

ATIVIDADE LARVICIDA DE ÓLEO ESSENCIAL DE *CROTON RHAMNIFOLIOIDES* (PAX & HOFFM) ENCAPSULADO EM NANOSSISTEMA POLIMÉRICO FRENTE AO MOSQUITO *Aedes Aegypti***LARVICIDAL ACTIVITY OF *CROTON RHAMNIFOLIOIDES* (PAX & HOFFM) ESSENTIAL OIL ENCAPSULATED IN A POLYMERIC NANOSYSTEM AGAINST THE MOSQUITO *Aedes Aegypti***

SANTOS, Andréia Gregório da Silva^{1*}; NAVARRO, Daniela do Amaral Ferraz²; MAGALHÃES, Nereide Stela Santos³; MELO-SANTOS, Maria Alice Varjal⁴; BRANDÃO, Sofia Suely Ferreira⁵

^{1,5}Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Mestrado Profissional em Gestão Ambiental.

² Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Química Fundamental

³ Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA).

⁴Fundação Oswaldo Cruz-PE/Instituto Aggeu Magalhães – IAM – PE, Laboratório do Serviço de Referência em Controle de Culicídeos Vetores

* Autor correspondente
e-mail: andreia2007@gmail.com

Received 26 July 2019; received in revised form 25 November 2019; accepted 12 February 2020

RESUMO

Aedes aegypti é uma espécie de mosquito com ampla distribuição mundial, envolvida nos ciclos de transmissão da dengue, Zika e chikungunya. A inexistência de vacinas para a maioria destas arboviroses realça a importância do controle vetorial como medida para reduzir a incidência dessas doenças. Diversas pesquisas têm sido realizadas no intuito de encontrar substâncias de origem vegetal candidatas ao controle de *A. aegypti*. Neste sentido, as plantas medicinais que também apresentam ação inseticida têm se mostrado promissoras para o desenvolvimento de novos produtos, ambientalmente mais seguros do que os inseticidas químicos tradicionais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade larvicida do óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides* e de sua formulação em nanocápsulas para *A. aegypti*. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação e analisado por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG/MS). Foram produzidas formulações contendo concentrações do óleo puro, que variaram de 40 a 80 µg/mL e nanocápsulas de policaprolactona com concentrações de 30 a 120 µg/mL. Os ensaios larvicidas foram realizados utilizando concentrações variadas de uma suspensão aquosa, em triplicatas, contendo 20 larvas/concentração, além de um controle não tratado. Como resultados, o óleo essencial apresentou teor médio que variou entre 1,4% e 0,58%, em função da época da coleta e, como principais constituintes, eucaliptol (16,57%) e (E)-cariofileno (11,32%). Os valores de CL₅₀ variaram de 26,3 µg/mL a 52,2 µg/mL e de CL₉₀ de 37,8 µg/mL a 68,7 µg/mL para o óleo puro. No óleo encapsulado, a CL₅₀ = 63,4 µg/mL e a CL₉₀ = 104,8 µg/mL. O óleo puro de *Croton rhamnifolioides* foi considerado mais ativo contra as larvas de *A. aegypti* do que o encapsulado, embora ambos tenham demonstrando grande potencial para aplicação como larvicida.

Palavras-chave: atividade larvicida; plantas medicinais; nanopartículas.

ABSTRACT

Aedes aegypti is a species of mosquito with wide distribution worldwide, involved in the cycles of transmission of dengue, Zika and chikungunya. The lack of vaccines for most of these arboviruses highlights the importance of vector control as a measure to reduce the incidence of these diseases. Several researches have been carried out in order to find substances of plant origin that are candidates for the control of *A. aegypti*. In this sense, medicinal plants that also have an insecticidal action have shown promise for the development of new products, environmentally safer than traditional chemical insecticides. The objective of this work was to evaluate the larvicidal activity of the essential oil of the leaves of *Croton rhamnifolioides* and its formulation in nanocapsules for *A. aegypti*. The essential oil was extracted by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography coupled

to a mass spectrometer (CG/MS). Formulations were produced containing concentrations of pure oil, which ranged from 40 to 80 µg/mL and polycaprolactone nanocapsules with concentrations from 30 to 120 µg/mL. Larvicide tests were performed using varying concentrations of an aqueous suspension, in triplicates, containing 20 larvae / concentration, in addition to an untreated control. As a result, the essential oil had an average content that varied between 1.4% and 0.58%, depending on the time of collection and, as main constituents, eucalyptol (16.57%) and (E)-cariophyllene (11, 32%). LC50 values ranged from 26.3 µg/mL to 52.2 µg/mL and CL90 from 37.8 µg/mL to 68.7 µg/mL for pure oil. In encapsulated oil, the LC50 = 63.4 µg/mL and the LC90 = 104.8 µg/mL. The pure oil of *Croton rhamnifolioides* was considered more active against the larvae of *A. aegypti* than the encapsulated one, although both have great potential for application as a larvicide.

