100.0 ± 0.0				

No mortality was observed in the control

MC = methyl cinnamate

L = linalool

MC-L = MC and L in combination (ratio 1:4)

SD = standard deviation

LC₅₀ = lethal concentration that kills 50% of the exposed organisms

LC₉₀ = lethal concentration that kills 90% of the exposed organisms

UCL = 95% upper confidence limit

LCL = 95% lower confidence limit

x² = chi square

df = degrees of freedom

n.s. = not significant (α = 0,05)

^aValues are mean ± SD of four replicates

3.5 Morphological analysis

In this work, the negative control group (larvae treated with water and Tween[®] 80), presented a wormlike appearance, a whitish-green colour and an average size of 3.5 ± 0.5 mm. The body was clearly divided into head, thorax, abdomen (Fig. 3A); the abdomen presented eight segments and the anal lobe and breathing siphon (Fig. 3C) were observed in the last one.

Larvae exposed to methyl cinnamate and linalool at sublethal concentration (25 and 150 µg/mL, respectively) presented curve, darker and shorter abdomen (2.9 ± 0.6 and

2.8 ± 0.6 mm) (Fig. 3D and 3G) when compared to the control group and the MC-L larvae. On the other hand, larvae submitted to MC-L in all concentrations showed elongated abdomen (3.9 ± 0.8 mm for MC-L at 150 µg/mL) and darkening of the gut (Fig. 3J). The main elongation occurred at the cervix region, as observed at Fig. 3E.

