



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Desenvolvimento de formulação larvicida e repelente a partir do óleo essencial de
Lippia origanoides contra *Aedes aegypti***

JANSYCLEID PEREIRA GONÇALVES

Teresina-Piauí

2018

JANSYCLEID PEREIRA GONÇALVES

**Desenvolvimento de formulação larvicida e repelente a partir do óleo essencial de
Lippia origanoides contra *Aedes aegypti***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros Carvalho

Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho

Teresina-Piauí

2018

Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do CCS
Serviço de Processamento Técnico

G635d Gonçalves, Jansycleid Pereira.
Desenvolvimento de formulação larvicida e repelente a partir do óleo essencial de *Lippia organoides* contra *Aedes aegypti* / Jansycleid Pereira Gonçalves. -- Teresina, 2018.
96 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2018.
"Orientação: Profa. Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros Carvalho."
Bibliografia

1. *Lippia organoides*. 2. Óleo essencial. 3. Timol. 4. Carvacrol. 5. *Aedes aegypti*. I. Carvalho, Fernando Aécio de Amorim. II. Título.

CDD 615.32

Elaborada por Fabíola Nunes Brasilino CRB 3/ 1014

JANSYCLEID PEREIRA GONÇALVES

**Desenvolvimento de formulação larvicida e repelente a partir do óleo essencial de
Lippia origanoides contra *Aedes aegypti***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros Carvalho

Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho

BANCA EXAMINADORA

Profa Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros Carvalho (Orientadora)
Departamento de Farmácia – UFPI

Profa. Dra. Hercília Maria Lins Rolim
Departamento de Farmácia – UFPI

Profa. Dr. Reginaldo Rorís Cavalcante
Departamento de Microbiologia e Parasitologia - UFPI

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR DE ENSINO E PÓS-GRADUAÇÃO

Profa. Dra. Regina Lúcia Ferreira Gomes

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Viriato Campelo

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Profa. Dr. André Luís Menezes de Carvalho

“Construí amigos, enfrentei derrotas, venci
obstáculos, bati na porta da vida e disse-lhe: não
tenho medo de vivê-la.”

Augusto Cury

DEDICATÓRIA

À minha mãe Janns por todo empenho, amor e apoio dados a mim e por ter me ensinado a lutar para alcançar todos os meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde, energia, força e perseverança para realização deste trabalho, muito sonhado por mim;

À minha família, pelo amor, incentivo e apoio em todos os momentos;

À minha orientadora, *Profa. Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros*, pela oportunidade, confiança e paciência;

Ao meu co-orientador *Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho*, por todo empenho, competência e motivação dedicados a mim e a este trabalho;

Ao *Prof. Dr. Reginaldo Rorís Cavalcante*, pela disponibilidade e prontidão;

Aos professores do PPGCF pelos ensinamentos em todo caminho percorrido;

À **Jociane Alves da Silva Reis**, pela dedicação e companheirismo, este trabalho é nosso;

Aos amigos **Paulo Ernesto Raposo Campelo**, **Jefferson de Sousa Serafim**, **Socorro de Maria Fernandes Monteiro Feitoza** e **Raniere Madeiros de Carvalho** do Núcleo de Entomologia do Piauí (NEPI) pela prontidão, fundamentais no decorrer deste trabalho;

À UFPI, por toda estrutura concedida;

À FAPEPI/CNPq pela bolsa concedida e pelo financiamento do projeto.

E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram neste trabalho, muito obrigada!

Desenvolvimento de formulação larvicida e repelente a partir do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. contra *Aedes aegypti*. Jansycleid Pereira Gonçalves.

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros Carvalho. Dissertação de Mestrado. 96p. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPI, 2018.

RESUMO

As arboviroses são doenças transmitidas por mosquitos (Diptera: Culicidae), dentre as quais podemos destacar a dengue, chikungunya, zika e febre amarela que são adquiridas através da picada das fêmeas da espécie *Aedes aegypti*. Uma das maneiras utilizadas para prevenir estas doenças é o combate ao mosquito vetor através da utilização de inseticidas e repelentes disponíveis no mercado. Os inseticidas mais empregados são os organoclorados e os organofosforados, entretanto, causam danos ao meio ambiente e aos organismos não-alvo. Uma alternativa para diminuir estes efeitos são produtos de origem natural, utilizando os óleos essenciais de plantas, seja como ativo principal ou coadjuvante de produtos sintéticos. A *Lippia origanoides* é um arbusto proveniente do Cerrado brasileiro, rico em óleos essenciais, com ampla utilização na medicina tradicional em desordens gastrointestinais e como antisséptico. As propriedades aromáticas marcantes do óleo essencial de suas partes aéreas relatadas em estudos, já comprovam atividades farmacológicas. Nesta perspectiva, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial larvicida e repelente das partes aéreas de *Lippia origanoides* H.B.K com aplicação para controle do mosquito *Aedes aegypti*, bem como os seus componentes majoritários, timol e carvacrol e a possível potencialização do seu efeito quando complexado com β -ciclodextrina. Para tanto foi realizada uma prospecção científica e tecnológica nas bases de dados científicas PubMed, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Web of Science e Scopus, e em outras relativas à patentes e modelos de utilidade Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), do *European Patent Office* (EPO) e da Patentes da América Latina e Espanha (LATIPAT), para identificar os estudos e patentes desenvolvidos já realizados acerca das propriedades dos óleos essenciais como larvicida e repelente. Portanto, foram encontrados 111 artigos e apenas 8 patentes, evidenciando a necessidade do desenvolvimento de estudos direcionados a elaboração de produtos com aplicações no mercado consumidor. O OELO e seus componentes majoritários apresentaram potencial larvicida com CL_{50} de 112,68; 85,46; 93,1 $\mu\text{g/mL}$ e CL_{90} 156,1; 107,51; 108,5 $\mu\text{g/mL}$. Os testes larvicida com o OELO, timol e carvacrol complexados à β -ciclodextrina nas mesmas concentrações demonstraram atividade superior, quando consideradas as concentrações de ativos, presentes em cada complexo. O OELO solubilizados em tween 80 1%, nas concentrações de 250; 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram a atividade repelente de 48% para 250 $\mu\text{g/mL}$ e de 100% nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Foram desenvolvidas seis formulações-teste com o OELO e ao final do estudo de estabilidade preliminar foram aprovadas duas formulações. As duas formulações aprovadas seguiram para o teste de atividade repelente frente ao *A. aegypti* e apresentaram 100% de repelência em todo o teste, assim como atividade inseticida. Portanto, pode-se concluir que o OELO, assim como os seus componentes majoritários demonstram ser promissores agentes larvicidas e repelentes no desenvolvimento de produtos naturais para atuarem no combate ao *A. aegypti*.