Keywords: larvicidal test; medicinal plants, nanoparticles.

1. INTRODUÇÃO:

Modificações antrópicas, quase que irreversíveis, no ambiente têm afetado a qualidade de vida das pessoas (Pontes, 1994) e propiciado o aumento da densidade populacional de alguns insetos sinantrópicos. Entre estes, destacam-se os mosquitos, a exemplo de *Aedes aegypti*, adaptados aos centros urbanos, onde em função do seu hábito alimentar antropofílico, têm atuado como vetor de arbovírus (Souza, Silva e Silva, 2010; Prezoto, 2016).

Para prevenir doenças como dengue, Zika e febre chikungunya se faz necessário o controle vetorial da principal espécie envolvida em seus ciclos de transmissão, *A. aegypti*. Para tanto, foram instituídas no Brasil, nas décadas de 1980/1990, políticas Públicas de Saúde para o controle desta espécie de mosquito, uma vez que não existem vacinas disponíveis para proteger as populações humanas expostas (Braga e Valle, 2007; Chiarella, 2016).

Nesse sentido, o controle do mosquito vem sendo realizado por meio do uso de inseticidas químicos das classes dos organofosforados e piretroides desde 1996, quando foi lançada a primeira versão de erradicação/controle de *A. aegypti* no país (Brasil, 2002; Rose, 2001; Penna, 2003; Braga e Valle, 2007). O uso contínuo de tais produtos tem levado à seleção de populações do mosquito resistentes (Araújo *et al.*, 2013; Chediak *et al.*, 2016) e ocasionado diversos danos ao ambiente, seja no ar ou na água, interferindo diretamente na saúde do ser humano, além de ocasionar vários transtornos ambientais, sociais e econômicos (Jintana *et al.*, 2015).

Tendo em vista a necessidade de alternativas a estes compostos químicos, que reduzam significativamente os impactos ambientais e econômicos, e que ao mesmo tempo sejam efetivos contra o mosquito, surgem as plantas medicinais (Corrêa e Salgado, 2011; Lima *et al.*, 2013; Castillo *et al.*, 2017). Segundo Santos (2014), algumas destas plantas apresentam

atividade larvicida contra o mosquito *A. aegypti* devido à presença de várias substâncias orgânicas que agem de forma isolada ou sinérgica. Ainda segundo Soloway (1976), os vegetais são importantes fontes de substâncias bioativas que possuem estruturas químicas diferentes e com distintas atividades contra insetos.

Em revisão realizada por Dias e Moraes (2014), foi observado que de 361 óleos essenciais já estudados quanto a sua bioatividade larvicida, 60% destes foram considerados ativos e obtidos de espécies de vegetais das famílias *Myrtaceae*, *Lamiaceae* e *Rutaceae*.

Da família *Euphorbiaceae*, *Croton rhamnifolioides* é uma espécie vegetal conhecida popularmente como “quebra-faca” ou “catinga-branca” (Randau *et al.*, 2004), apresentando atividade antimicrobiana (Da Costa *et al.*, 2013), acaricida (Da Câmara *et al.*, 2017) e inseticida, inclusive para culicídeos vetores, como o mosquito *A. aegypti* (Santos, 2014).

Aliada a este fato, a biotecnologia tem investido no desenvolvimento de nanopartículas biodegradáveis, tendo como objetivo obter a liberação controlada de ativos, com uma concentração ideal (Soppimath *et al.*, 2001, Peng *et al.*, 2014). Sendo assim, a nanoencapsulação de óleos essenciais pode representar uma alternativa viável na proteção deste princípio ativo, quando disponibilizado como larvicida em criadouros de mosquitos (Pavela, 2016).

Diante do exposto, o presente trabalho avaliou a atividade larvicida do óleo essencial de folhas de *C. rhamnifolioides*, formulado ou não em nanocápsulas, em sistema de liberação controlada, para o controle do mosquito *A. aegypti*, visando a obtenção de novos biolarvicidas, ambientalmente mais seguros.