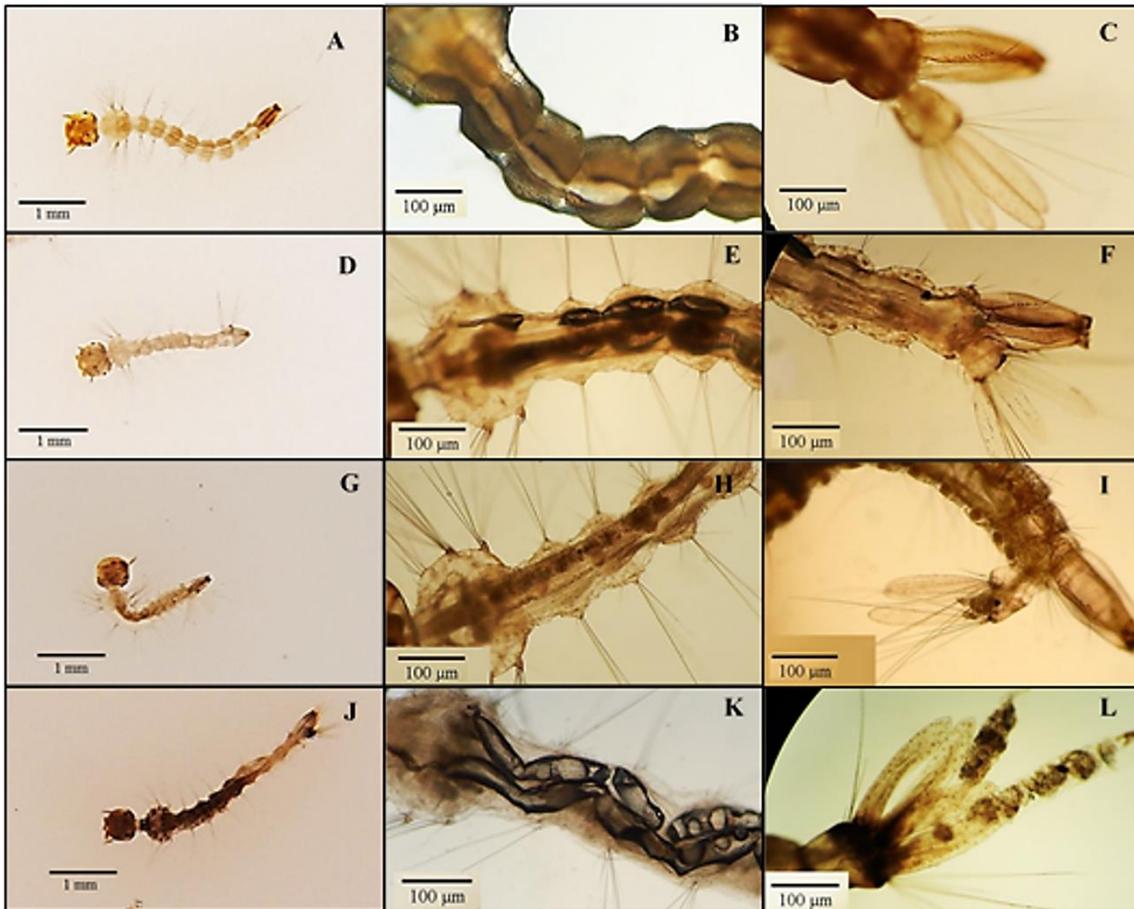


Fig. 3 – Control group larvae (A, B and C); MC larvae group showing overlap segments (D), flooding tracheal system and cervix elongation (E) and anal papiles (F); L larvae group showing curve abdomen (G); elongated abdomen (H) and partial extrusion of gut content involved by peritrophic matrix (I); MC-L larvae group showing darkening of gut (J); flooding tracheal system and rupture of gut epithelial cells (K) and total extrusion of gut content with peritrophic matrix (L). Note: MC= methyl cinnamate; L= linalool; MC-L= MC and L in combination

The treated larvae showed partial or total elimination of gut content enclosed in the peritrophic matrix (Fig. 3I and 3L) and translucent tracheal system (Fig. 3E and 3K).

3. Discussion

Plant-based compounds are already known to have larvicidal properties, which could be useful for the development of eco-friendly larvicides (Pavela, 2015; Govindarajan *et al.*, 2016). The present study evaluated the larvicidal activity of methyl cinnamate, linalool and methyl cinnamate/linalool in combination (ratio 1:4) against *Ae. aegypti* and the morphological changes on treated larvae.

The highest larvicidal activity was observed with methyl cinnamate, and the lowest one with linalool, which are similar to results found in previous studies (Jantan *et al.*, 2005; Teles, 2009; Pandey *et al.*, 2013). The interaction among different substances can lead to a synergistic or additive effect, resulting in a bioactivity improvement (Grzybowski *et al.*, 2013; Dias and Moraes, 2014). In this context, MC-L showed a better larvicidal activity when compared to linalool, however, its LC₅₀ value was higher than methyl cinnamate, suggesting an additive effect.

Phytolarvicides can preventing the larvae pass to the next stage of life cycle, and the evaluation of morphological changes in larvae exposed to them can explain their mechanism of toxicity to *Ae. aegypti* (Chaithong *et al.*, 2006; Dalarmi *et al.*, 2015). According to Corbet *et al.* (2000) essential oils can affect the larvae by physical flooding of the tracheal system, by chemical toxicity, by interference with surface forces or by combined actions.

The partial or total elimination of gut content enclosed in the peritrophic matrix exhibited for some larvae has been reported as the first defense mechanism in an attempt to eliminate toxic substances (Chaithong *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012; Procópio *et al.*, 2015). The darkening of the midgut observed in treated larvae can be result from epithelial cells damage or peritrophic matrix alterations, and the absence

of underlying epithelium in larvae subject to MC-L treatment can indicate that the MC-L larvicidal activity was probably due to damage in the *Ae. aegypti* midgut (Edwards and Jacobs-Lorena, 2000; Shao *et al.*, 2012; Procopio *et al.*, 2015). Some larvae showed translucent tracheal system, which is indicative of liquid-filled tracheae; larvae in the control group exhibit opaque and dark trachea, which is indicative of the presence of air only (Corbet *et al.*, 1995; Souza *et al.*, 2012).

In addition to the larvicidal activity of MC-L against *Ae. aegypti*, the previous toxicity to the environment and mammals were also evaluated. Brine shrimp lethality assay using *Artemia sp.* is widely used as a preliminary assessment of toxicity, both to human cells and to the environment (Carballo *et al.*, 2002; Callegaro *et al.*, 2015), and for detecting biologically active substances obtained from plants (Alves *et al.*, 2000). According to Cheng *et al.* (2003), essential oils presenting $LC_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$ should be considered for *Ae. aegypti* larvicidal assay. Methyl cinnamate, linalool and MC-L showed high activity against *Artemia salina* L., which corroborate with their biological and larvicidal properties.

The hemolytic activity aims to evaluate the damage caused by a substance on the membrane of erythrocytes, which can lead to its rupture and hemoglobin release (Miyazaki *et al.*, 2013; Maiti *et al.*, 2016). The stability of the membrane of red blood cells subjected to the action of different substances is a useful tool in the preliminary analysis of cytotoxicity (Gandhi and Cherian, 2000; Sharma and Sharma, 2001). In this context, despite of their significant bioactivity, methyl cinnamate and MC-L showed a weak hemolytic activity, while linalool presented hemolysis at $100 \mu\text{g/mL}$.