Palavras-chave: *Lippia origanoides*, óleo essencial, timol, carvacrol, *Aedes aegypti*.

Desenvolvimento de formulação larvicida e repelente a partir do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. contra *Aedes aegypti*. Jansycleid Pereira Gonçalves.

Adviser: Profa. Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros. Master's Thesis. 96p. Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, UFPI, 2018.

ABSTRACT

Arboviruses are mosquito-borne diseases (Diptera: Culicidae), among which we can highlight the dengue, chikungunya, zika and yellow fever that are acquired through the bite of the females of the species *Aedes aegypti*. One of the ways used to prevent these diseases is to combat the mosquito vector through the use of insecticides and repellents available in the market. The most commonly used insecticides are organochlorines and organophosphates, however, causing damage to the environment and non-target organisms. An alternative to diminish these effects are products of natural origin, using the essential oils of plants, either as main active or coadjuvants of the synthetic products. *Lippia origanoides* H.B.K is a shrub from the Brazilian Cerrado, rich in essential oils, widely used in traditional medicine in gastrointestinal disorders and as an antiseptic. The remarkable aromatic properties of the essential oil of its aerial parts, together with studies that already prove pharmacological activities in cells. In this perspective, the objective of this work was to evaluate the larvicidal and repellent potential of the aerial parts of *Lippia origanoides* H.B.K with application to control the *Aedes aegypti* mosquito, as well as its major components, thymol and carvacrol and the possible enhancement of its effect when complexed with β -cyclodextrin. For this purpose, a scientific and technological survey was carried out in the scientific databases PubMed, Virtual Health Library (VHL), Web of Science and Scopus, and in others related to patents and utility models National Institute of Industrial Property (INPI), The European Patent Office (EPO) and the Latin American and Spanish Patent (LATIPAT) to identify the studies and patents already developed on the properties of essential oils such as larvicide and repellent. Therefore, 111 articles and only 8 patents were found, evidencing the need to develop studies aimed at the elaboration of products with applications in the consumer market. The EOLO and its major components presented a good larvicidal potential with LC50 of 112.68; 85.46; 93.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and LC90 156.1; 107.51; 108.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$. The larvicidal tests with EOLO, thymol and carvacrol complexed to the β -cyclodextrin in the same concentrations showed superior activity when considering the active concentrations present in each complex. The EOLO solubilized in tween 80 1% at concentrations of 250; 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ showed a repellent activity of 48% at 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 100% at concentrations of 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Six test formulations were developed with EOLO and at the end of the preliminary stability study two formulations were approved. The two approved formulations followed the test for repellent activity against *A. aegypti* and showed 100% repellency throughout the test, as well as insecticidal activity. Therefore, it can be concluded that EOLO as well as its major components demonstrate promising larvicidal and repellent agents in the development of natural products to combat *A. aegypti*.