2. PARTE EXPERIMENTAL:

2.1 Coleta e armazenamento de material botânico

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

2.1.1 Extração do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides*

Para a extração do óleo essencial, foi utilizada a técnica da hidrodestilação, adaptada do sistema de Clevenger (Santos *et al.*, 2015). As folhas secas foram cortadas e, introduzidas em um balão de fundo redondo com capacidade de 5L, sendo adicionada posteriormente água destilada. O processo de extração ocorreu em duas horas, sob aquecimento em manta aquecedora Lucadema 5000. No condensador de bolas foi utilizada água refrigerada proveniente de uma unidade de refrigeração Biothec BT SOUR. O óleo foi separado em tubo de Dean Stark, seco em sulfato de sódio anidro e armazenado sob refrigeração até o momento do uso.

2.1.2 Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial

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

minutos. A temperatura do injetor foi de 250° C. Os componentes foram identificados por meio de comparação com aqueles encontrados na biblioteca NIST (Adams, 2001; Lago *et al.*, 2006).

2.1.3 Preparação das nanocápsulas

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

2.1.4 Caracterização das formulações contendo óleo essencial

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

2.1.5 Determinação do conteúdo de óleo nas nanocápsulas

O conteúdo de OE nas nanocápsulas foi determinado por duas técnicas: cromatografia líquida de alta performance (CLAE) e espectrofotometria de absorção no UV-Visível (Natrajan *et al.*, 2015). Para quantificação, uma curva padrão do OE foi preparada em acetonitrila em concentrações variando de 50 a 250 µg.mL⁻¹. Para efetuar a quantificação do OE, uma curva analítica foi inicialmente preparada com concentrações variando de 50 a 300 µg/mL. Posteriormente, estabeleceu-se correlação linear entre concentração, considerada variável independente (x), e relação entre as áreas dos picos cromatográficos do fármaco e do padrão interno, considerada variável dependente (y). A linearidade foi avaliada através de análise de

regressão linear, utilizando ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LOQ) foram estimados de acordo com as diretrizes do ICH. O limite de detecção foi calculado através da fórmula: $LD = 3,3 (\sigma / I)$, e o limite de quantificação foi calculado através da fórmula: $LQ = 10 (\sigma / I)$, onde σ é o desvio padrão do intercepto com relação ao eixo dos Y e I é o valor da inclinação da curva analítica. Quanto ao doseamento do óleo essencial nas nanocápsulas foi utilizado 0,1 mL da suspensão das nanocápsulas as quais foram solubilizadas em 5 ml de acetonitrila. A solução foi, posteriormente, submetida à sonicação por 5 min, filtrada em filtros Millex® (0,22 μ m) e quantificada. Os experimentos foram realizados em triplicata. Para a eficiência da encapsulação do OE nas nanocápsulas foi empregado 0,4 mL da suspensão das nanocápsulas onde foram ultrafiltradas em filtros de filtrantes Microcon® (Millipore, Billerica, EUA) e submetidas a ultrafiltração associada com centrifugação a 10.000 rpm durante 1h. A concentração de OE no ultrafiltrado foi determinada por CLAE e a eficiência de encapsulação (%) calculada pela diferença entre a concentração total do fármaco usada na preparação da formulação e a quantidade não encapsulada (livre no ultrafiltrado). Quanto as condições cromatográficas sua análise foi realizada em equipamento Alliance 2695 (Waters, EUA) acoplado a um detector de arranjos de diodos (PDA) 2998 (Waters, EUA), operado a 263 nm. Uma coluna de fase reversa C₁₈ (250 mm \times 4,6 mm, 5 mm, XBridge™ Waters) protegida por uma pré-coluna da mesma composição (20 mm \times 4,6mm). A fase móvel foi composta por água: acetonitrila (20:80) (v/v). O fluxo utilizado foi de 1,5 mL/min a 30°C e um volume de injeção de 50 μ L. Para as condições espectrofotométricas sua análise foi realizada em equipamento Ultrospec® 3000 pro (Amersham Biosciences, Alemanha) em um comprimento de onda de 236 nm a temperatura ambiente.