According to previous works (Scognamiglio *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015) several plants compounds are able to affect germination and growth of neighboring plants, as water-soluble organic acids, aliphatic aldehydes, ketones,

quinines, phenolics, cinnamic acid, flavonoids, tannins, steroids and terpenoids. This work revealed that MC exhibited the highest phytotoxicity on *Lactuca sativa* seeds and MC-L showed the lowest one, which works with An *et al.* (2001) who considered that the phytotoxicity of a mixture is different from that presented by its isolated components due to the interaction between them. Thus, the expected phytotoxicity may be different from that observed.

4. Conclusion

This work presented the toxicity of linalool, methyl cinnamate and their combination, methyl cinnamate/linalool (ratio 1:4) (MC-L) against *Ae. aegypti*. Moreover, it was assessed the phytotoxicity and the *in vitro* toxicity through brine shrimp lethality assay and hemolytic activity. Methyl cinnamate, linalool and MC-L induced to morphological alterations on larvae exposed to them, even in sublethal concentrations. Gut damage and flooding tracheal system were the major mechanisms involved in the larvicidal activity, interfering with survival and development of *Ae. aegypti* larvae.

Methyl cinnamate demonstrated the highest larvicidal activity against *Ae. aegypti*, and also possessed the higher toxicological effects on the *in vitro* assays. Linalool exhibited the lowest larvicidal activity, toxicological effects in brine shrimp lethality assay and phytotoxicity, however presented the highest hemolytic potential. The combination MC-L (ratio 1:4) showed moderate larvicidal activity and low toxicity to environment and mammals, which suggest its use as an alternative to the synthetic larvicides.

References

- Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EFA, Júnior AS, Zani CL (2000) Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 95(3): 367-373.
- An M, Pratley JM, Haig T (2001) Phytotoxicity of *Vulpia* residues: III Biological activity of identified allelochemicals from *Vulpia myuros*. J. Chem. Ecol. 27(2):383-394.
- Annes V, Chitolina RF, Marques FA, Maia BHLNS, Navarro-Silva MA, Ramires EN, Souza WM (2012) Avaliação do efeito de repelência do óleo essencial de *O. basilicum* L. e dos componentes majoritários frente ao *Aedes aegypti*. 35th Annual Meeting of Brazilian Chemical Society.
- Azeredo CMO, Soares MJ (2013) Combination of the essential oil constituents citral, eugenol and thymol enhance their inhibitory effect on *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma cruzi* growth. Rev. Bras. Farmacogn. 23(5): 762-768.
- Banerjee A, Kumar A, Mishra B, Priyadaesini KI (2008) Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. Chem. Biol. Interact. 174(2): 134-139.
- Bathia SP, Wellington GA, Cocchiara J, Lalko J, Letizia CS, Api AM (2007) Fragrance material review on methyl cinnamate. Food Chem. Toxicol. 45(1): supl.1, S113–S119.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (2015) Febre pelo vírus Zika: uma revisão narrativa sobre a doença. Boletim Epidemiológico 46(26).
- Callegaro S, Minetto D, Pojana G, Bilanicová D, Libralato G, Ghirardini AV, Hassellöv M, Marcomini A (2015) Effects of alginate on stability and ecotoxicity of nano-TiO₂ in artificial seawater. Ecotoxicol. Environ. Saf. 117: 107-114.
- Carballo JL, Hernández-Inda ZL, Pérez P, García-Grávalos MD (2002) A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. BMC Biotechnol. <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/2/17>. Accessed 03 January 2016.
- Chaithong U, Choochote W, Kamsuk K, Jitpakdi A, Tippawangkosol P, Chaiyasit D, Champakaew D, Tuetun B, Pitasawat B (2006) Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). J. Vector Ecology. 31(1): 138-144.
- Cheng SS, Chang HT, Chang ST, Tsai KH, Chen WJ (2003) Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. Bioresource Tech. 89(1): 99-102.
- Corbet SA, Danahar GW, King V, Chalmers CL, Tiley CF (1995) Surfactant-enhanced essential oils as mosquito larvicides. Entomol. Experimentalis Applicata. 75(3): 229-236.

Corbet SA, Tiley C, Moorhouse T, Giam C, Pursglove S, Raby J, Rich M (2000) Surface films as mosquito larvicides: partitioning the mode of action. *Entomol. Experimentalis Applicata*. 94(3): 295-307.

Dalarmi L, Silva CB da, Ocampos, FMM, Burci LM, Nascimento KF do, Jesus C de, Dias JFG, Miguel MD, Miguel OG, Zanin SMW (2015) Larvicidal activity of *Dalbergia brasiliensis* (Fabaceae - Papilionoideae) on *Aedes aegypti*. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 9(35): 881-885.