Keywords: *Lippia origanoides*, essential oil, thymol, carvacrol, *Aedes aegypti*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| LISTA DE FIGURAS | Páginas |
|--|---------|
| REFERENCIAL TEÓRICO | |
| Figura 1 - Principais terpenos presentes em óleos essenciais. | 23 |
| Figura 2 - <i>Lippia organoides</i> H.B.K. | 25 |
| Figura 3 - Propriedades e estrutura química de α -CD, β -CD e γ -CD. | 31 |
| CAPÍTULO I | |
| Figura 1 - Fluxograma de seleção dos estudos primários da prospecção científica. | 44 |
| Figura 2 – Distribuição dos artigos em suas respectivas bases de dados. | 45 |
| Figura 3 - Distribuição dos artigos segundo o ano de publicação. | 46 |
| Figura 4 - Distribuição das atividades testadas nos artigos selecionados. | 47 |
| Figura 5 - Distribuição das espécies de mosquitos testadas nos artigos selecionados. | 48 |
| Figura 6 - Total de patentes pesquisadas nas bases de dados INPI, WIPO, USPTO, EPO e LATIPAT. | 50 |
| Figura 7 - Número de patentes de acordo com o ano de publicação. | 52 |
| Figura 8 - Número de patentes publicadas segundo o país de origem. | 53 |
| CAPÍTULO II | |
| Figura 1 - Aparelho de hidrodestilação tipo Clevenger modificada. | 63 |
| Figura 2 - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas. | 64 |
| Figura 3 - Aparelho <i>spray-drying</i> de bancada (BUCHI B-290). | 65 |
| Figura 4 - Banho termostaticado | 68 |
| Figura 5 - Aparelho de espalhabilidade | 70 |
| Figura 6 - Avaliação da atividade repelente do OELO contra <i>Aedes aegypti</i> . | 72 |
| Figura 7 - Instrumento de teste de atividade repelente em humano. | 73 |
| Figura 8 - Cromatograma dos íons totais (TIC) dos constituintes voláteis do óleo essencial de <i>Lippia organoides</i> . | 76 |
| Figura 9 - Espectros de massas dos compostos majoritários do óleo essencial das partes aéreas de <i>L. organoides</i> H.B.K . | 76 |
| Figura 10 - Valores de espalhabilidade das formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 em tempo zero, após teste estresse térmico, após teste ciclo gelo-degelo e em amostras mantidas a temperatura ambiente. | 79 |
| Figura 11 - Atividade larvicida do óleo essencial de <i>Lippia organoides</i> contra <i>Aedes aegypti</i> . | 82 |
| Figura 12 - Atividade repelente do óleo essencial de <i>Lippia organoides</i> contra <i>Aedes aegypti</i> . | 84 |

| | |
|---|----|
| Figura 13 - Atividade repelente das formulações F1, F2 e F3 contra <i>Aedes aegypti</i> . | 86 |
|---|----|

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I

| | |
|--|----|
| Quadro 1 - Distribuição dos termos de busca utilizados | 42 |
| Quadro 2 - Principais características das patentes analisadas. | 51 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Composição das bases das formulações. | 66 |
| Tabela 2 - Composição química do óleo essencial de <i>L. origanoides</i> H.B.K | 75 |
| Tabela 3 - Características organolépticas das formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 em tempo zero, após teste estresse térmico, após teste ciclo gelo-degelo e em amostras mantidas a temperatura ambiente. | 78 |
| Tabela 4 - Atividade larvicida do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> contra <i>Aedes aegypti</i> . | 81 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CD: Ciclodextrina

α -CD: alfa ciclodextrina

β -CD: beta ciclodextrina

γ -CD: gama ciclodextrina

CL₅₀: Concentração letal 50%

CL₉₀: Concentração letal 90%

DSC: Calorimetria diferencial de varredura

EPO: European Patent Office

FTIR: espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier

INPI: Instituto Nacional de Proteção Industrial

LATIPAT: Patentes da América Latina e Espanha

$\mu\text{g/mL}$: micrograma por mililitro

OE: óleo essencial

OELO: óleo essencial de *Lippia origanoides*

RD₅₀: dose repelente 50%

RD₉₀: dose repelente 90%

WIPO: World Intellectual Property Organization

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES:

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | | |
|--|---------------------------------|-----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 | OBJETIVOS | 20 |
| 2.1 | Objetivo Geral..... | 20 |
| 2.2 | Objetivos Específicos..... | 20 |
| 3 | REFERENCIAL TEÓRICO | 21 |
| 3.1 | Plantas Medicinais | 21 |
| 3.2 | Óleos Essenciais..... | 22 |
| 3.3 | Monoterpenos..... | 24 |
| 3.4 | <i>Lippia origanoides</i> | 24 |
| 3.5 | <i>Aedes aegypti</i> | 26 |
| 3.6 | Inseticidas e Repelentes | 26 |
| 3.7 | Ciclodextrinas | 326 |
| CAPÍTULO I: ATIVIDADES INSETICIDA E REPELENTE DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTRA MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE): UMA PROSPECÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA | | |

Resumo

Abstract

| | | | |
|---|------------------------------|----|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 40 | |
| 2 | METODOLOGIA | 42 | |
| 2.1 | Prospecção científica..... | 42 | |
| 2.2 | Prospecção tecnológica | 43 | |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 44 | |
| 4 | CONCLUSÃO | 53 | |
| CAPÍTULO II: EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LARVICIDA E REPELENTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>LIPPIA</i> <i>ORIGANOIDES</i> E DE SEUS COMPONENTES MAJORITÁRIOS CONTRA <i>AEDES</i> <i>AEGYPTI</i> | | | 57 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 60 |
| 2 | METODOLOGIA | 62 |
| 2.1 | Reagentes | 62 |
| 2.2 | Coleta do material vegetal..... | 62 |
| 2.3 | Obtenção do óleo essencial | 62 |
| 2.3.1 | Caracterização do óleo essencial por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas | 63 |
| 2.4 | Preparo dos complexos de inclusão | 64 |
| 2.4.1 | Malaxagem..... | 64 |
| 2.4.2 | Spray Drying | 64 |
| 2.5 | Desenvolvimento das formulações farmacêuticas | 66 |
| 2.5.1 | Formulação gel..... | 66 |
| 2.5.2 | Avaliação preliminar de estabilidade das formulações..... | 66 |
| 2.5.2.1 | Testes preliminares de estabilidade..... | 66 |
| 2.5.2.1.1 | Resistência à centrifugação | 67 |
| 2.5.2.1.2 | Estresse térmico | 67 |
| 2.5.2.1.3 | Ciclo gelo/degelo | 68 |
| 2.5.2.1.4 | Características organolépticas..... | 68 |
| 2.5.2.1.5 | Determinação do pH | 68 |
| 2.5.2.1.6 | Determinação da Espalhabilidade | 69 |
| 2.5.2.1.7 | Microscopia óptica | 70 |
| 2.6 | Avaliações das atividades biológicas | 70 |
| 2.6.1 | Animais | 66 |
| 2.6.2 | Atividade larvicida | 66 |
| 2.6.2.1 | Avaliação da atividade larvicida do OELO e de seus constituintes majoritários contra <i>Aedes aegypti</i> | 751 |
| 2.6.2.2 | Avaliação da atividade larvicida do OELO, Timol e Carvacrol complexados à β -ciclodextrina..... | 751 |
| 2.6.3 | Avaliação da atividade repelente das formulações | 732 |
| 2.6.3.1 | Avaliação da atividade repelente in vitro do óleo essencial e dos componentes majoritários | 732 |
| 2.6.3.2 | Avaliação da atividade repelente das formulações | 73 |
| 2.7 | Análises Estatísticas | 74 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 75 |
| 3.1 | Caracterização química do óleo essencial de <i>Lippia organoides</i> | 75 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 3.2 | Avaliação preliminar de estabilidade das formulações | 77 |
| 3.2.1 | Testes preliminares de estabilidade..... | 77 |
| 3.2.1.1 | Características organolépticas | 78 |
| 3.2.1.2 | Determinação do pH | 78 |
| 3.2.1.3 | Determinação da Espalhabilidade | 79 |
| 3.2.1.4 | Microscopia óptica..... | 80 |
| 3.3 | Avaliações das atividades biológicas | 83 |
| 3.3.1 | Avaliação da atividade larvicida do OELO e de seus constituintes majoritários contra <i>Aedes aegypti</i> | 80 |
| 3.3.2 | Avaliação da atividade repelente do OELO contra <i>Aedes aegypti</i> | 83 |
| 3.3.3 | Avaliação da atividade repelente das formulações | 85 |
| 4 | CONCLUSÃO | 877 |
| | REFERÊNCIAS | 87 |
| 4 | CONCLUSÃO | 922 |

1 INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* é originário da África e é conhecido por transmitir arborvíroses em locais com clima predominantemente tropical. Pode viver de 2-4 semanas, sendo seus ovos muito resistentes ao clima seco. (CHANG et al, 2016). Este inseto tornou-se predominantemente urbano e raramente invade ambientes silvestres. As fêmeas ovipositam e suas formas imaturas podem desenvolver-se em água limpa ou água contendo uma quantidade moderada de matéria orgânica como piscinas, pneus, jarros de plantas, telhado, entre outros (MARCONDES; XIMENES, 2016).

Doenças como dengue, zika, chikungunya e febre amarela podem ser transmitidas por este mosquito. A dengue se tornou endêmica no Brasil desde 1986, apesar dos programas de controle de vetores estabelecidos no país e que continuam até hoje. A partir da década de 1990 foi percebido falhas no controle do *A. aegypti* principalmente no que diz respeito a resistência aos inseticidas químicos, onde se destacam os organofosforados e piretroides, que requerem monitoramento constante (TAUIL, 2002). A resistência ao temefos, organofosforados, levou à uma série de relatórios sobre este fenômeno e uma preocupação no país (DIAS; MORAIS, 2014; CHEDIAK et al, 2016).

O combate efetivo do vetor mostra ainda ser a medida mais eficaz para manejo destas doenças, considerando o fato de inexistir vacinas e tratamentos eficazes, somado à toxicidade desses inseticidas disponíveis no mercado (MARQUES et al, 2011).

Uma alternativa para o combate ao vetor se faz necessária, e neste cenário destacamos as plantas, que constituem uma fonte renovável de metabólitos especializados, com uma enorme variabilidade química estrutural decorrente da plasticidade metabólica necessária à adaptação desses seres às diversas situações de estresse ambiental. Os metabólitos secundários, no vegetal, são produzidos para desempenhar um papel específico, importante na adaptabilidade dos organismos vivos as condições ambientais a que são sujeitos (SIMÕES, et al, 2017).

Dentre os metabólitos, destacamos os óleos essenciais (OEs) devido a sua importância para a sobrevivência da planta. O seu uso tem sido sugerido para o combate a insetos, pois alguns deles podem ser seletivos, além de serem biodegradáveis e por causarem menos efeitos adversos a organismos não-alvo e ao meio ambiente (LIU et al, 2015).