2.1.6 Determinação da atividade larvicida

Os testes larvicidas foram realizados de acordo com as recomendações do protocolo da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2006). As larvas de *Aedes aegypti*, linhagem Recl, foram obtidas no insetário do Departamento de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ/PE. O ensaio biológico foi realizado em condições controladas, sendo as larvas do terceiro estágio mantidas a $26 \pm 1^\circ$ C. Todos os bioensaios foram realizados utilizando uma solução de 2g do óleo essencial para cada

14 ml de etanol do óleo puro e PCL para as nanocápsulas, e o controle negativo foi realizado apenas com etanol. Para a realização dos bioensaios preliminares, preparou-se uma solução inicial de 200 μ g/ml de emulsão do óleo essencial, dissolvendo-se 50 mg da amostra de óleo essencial de *C. rhamnifolioides* puro em 3,5 mL de etanol, completando-se para 250 mL com água destilada. A partir da solução inicial foram preparadas diferentes concentrações do óleo essencial puro (40 a 80 μ g/ml) e do óleo essencial encapsulado (30 a 80 μ g/ml), testadas em três réplicas com 20 larvas/concentração. Os níveis de mortalidade foram registrados após 24h e 48h de exposição. As larvas eram consideradas mortas quando não respondiam ao estímulo de toque ou não emergiam à superfície da solução. Os valores de mortalidade por concentração foram utilizados para estimar, por regressão linear Log-Probit, as concentrações letais para 50% e 90% das larvas expostas (CL₅₀ e CL₉₀), pelo programa estatístico SPSS for Windows versão 21.0, a um nível de confiança de 95%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1 Extração do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides*

A partir das extrações realizadas com as folhas de *C. rhamnifolioides* foi determinado o teor do óleo essencial, que apresentou valor médio variando entre 1,4% e 0,58%, em função da época da coleta. Santos *et al.* (2014) obtiveram, para a mesma espécie do gênero *Croton*, um teor de 0,80%. Souza *et al.* (2017), avaliando três espécies de *Croton* verificaram a influência da pluviosidade, temperatura e incidência solar sobre o rendimento e a composição dos seus óleos essenciais. Diversos fatores como horário de coleta da amostra, idade da planta, condições climáticas, influenciam tanto o teor de óleo essencial como a sua composição química (Kerrola, 1994; Carvalho, 2006).

3.1.1 Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial

Os constituintes químicos do óleo essencial foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS). Após análise dos cromatogramas, observou-se que os principais componentes do óleo essencial identificados foram o eucaliptol ou 1,8-cineol (16,57%), o (E)-cariofileno (11,32 %), o α -felandreno (5,52%) e o espatulenol (5,35%). Tais resultados estão de acordo com dados obtidos anteriormente na literatura para *C.*

rhamnifolioides, reportados por Santos *et al.* (2014) e Vidal *et al.* (2017), que verificaram, para o eucaliptol, porcentagem de 7,24 e 18,32%, respectivamente.

3.1.2 Preparação das nanocápsulas e caracterização das formulações contendo óleo essencial

Os resultados obtidos na caracterização das nanopartículas estão apresentados na Tabela 1.

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

Os valores de potencial zeta das nanopartículas foram de $-10,1 \pm 2,09$ mV (NC-PCL) e $-15,5 \pm 3,45$ mV (NC-PCL/OE), respectivamente. Estes resultados indicam uma boa estabilidade das formulações. A eficiência de encapsulação das nanocápsulas foi avaliada por CLAE e por espectrofotometria, nos quais foram observadas diferenças nos resultados quando comparados os dois métodos. A curva analítica utilizada para efetuar a quantificação do óleo essencial foi ajustada por análise de regressão linear, as quais estão apresentadas na Tabela 2.

O método mostrou-se linear entre as concentrações de 50 a 300 $\mu\text{g/mL}$. A equação da regressão linear obtida foi $y = -0,0024 + 0,0027 x$ por espectrofotometria e $y = -0,088 + 0,052 x$, em que y é a absorbância ou área e x a concentração ($\mu\text{g/mL}$) em equivalentes de OE, respectivamente (Figuras 1 e 2).

O coeficiente de correlação obtido foi de 0,9993, significando que 99,93% da variação total em torno da média é explicada pela regressão linear, comprovando a adequação do método ao intervalo avaliado. Os dados da análise de regressão são resumidos na Tabela 3.

A eficiência de encapsulação do OE nas nanocápsulas foi de $51,66 \pm 1,76$ % (espectrofotometria) e $32,78 \pm 1,56$ % (CLAE), o que equivale a uma concentração de fármaco na formulação de 5,17 mg/mL e 3,28 mg/mL, respectivamente. De acordo com estes resultados, sugere-se que o sistema ficou saturado pela grande quantidade de óleo

(10mg/mL), com uma proporção polímero/OE de 1:2 (p/p). Além disso, ha uma volatilização natural do óleo essencial, que é intensificada com o processo de rotaevaporação. Sundararajan *et al.* (2018), observou uma diminuição do tamanho na nanoemulsão após 30 dias de armazenamento, ficando a partícula abaixo de 200nm.