Dekker T, Ignell R, Ghebru M, Glinwood R, Hopkins R (2011) Identification of mosquito repellent odours from *Ocimum forskolei*. *Parasit. Vectors*. 4(1): 1-7.

Dias CN, Moraes DFC (2014) Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. *Parasitol. Res.* 113(2): 565-592.

Edwards MJ, Jacobs-Lorena M (2000) Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. *J. Insect Physiol.* 46(9): 1313-1320.

Ferreira DF (2000) Sistema de análise de variância de dados balanceados (SISVAR). Pacote computacional. UFLA, Lavras.

Finney DJ (1971) Probit Analysis. Cambridge University Press, Cambridge.

Gandhi VM, Cherian KM (2000) Red cell haemolysis test as an *in vitro* approach for the assessment of toxicity of karanja oil. *Toxicol. In Vitro* 14(6): 513-516.

Govindarajan M, Rajeswary M, Benelli G (2016) Chemical composition, toxicity and non-target effects of *Pinus kesiya* essential oil: An eco-friendly and novel larvicide against malaria, dengue and lymphatic filariasis mosquito vectors. *Ecotoxocol. Environ. Saf.* 129: 85-90.

Grzybowski A, Tiboni M, Silva MAN, Chitolina RF, Passos M, Fontana JD (2013) Synergistic larvicidal effect and morphological alterations induced by ethanolic extracts of *Annona muricata* and *Piper nigrum* against the dengue fever vector *Aedes aegypti*. *Pest. Manag. Sci.* 69(5): 589–601.

Hoffmann CEF, Neves LAS das, Bastos CF, Wallau GL (2007) Atividade alelopática de *Nerium oleander* L. e *Dieffenbachia picta* schott em sementes de *Lactuca Sativa* L. e *Bidens pilosa* L. *Rev. Cienc. Agrovet.* 6(1): 11-21.

Jansen CC, Beebe NW (2010) The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes Infect.* 12(1): 272-279.

Jantan IB, Yalvema MF, Ahmad NW, Jamal JA (2005) Insecticidal activities of the leaf oils of eight *Cinnamomum* species against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Pharm. Biol.* 43(6): 526–532.

Lee SM, Radhakrishnan R, Kang SM, Kim JH, Lee IY, Moon BK, Yoon BW, Lee IJ (2015) Phytotoxic mechanisms of bur cucumber seed extracts on lettuce with special

reference to analysis of chloroplast proteins, phytohormones, and nutritional elements. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 122: 230–237.

Kabir KE, Choudhary MI, Ahmed S, Tariq RM. 2013. Growth-disrupting, larvicidal and neurobehavioral toxicity effects of seed extract of *Seseli diffusum* against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 90: 52–60.

Kumar P, Mishra S, Malik A, Satya S (2014). Biocontrol potential of essential oil monoterpenes against housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 100: 1-6.

Kwon HW, Kim SI, Chang KS, Clark JM, Ahn YJ (2011) Enhanced repellency of binary mixtures of *Zanthoxylum armatum* seed oil, vanillin, and their aerosols to mosquitoes under laboratory and field conditions. *J. Med. Entomol.* 48(1): 61–66.

Letizia CS, Cocchiara J, Lalko J, Api AM (2003). Fragrance material review on linalool. *Food Chem. Toxicol.* 41(7): 943–964.

Lima EP, Oliveira Filho AM, Lima JWO, Ramos Júnior AN, Cavalcanti LPG, Pontes RJS (2006) Resistência do *Aedes aegypti* ao Temefós em Municípios do Estado do Ceará. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39(3): 259-263.

Lima TC, Silva TKM da, Silva FL, Barbosa-Filho JM, Marques MOM, Santos RC, Cavalcanti SCH, Sousa DP (2014) Larvicidal activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and derivatives. *Chemosphere* 104: 37–43.

Maiti S, Sasmal K, Sinha SS, Singh M (2016) Analysis of cytotoxicity and genotoxicity on *E. coli*, human blood cells and *Allium cepa* suggests a greater toxic potential of hair dye. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 124: 248–254.

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL (1982) Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45(5): 31-34.

Mitsopoulou KP, Vidali VP, Koliopoulos G, Couladouros EA, Michaelakis A (2014) Hyperforin and deoxycohumulone as a larvicidal agent against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) *Chemosphere.* 100: 124–129.