Os OEs são largamente usados por suas propriedades biológicas, dentre as quais podemos destacar as ações já comprovadas: bactericida, antiviral, fungicida, antiparasitário e inseticida, além das propriedades medicinais como analgésico, anti-inflamatório, sedativo, anti-espasmótico e anestésico local (BILIA et al, 2014). A obtenção dos óleos essenciais pode ser a partir de um processo extrativo como expressão, fermentação, enfleurage e extração, sendo o método mais comumente utilizado, para fins comerciais de produção de OEs, é a destilação por arraste de vapor (BURT, 2004). Podem ser obtidos de várias partes das plantas aromáticas, tais como: flores, frutos, sementes, folhas, galhos, casca e raiz, ou ainda por processos via biossintética. Os rendimentos de extração variam entre espécies e sofrem influências edafoclimáticas, o que os torna substâncias raras e altamente valiosas (ASBAHANI et al, 2015).

Pesquisas demonstraram que 52 espécies do gênero *Lippia* sp são amplamente utilizados na Europa Central e América do Sul por conter OEs com propriedades medicinais e na África Tropical por suas atividades biológicas antibacterianas, antivirais, antifúngicas e antiparasitárias, podendo apresentar também atividade inseticida por sua composição química e farmacológica (MUÑOZ; STASCENKO; OCAMPO, 2014).

A *Lippia origanoides* H.B.K (Verbenaceae) é uma planta aromática encontrada no nordeste e região central da América do Sul e amplamente utilizada para fins medicinais (TELES et al, 2014). No Brasil, podemos encontrá-la no bioma de Cerrado. O óleo essencial (OE) extraído das folhas de *L. origanoides* H.B.K apresenta atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e acaricida (TOZIN; MARQUES; RODRIGUES, 2015).

Os OEs de plantas são compostos com alta volatilidade, podendo se decompor ao entrar em contato com luz, umidade e calor, através de reações de oxidação, isomerização ou ciclização (BILIA et al, 2014). Estratégias tecnológicas se fazem necessárias a fim de aumentar a estabilidade, sendo a tecnologia de encapsulação de compostos uma opção assegurar uma proteção contra fatores externos. Esta estratégia possibilita aumento da estabilidade, duração do seu efeito e pode possibilitar uma liberação controlada quando incorporado numa forma farmacêutica (ASBAHANI et al, 2015). A complexação física de óleos essenciais em excipientes, composto por polímeros que possuem propriedades hospedeiras, representam uma estratégia simples

para estabilização de OEs, de modo a aumentar a sua estabilidade e/ou melhorar o perfil de solubilidade (BILIA et al, 2014).

As ciclodextrinas (CD) são polímeros compostos de grupos de oligossacarídeos cíclicos contendo seis, sete, ou oito moléculas de glicopiranosose que possuem a forma cônica com bordas hidrofílicas e cavidade interna relativamente hidrofóbica, onde a parte hidrofóbica da substância fica acomodada, enquanto a parte polar, se esta estiver presente, faz associação com as bordas externa resultando na estabilização do complexo de inclusão (ROY; SAHA, 2016). Estas moléculas incluem propriedades como biocompatibilidade e capacidade de formar complexos de inclusão com substâncias com baixa solubilidade em água em sua cavidade hidrofóbica. Esta abordagem ajuda a melhorar a solubilidade em água dos fármacos, bem como aumentar a sua estabilidade e promover a liberação controlada durante períodos prolongados de tempo (MOREIRA et al, 2016). Por estas propriedades, as ciclodextrinas são amplamente utilizadas no campo de produtos farmacêuticos, pesticidas, alimentos, artigos de higiene, indústria de transformação de têxteis, química supramolecular, encapsulamento molecular, dentre outras aplicações (ROY; SAHA, 2016).

Para o desenvolvimento de formulações cosméticas, como inseticidas e repelentes, é necessário a realização de testes de estabilidade preliminar, que, segundo o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA, os parâmetros a serem considerados nos estudos de estabilidade compreendem parâmetros organolépticos (cor, odor e aspecto e sabor, quando aplicável), parâmetros físico-químicos (pH, densidade, espalhabilidade, viscosidade) e parâmetro microbiológicos (contagem microbiana e teste de desafio do sistema conservante - Challenge Test) (BRASIL, 2004).

Os estudos de estabilidade preliminar, também conhecidos como teste de triagem, estabilidade acelerada ou de curto prazo, são realizadas na fase inicial do desenvolvimento do produto, podendo durar geralmente 15 dias. Neste teste, são empregadas condições extremas de temperatura, acelerando assim o aparecimento de possíveis instabilidades, com o objetivo principal de auxiliar e orientar a escolha das formulações (BRASIL, 2004).

Diante do exposto, esta pesquisa tem como objetivo principal avaliar as atividades larvicida e repelente do óleo essencial da *Lippia organoides* H.B.K e de seus componentes majoritário, timol e carvacrol, e o óleo essencial complexado com β -ciclodextrina para o combate ao *Aedes aegypti*, dos respectivos componentes

complexados à β -ciclodextrina frente ao *Aedes aegypti* e o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica repelente, afim de contribuir para o desenvolvimento tecnológico de um novo produto natural inseticida e repelente como alternativa ao combate de doenças veiculadas por este vetor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver formulações larvicida e repelente a partir do óleo essencial de *Lippia origanoides* contra *Aedes aegypti*.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a literatura quanto à atividade larvicida e repelente dentro da temática do trabalho;
- ✓ Obter o óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K ;
- ✓ Caracterizar quimicamente o óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K ;
- ✓ Obter complexos de inclusão a partir do óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K e de seus componentes majoritários;
- ✓ Avaliar a atividade larvicida do óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K e de seus constituintes majoritários complexados à β -ciclodextrina;
- ✓ Avaliar a atividade repelente do óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K e de seus constituintes majoritários;
- ✓ Desenvolver uma formulação a partir do óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K e avaliar o seu potencial repelente contra *Aedes aegypti*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Plantas medicinais