3.1.3 Determinação da atividade larvicida

Após uma série de extrações, foram obtidos quatro lotes de óleo essencial, que, para uso nos testes larvicidas, foram identificados em função dos diferentes tempos de armazenamento a 4°C (refrigeração), sendo A (1 ano), B (2 meses), C (uso imediato) e D (uso imediato). Os dois últimos lotes, embora utilizados logo após a extração do óleo, foram obtidos em dias diferentes.

Os valores de concentração letal estimados para os óleos experimentais variaram entre os diferentes lotes de produção (Tabela 4), sendo as amostras C e D consideradas as de maior toxicidade, por exibirem valores médios de CL_{90} menores do que 39 $\mu\text{g/ml}$, após 24h de exposição. Estas mesmas amostras também corresponderam as extrações mais recentes (C e D). Para as amostras dos Lotes A e B a expressão máxima da mortalidade larval em cada concentração foi alcançada de forma tardia, ou seja, após 48h de exposição.

A atividade larvicida apresentada pelo óleo essencial utilizado no presente estudo pode estar relacionada à ação sinérgica de seus constituintes químicos (Andrés *et al.*, 2017). No caso do óleo de *C. rhamnifolioides*, os estudos prévios realizados por Santos (2014) demonstram que a presença do α -felandreno, na composição química do óleo, pode ter relação com sua atividade larvicida. Ainda neste estudo, verificou-se que o efeito inibitório da atividade da tripsina pode estar associado à atividade larvicida.

Para os bioensaios com as nanopartículas (NC-PCL/OE), foi utilizado apenas o Lote D, pois este apresentou o menor valor de CL_{90} nos testes com o óleo essencial. Os valores de concentração letal revelaram uma diminuição importante da toxicidade, bem como um aumento no tempo requerido para alcançar a mortalidade final nas concentrações testadas de até 48h, comparados ao óleo essencial puro não encapsulado. Nossos resultados são em parte semelhantes aos observados por Sundararajan *et al.* (2018), embora os mesmos tenham referido o início da mortalidade a partir das 48h. O mesmo comportamento foi constatado por Kanés (2011),

ao utilizar o polímero sintético PCL na nanoencapsulação do óleo de copaíba, observou um retardo da liberação do princípio ativo no período de 48h. De acordo com este autor, estudos sobre a atividade larvicida residual do produto seriam necessários para saber se o óleo está sendo liberado de forma constante ou se a formação da membrana polimérica impossibilitou a liberação do princípio ativo. Neste mesmo estudo Kanés *et al.* (2011) demonstram que a utilização de gelatina possibilitou uma liberação mais rápida do óleo quando comparada a outros polímeros, fato que pode estar associado a espessura e integridade da partícula formada ao redor do princípio ativo. Outra variável a ser considerada neste contexto, segundo os autores, é o fato da gelatina ser uma proteína, e que as proteínas fazem parte da alimentação das larvas e isso pode ter potencializado a atividade larvicida.

Christofoli *et al.* (2015) avaliando nanoesferas de PCL com óleo essencial de *Zanthoxylum rhoifolium* e de *Z. riedelianum*, obteve aproximadamente 80% de difusão em 72h de ensaio.

Em nossos bioensaios não foram observadas diferenças em ambos os controles, ou seja, nanopartículas vazias e etanol, demonstrando assim que o produto utilizado nas nanopartículas não promoveu qualquer mortalidade larval. Apesar disso, as nanopartículas contendo o óleo essencial de *C. rhamnifolioides* retardaram a mortalidade das larvas (L3) de *A. aegypti* e exigiram uma quantidade maior do composto quando comparado ao óleo puro. Embora isso tenha acontecido, a atividade larvicida descrita para o óleo nanoencapsulado foi maior do que o referido para outros compostos de origem vegetal (Manimaran *et al.*, 2012; Soonwera, 2015).

Uma grande vantagem do uso das nanopartículas foi promover a solubilidade do produto em água sem a necessidade da adição de solventes. Estudos complementares podem revelar ainda vantagens adicionais desta nanoencapsulação do óleo de *C. rhamnifolioides*, relacionadas a atividade residual, ligada por exemplo, à proteção do princípio ativo e sua liberação gradual no ambiente aquático. Outro aspecto importante seria a redução do contato do larvicida com o homem (Vishwakarma *et al.*, 2016).

4. CONCLUSÕES:

A prospecção de compostos naturais com atividade larvicida para mosquitos representa uma importante área do conhecimento, necessária ao desenvolvimento de produtos mais seletivos e ambientalmente seguros, como alternativa ao uso de inseticidas químicos sintéticos. A redução da carga de uso destes compostos no combate ao mosquito *A. aegypti* surge como uma tendência mundial, nos últimos cinco anos, sobretudo em função da resistência da espécie a tais inseticidas, largamente documentadas na última década.