Miyazaki CMS, Hirota BCK, Lima CP, Verdam MCS, Paula CS, Chaves SC, Pavan PMN, Miguel MD, Miguel OG (2013) Coumarin isolation and comparative study of biological activities of *Pterocaulon alopecuroides* DC and *Pterocaulon lorentzii* Malme. *Int. J. Phytomed.* 5(3): 298–301.

Nour AH, Elhoussein SA, Nour AO, Nour AH, Yusoff MM (2009) A Study of the essential oils of four Sudanese accessions of basil (*Ocimum basilicum* L.) against *Anopheles* mosquito larvae. *Am. J. Appl. Sci.* 6(7): 1359-1363.

Pandey SK, Tandon S, Ahmad A, Singh AK, Tripathi AK (2013) Structure–activity relationships of monoterpenes and acetyl derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Pest Manag. Sci.* 69(11): 1235–1238.

Pavela R (2015) Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Ind. Crop Prod.* 76: 174-187.

Peterson CJ, Tsao R, Egger AL, Coats JR (2000) Insecticidal Activity of Cyanohydrin and Monoterpenoid Compounds. *Molecules* 5(4): 648-654.

Procópio TF, Fernandes KM, Pontual EV, Ximenes RM, Oliveira ARC de, Souza CS, Melo AMMA, Navarro DMAF, Paiva PMG, Martins GF, Napoleão TH (2015) *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. *Plos One*. doi:10.1371/journal.pone.0126612

Rosado LDS, Rodrigues HCA, Pinto JEBP, Custódio TN, Pinto LBB, Bertolucci SKV (2009) Alelopatia do extrato aquoso e do óleo essencial de folhas do manjeriço “Maria Bonita” na germinação de alface, tomate e melissa. *Rev. Bras. Pl. Med.* 11(4): 422-428.

Scognamiglio M, D’Abrosca B, Esposito A, Pacífico S, Monaco P, Fiorentino A (2013) Plant growth inhibitors: allelopathic role or phytotoxic effects? Focus on Mediterranean biomes. *Phytochem Ver.* 12:803–830

Shao Q, Yang B, Xu Q, Li X, Lu Z, Wang C, Huang Y, Söderhäll K, Ling E (2012) Hindgut innate immunity and regulation of fecal microbiota through melanization in insects. *J. Biol. Chem.* 287(17): 14270–14279.

Sharma P, Sharma JD (2001) *In vitro* hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. *J. Ethnopharmacol.* 74(3): 239–243.

Silva CB da, Rech KS, Ocampos FM, Dalarmi L, Jasinski VCG, Dias JFG, Zanin SMW, Kerber VA, Kulik JD, Fujiwara GM, Oliveira M, Miguel OG, Miguel MD (2014) *Byrsonima intermedia* preparations inhibits trypsin and chymotrypsin activities from *Aedes aegypti* larval gut. *J. Med. Plant Res.* 8(9): 416-422.

Silva WJ, Dória GAA, Maia RT, Nunes RS, Carvalho GA, Blanck AF, Alves PB, Marçal RM, Cavalcanti SCH (2008) Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresour. Technol.* 99(8): 3251–3255.

Silva ER, Overbeck GE, Soares GLG (2014) Phytotoxicity of volatiles from fresh and dry leaves of two Asteraceae shrubs: Evaluation of seasonal effects. *South African J. Botany.* 93: 14–18

Souza-Filho, APS (2006) Proposta metodológica para análise da ocorrência de sinergismo e efeitos potencializadores entre aleloquímicos. *Planta Daninha.* 24(3): 607-610.

Souza TM, Cunha AP, Farias DF, Machado LK, Morais SM, Ricardo NMPS, Carvalho AFU (2012) Insecticidal activity against *Aedes aegypti* of m-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds. *Pest Manag. Sci.* 68(10): 1380–1384.

World Health Organization (WHO). 2005 Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Health Organization, Geneva.

World Health Organization (WHO). 2009. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. World Health Organization, Geneva.

World Health Organization (WHO). 2016. Mosquito control: can it stop Zika at source? <http://www.who.int/emergencies/zikavirus/articles/mosquitocontrol/en/>. Accessed 01 march 2016.

Zhang YE, Ma HJ, Feng DD, Lai XF, Chen ZM, Xu MY, Yu QY, Zhang Z (2012) Induction of detoxification enzymes by quercetin in the silkworm. *J Econ. Entomol.* 105(3): 1034–1042.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences and Department of Chemistry of the Federal University of Paraná, to Professor Mário Antônio Navarro da Silva and Dr. Janet W. Reide for editing the text. The study was enabled by financial support from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).