As plantas medicinais fazem parte da nossa sociedade como ferramenta de combate às enfermidades, utilizada na cura e prevenção de doenças desde o início da civilização, ora como a única forma de tratamento, seja como um tratamento alternativo para problemas de saúde. Ao longo das décadas, muitas plantas com propriedades biológicas foram estudadas por empresas para o desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos (PAULA; RESENDE; MIALHE, 2012).

O Brasil tem a maior biodiversidade do mundo, representando uma importante fonte de moléculas biologicamente ativas e ao mesmo tempo não desfruta de vantagens competitivas na obtenção de novos produtos e patentes, devido a carências de estudos sistemáticos com a utilização racional dos recursos naturais para obtenção de medicamentos oriundos da flora brasileira (VILLAS BÔAS e GADELHA, 2007).

O Brasil possui cerca de 55 mil espécies de plantas catalogadas de um total de 350.000 a 550.000 espécies, sendo considerado o país com a maior biodiversidade do planeta (ANDRADE et al, 2014)

O emprego de compostos naturais na busca de moléculas bioativas tem grande importância no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos. Cerca de 25% de todas as drogas produzidas em países desenvolvidos são produzidas direta ou indiretamente de produtos naturais. Muitos medicamentos valiosos disponíveis atualmente foram descobertos, muitas vezes, a partir do seu uso tradicional (MARQUES et al, 2017).

Estudos etnobotânicos desempenham papel primordial na documentação, valorização e entendimento dos usos populares das plantas. De fato, o conhecimento local e tradicional tem sido o ponto de partida para o desenvolvimento de muitas das últimas décadas (MISNI; NOR; AHMAD, 2016; RIBEIRO et al, 2017).

Os derivados ou extratos de plantas fornecem uma fonte valiosa de agentes medicinais. Estima-se que exista cerca de 250 mil espécies de plantas medicinais em todo o mundo. Entretanto, apenas 6% destas tiveram suas atividades biológicas comprovadas. Além disso, menos de 1% dos compostos de plantas medicinais foram avaliados em ensaios clínicos (SOOSARAEI et al, 2017).

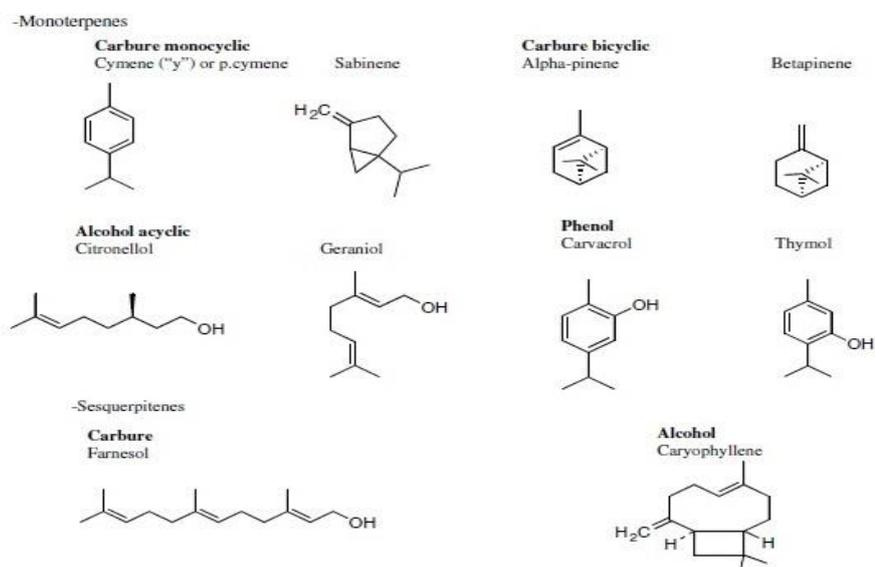
Estima-se que 75 a 80% da população mundial já utilizou medicamentos à base de plantas para cuidados com a saúde. A opção por medicamentos naturais é mais popular em grupos de baixa renda, particularmente àqueles que residem em áreas rurais de países em desenvolvimento onde os recursos são mais escassos, limitando o atendimento por profissionais da saúde. Em outros casos, acredita-se que a terapia alternativa natural tenha menos efeitos colaterais quando comparado aos produtos de drogas sintéticas disponíveis (MARQUES et al, 2017).

3.2 Óleos essenciais

Óleos Essenciais (OEs), que também podem ser chamados de óleos voláteis, são líquidos oleosos, altamente voláteis, provenientes a partir de material vegetal. Podem ser extraídos por diversos métodos como hidrodestilação, arraste por vapor d'água, expressão, fermentação, dentre outros. Estima-se que 3000 OEs sejam conhecidos, somente 300 possuem importância para fins comerciais (BURT, 2004).