Os resultados encontrados para o óleo essencial das folhas de *C. rhamnifolioides* mostraram-se promissores tanto em sua apresentação pura quanto em nanocápsulas de policaprolactona, cujos valores de CL₅₀ foram <30 µg/mL e <75 µg/mL, respectivamente. Assim, o óleo de *C. rhamnifolioides* pode ser uma alternativa viável, embora estudos complementares sejam necessários para compreender o efeito de variáveis como: idade do vegetal, período de coleta, fatores climáticos, volatilização do óleo, técnica de obtenção do óleo, tempo de armazenamento e forma de conservação do óleo, sobre sua performance larvicida.

É possível ainda sugerir quanto à nanopartícula testada que, outros polímeros sintéticos possam promover um perfil de liberação mais adequado do princípio ativo e, conseqüentemente, possam potencializar a ação larvicida do óleo de *C. rhamnifolioides*.

Diante do exposto, investir no desenvolvimento de um produto à base de óleos essenciais de *C. rhamnifolioides*, empregando nanotecnologia para o controle da liberação e prolongamento da ação do ativo, como já ocorre com diversos fármacos, poderá aumentar sua estabilidade e atividade tóxica para larvas de *A. aegypti*. Contudo, a destruição e eliminação de criadouros larvais desta espécie de mosquito devem continuar a ser a principal ação de controle, trabalhada junto à população, a fim de reforçar a importância do papel de cada um no combate ao mosquito.

5. AGRADECIMENTOS:

Ao IFPE pela oportunidade de realizar o Curso de Graduação e Pós Graduação; às parcerias envolvidas com os laboratórios da UFPE e o IAM/Fiocruz-PE. À tecnóloga Ana Paula Araújo do Laboratório do Serviço de Referência em Controle de Culicídeos Vetores

(SRCCV)/IAM/Fiocruz-PE, pelo apoio nos testes biológicos.