Os constituintes químicos dos OEs incluem dois grupos. O primeiro inclui terpenos e terpenoides, enquanto o segundo é representado por constituintes aromáticos e alifáticos. Os terpenos são constituídos por diferentes classes, sendo compostos por unidades de isoprenos com 5 carbonos-base (C5) e são as moléculas mais representativas dos OEs, constituindo em torno de 90%. Os principais terpenos são os monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15), como mostra a Figura 1 (BAKKALI et al, 2008).

Figura 1 - Principais terpenos presentes em óleos essenciais



Fonte: BAKKALI, 2008.

A variabilidade dos óleos disponíveis sofre influência edafoclimáticas, onde plantas estudadas em diferentes estações do ano podem ter OEs com composições e rendimentos diferentes, podendo conter ou não um constituinte bioativo específico, gerando variações quantitativas e qualitativas devido a diversos fatores como qualidade do solo e condições climáticas, época da colheita, tipo de processamento e armazenamento e o método de extração escolhido, influenciar assim na eficácia de sua atividade biológica (SARRAZIN et al, 2015a).

OEs, entre os metabólitos, fazem parte da fisiologia vegetal de grande importância para a sobrevivência da planta com propriedades ambientais, seja para atrair os insetos o que favorece o processo de polinização das plantas, para garantir a reprodução, ou na proteção contra predadores (BAKKALI et al, 2008).

Os óleos essenciais representam grande importância econômica nos diversos setores industriais. São amplamente utilizados no setor farmacêutico pela sua atividade antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, dentre outras propriedades farmacológicas. No setor agrônomo são usados como pesticidas em programas de combate a doenças do campo, bem como em produtos alimentares estocados, uma vez que possuem propriedades repelentes, acaricidas, inseticidas e fumegantes (TELES et al, 2014).

Óleos essenciais possuem uma variedade fitoquímica em sua composição, dentre eles os monoterpenos possuem grande importância.

3.3 Monoterpenos

Os monoterpenos são substâncias derivadas de hidrocarbonetos de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) e originadas pela ligação de duas ou mais moléculas de isopreno (TURINA, et al, 2006). Podem ser classificados como acíclicos, cíclicos e bicíclicos e geralmente são analisados usando cromatografia gasosa (CG) e espectrometria de massa (MS) acoplados a diferentes técnicas de extração (CACHO et al, 2015). Os monoterpenos podem ser utilizados tanto para uso medicinal quanto para uso na indústria alimentícia. Estudos demonstraram propriedades de monoterpenos cíclicos, tais como timol e carvacrol, como anti-inflamatórias, antioxidantes, analgésicas e efeitos ansiolíticos significativos (LOZON et al, 2016).

O Timol (5-metil-2-(1-metiletil)-fenol) e carvacrol (2-metil-5-(1-metiletil)-fenol) são monoterpenos fenólicos frequentemente encontrados em óleos essenciais de espécies pertencentes à família Verbanaceae (NOVATO et al, 2015). Apresentam uma variedade de atividades biológicas como antifúngica, inseticida, antibacteriana, antiparasitária e antioxidante (LLANA-RUIZ-CABELLO et al, 2015). O carvacrol, em particular, ainda possui atividades antitumoral, antimutagênica, antigenotóxica, analgésica, antiespasmódica, anti-inflamatória, angiogênica, antiplaquetária, inibitória da AChE, antielastase, e hepatoprotetor (PÉREZ-SÁNCHEZ et al, 2015).

Estudos demonstraram que o timol pode interagir com as membranas e fosfolipídios das células, podendo assim interferir na permeabilidade da membrana, no potencial de ação de membrana e em seu fluxo de potássio (CHIKHOUNE et al, 2015).

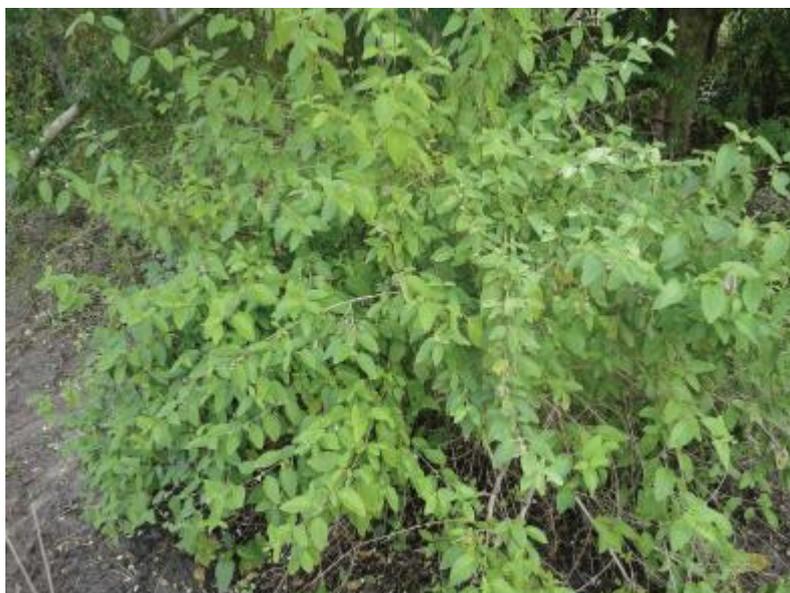
Sarrazin et al (2015b) demonstraram que o carvacrol presente em óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K foi eficaz contra o crescimento de microorganismos como *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*, que são bactérias que muitas vezes estão envolvidas em processos de deterioração dos alimentos, podendo assim atuar como conservante em alimentos processados.