6. REFERÊNCIAS:

1. Adams, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Carol Stream: Allured Publ. Corp. **2001**.
2. Araujo, A.P., Araujo Diniz, D.F., Helvecio, E., De Barros, R.A., De Oliveira, C.M., Ayres, C.F., De Melo-Santos, M.A., Regis, L.N. and Silva-Filha, M.H., *Parasit Vectors*, **2013**, 6,297.
3. Andrés, M.F., Rossa, G.E. Cassel, E., Vargas, R.M.F., Santana, O., Díaz, C.E., González-Coloma, A. *Food Chem. Toxicol.*, **2017**, 109,1086.
4. Braga, I. A., Valle, D., *Epidemiol. Serv. Saúde* **2007**, 16, 279.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Programa Nacional de Controle da Dengue. Brasília. **2002**, 154 p.
6. Castillo, R., Stashenko, E., Duque, J. *J. Am. Mosquito Contr.*, **2017**, 33, 25.
7. Carvalho Filho, J. L. S., Blank, A. F., Alves, P. B., Ehlert, P. A. D., Melo, A. S., Cavalcanti, S. C. H., Arrigoni-Blank, M. F.; Silva- Mann, R. *Rev. bras. farmacogn.*, **2006**, 16, 24.
8. Chediak, M., G. Pimenta F, J., Coelho, G.E., Braga, I.A., Lima, J.B., Cavalcante, K.R., Sousa, L.C., Melo-Santos, M.A., Macoris Mde, L., Araujo, A.P., Ayres, C.F., Andrighetti, M.T., Gomes, R.G., Campos, K.B. and Guedes, R.N., *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **2016**, 111, 321.
9. Christofoli, M., Costa, E. C. C., Bicalho, K. U., de Cássia Domingues, V., Peixoto, M. F., Alves, C. C. F., Araújo, W. L., De Melo Casal, C. *Ind. Crops Prod.*, **2015**, 70, 301.
10. Chiarella, J. M. *Rev. Ciênc. Méd. Sorocaba*, **2016**, 18, 123.
11. Corrêa, J. C. R.; Salgado, H. R. N. *Rev. Bras. Pl. Med.*, **2011**, 13, 500.
12. Da Câmara, C. A. G., De Moraes, M. M., De Melo, J.P.R., Da Silva, M.C. *J. Essent. Oil-Bear. Plants*, **2017**, 20, 1434.
13. Da Costa, A. C. V., Melo, G. F. D., Madruga, M. S., Da Costa, J. G. M., Garino, F., Neto, V. Q. *Semina: Ciênc. Agrár.* **2013**, 34, 2853.
14. Dias, C. N., Moraes, D. F. C. *Parasitol. Res.* **2014**, 113, 565.
15. Flores, F. C., Ribeiro, R. F., Ourique, A. F., Rolim, C. M. B., Silva, C. B., Pohlmann, A. R., Beck, R. C. R., Guterres, S. S. *Quim. Nova*, **2011**, 34, 968.
16. Jintana, Y., Saowanee, C., Nongkran, L., Pradya, S. *Acta Trop.* **2015**, 149, 232.
17. Kanés, LA; Prophiro, JS; Guerreiro, K; Cledes, I; Silva, OS; Vieira, ES; Nascimento, MP; Zepon, KM; *Parasitol. Res.* **2011**, 108, 1.
18. Kerrola, K; Galambosi, B; Kallio, H; J. *Agr. Food Chem.* **1994**, 42, 775.
19. Lago, J. H. G., Soares, M. G., Batista, P. L. G., Silva, M. F. G. F., Corrêa, A. G., Fernandes, J. B., Vieira, P. C., Roque, N. F. *Rev. Phytochem.* **2006**, 67, 589.
20. Lima, G., Souza, T. Paula Freire, G., Farias, D., Cunha, A., Nágila, R., Moraes, S., Carvalho, A. *Parasitol. Res.*, **2013**, 112, 1953.
21. Manimaran, A., Cruz, M. J. J., Muthu, C., Vicent, s., Ignacimuthu, S. *Adv. Biosci. Biotechnol.*, **2012**, 3, 855.
22. Natrajan, D., Srivasan, S., Sundar, K., Ravindran, A. *J. food drug anal.*, **2015**, 23, 560.
23. Organização mundial de saúde. Pesticide and Their Application. For the Control of Vectors and Pests of Public Health Importance. Geneva, Switzerland. WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP, **2006**.
24. Pavela, R., *Curr. Org. Chem.*, **2016**, 20, 2674.
25. Penna, M. L. F. *Cad. Saúde Pública*, **2003**, 19, 305.
26. Peng, C., Zhao, S-Q., Zhang, J., Huang, G.Y., Chen, L.Y., Zhao, F-Y. *Food Chem.*, **2014**, 165, 560.
27. Pontes, R. J.S., Ruffino, N. A., *Rev. Saúde Públ.*, **1994**, 28.
28. Prezoto, F. *Ces Revista*, **2016**, 30, 267.
29. Randau, K. P., Florêncio, D. C., Ferreira, C. P., Xavier, H. S. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2004**, 14, 89.
30. Rose, R. I. *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, 7, 17.
31. Sundararajan, B., Thamaraselvi, R., Anil, K. M., Ranjitha, K. B. D. *Rev. Microb. Pathog.* **2018**, 125.
32. Santos, G. K. N., Dutra, K. A., Lira, C. S., Lima, B. N., Napoleão, T. H., Paiva, P. M. G; Maranhão, C. A., Brandão, S. S. F., Navarro, D. M. A. F. *Molecules*, **2014**, 19, 16573.

33. Santos, A. G. S., Dutra, K. A., Dutra, m. T. D., Silva, F. S. V. C. B., Maranhão, C. A., Navarro, D. M. A. F., Frutuoso, M. N. M. A., Brandão, S. S. F. *Holos*, **2015**, 31, 36.
34. Soloway, S. B. *Environ. Health Perspect*, **1976**, 14, 109.
35. Soonwera, M. *Parasitology Research*, **2015**, 114, 4531.
36. Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M; Kulkarni, A. R., Rudzinski, W. E., *J. Control. Release*, **2001**, 70, 1.
37. Souza, G.S., Bonilla, O.H., Lucena, E.M.P., Barbosa, Y.P. *Cienc. Rural*, **2017**, 47, 1.
38. Souza, S. S., Silva, I. G., Silva, H. H. G. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **2010**, 43, 152.
39. Vidal, C. S., Martins, A. O. B. P. B., Silva, A. A., Oliveira, M. R. C., Ribeiro-Filho, J., Albuquerque, T. R., Coutinho, H. D. M., Almeida, J. R. G. S., Junior, L. J. Q., Menezes, I. R. A. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, 89, 47.
40. Vishwakarma G. S., Gautama, N., Babub, J. N., Mittala, S., Jaitakc, V., *Polym.Rev.*, **2016**, 56, 668.

Tabela 1 - Tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI), potencial Zeta, doseamento eficiência de encapsulação (EE %) determinado por cromatografia líquida de alta performance (CLAE) e espectrofotometria de absorção no UV-Visível (UV-Vis) nas nanocápsulas sem (NC-PCL) e com óleo essencial (NC-PCL/OE).

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

Autoria: Milena Ferraz, 2018

Tabela 2- Curva analítica do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* a 236 nm.

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

Autoria: Milena Ferraz, 2018

Tabela 3- Parâmetros do método espectrofotométrico e CLAE para a quantificação do óleo essencial (OE).

Parâmetros	Espectrofotometria	CLAE
Comprimento de onda de medição (nm)	236	236
Faixa linear (µg/mL ⁻¹)	50-300	50-300
Intercepto ± (desvio padrão)	-0,0024 (± 0,006)	-0,088 (± 0,118)
Inclinação ± (desvio padrão)	0,0027 (± 0,00003)	0,052 (± 0,0006)
Coefficiente de correlação (r ²)	0,9993	0,9993
Limite de detecção, LD, (µg/mL ⁻¹)	7,33	7,49
Limite de quantificação, LQ, (µg/mL ⁻¹)	22,22	22,69

Autoria: Milena Ferraz, 2018

Tabela 4 - Toxicidade de diferentes lotes de produção do óleo essencial de folhas de *Croton rhamnifolioides* para larvas de *Aedes aegypti*, provenientes da colônia Recife-Laboratório (RecL).

Lote	Tempo de exposição (h)	CL ₅₀ ² (Intervalo de confiança 95%)	CL ₉₀ ² (Intervalo de confiança 95%)
A	48	48,2 (38,8 – 60,5)	60,7 (47,6 – 76,4)
B	48	52,2 (45,0 – 62,0)	68,7 (53,7 – 93,7)
C	24	26,3 (20,2 – 30,8)	39,0 (27,8 – 51,0)
D	24	26,4 (23,5 – 29,9)	37,8 (31,7 – 46,1)
D ¹	48	63,4 (51,6 – 74,0)	108,8 (84,5 – 146,4)

1 = Amostra de óleo essencial do lote D nanoencapsulada.

2 = Concentração letal média (µg/ml) para 50% (LC₅₀) ou para 90% (LC₉₀) das larvas expostas.

Autoria: Melo-Santos, 2019

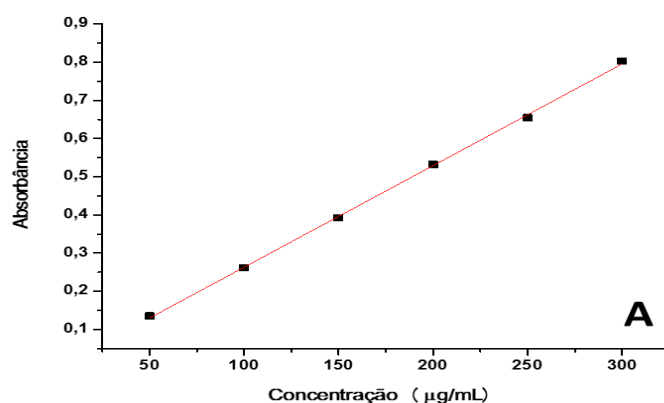


Figura 1 - Análise de regressão linear do óleo essencial por espectroscopia (A). A linha vermelha representa o ajuste à regressão linear.

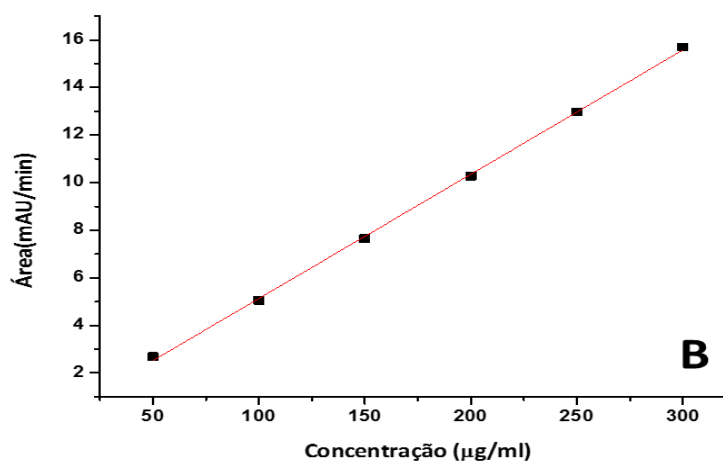


Figura 2- Análise de regressão linear do óleo essencial por CLAE (B). A linha vermelha representa o ajuste à regressão linear.