3.4 *Lippia origanoides*

O gênero *Lippia* possui aproximadamente 200 espécies distribuídas no continente Africano, América do Sul e América Central. Óleos essenciais podem ser extraídos das diversas partes da planta, como folhas, flores ou partes aéreas para diversas finalidades medicinais, sendo comumente utilizadas para tratamentos respiratórios, gastrointestinais e lesões dérmicas (ESCOBAR et al, 2010).

A *Lippia origanoides* (figura 2) é uma planta aromática proveniente do Cerrado brasileiro e comumente encontrada na América do Sul, podendo também ser encontrada na América Central. (TOZIN; MARQUES; RODRIGUES, 2015). É conhecida no norte do Brasil como “salva-do-marajó” e alecrim-d’angola, podendo também ser chamada de orégano no México (SARRAZIN et al, 2015a). Estudos comprovaram que seu óleo essencial extraídos das folhas, apresenta atividades antimicrobianas, antivirais, acaricida, antioxidante e anti-inflamatória (TOZIN; MARQUES; RODRIGUES, 2015).

Figura 2: *Lippia origanoides* H.B.K.



Fonte: LOPES et al, 2014.

A composição do óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K presente na Amazônia brasileira e na Colômbia demonstrou uma variação significativa dos seus constituintes majoritários, permitindo subdividi-la em 5 quimiotipos diferentes: Quimiotipo A (p-cimeno, α e β -felandreno e limoneno), Quimiotipo B (carvacrol), Quimiotipo C (timol), Quimiotipo D (1,8-cineol) e Quimiotipo E ((E)-metil-cinamato e (E)-nerolidol) (SARRAZIN et al, 2015a).

O seu uso medicinal a partir da análise do seu óleo essencial vem sendo estudado e resultados demonstraram sua atividade contra *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyllum rubrum*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mutans*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania chagasi*.

Além dessas atividades, seu extrato etanólico apresentou ação anticolinesterásica, sequestradora de radicais livres e ação citotóxica contra linhagens de células cancerígenas (SILVA et al, 2015).

A toxicidade do óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K foi avaliada por vários estudos e apresentou resultados variados. Isso se deve a fatores relacionados ao cultivo e coleta da planta, à parte da planta utilizada, ao método de extração escolhido bem como às condições ambientais a que esta planta foi exposta (ANDRADE et al, 2014).

3.5 *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* é o vetor de uma das doenças emergentes mais importantes dos últimos anos. Somente no Brasil, foram diagnosticados mais de 80% dos casos de dengue da América Latina (MARQUES et al, 2011). Esta doença, considerada negligenciada, se torna um grande problema mundial levando em consideração o aumento da taxa da população humana, mudanças no clima, urbanização precária, e todos os fatores que podem favorecer a propagação dessa doença, bem como de seus vetores (CHEDIAK et al, 2016).

Os primeiros relatos do *Aedes aegypti* foram descrito por Linnaeus, no Egito em 1762, sendo posteriormente encontrado em todo o continente americano, sudeste da Ásia e na Índia. Estima-se que sua introdução no Brasil tenha ocorrido durante o período colonial, entre os séculos XVI e XIX. A partir do século XX o combate ao mosquito foi intensificado devido à morte de milhares de pessoas por febre amarela, sendo este controle através da eliminação mecânica dos criadouros. O *A. aegypti* chegou a ser erradicado por duas vezes no país, entre os anos de 1958 e 1973, entretanto em 1976, foi relatado sua reintrodução, na cidade de Salvador, estado da Bahia, devido à falhas no controle vetorial e ao crescimento urbano acelerado. Desde então, o mosquito vetor encontra-se presente em todo o país (CAVALCANTE; TAUILL, 2016; ZARA et al, 2016).

O *Aedes aegypti* se caracteriza como um mosquito de comportamento predominantemente urbano, podendo ser encontrado também em ambientes rurais. Os seus ovos possuem grande resistência fora da água, podendo durar até um ano. As fêmeas ovipositam na superfície de pneus, latas e garrafas, vasos de plantas, calhas e

caixas d'água contendo água. Ao entrar em contato com a água, os ovos eclodem em até 30 minutos. As larvas passam por 4 estágios até chegar a fase adulta, em um período de 5 a 7 dias

A transmissão de arboviroses como a dengue, febre amarela, Chikungunya e Zika por este vetor se dá através das picadas das fêmeas que consomem sangue de vertebrados, incluindo o homem. Através deste processo de alimentação, acabam por transmitir estas doenças extremamente prejudiciais aos seres humanos, tornando assim uma grande preocupação de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento (LIU et al, 2014).

Existe uma estreita semelhança entre as apresentações clínicas da dengue, chikungunya e Zika, que são caracterizados por febre, dor de cabeça, erupções cutâneas maculopapular, mialgia, artralgia e uma série de sinais e sintomas complexos que restringem o diagnóstico diferencial (ATIF et al, 2016).

A dengue é uma infecção viral proveniente da família Flaviviridae e gênero *Flavivirus*, sendo classificada em quatro sorotipos diferentes. Caracteriza-se por sintomas leves como mal-estar, calafrios, febre, dor de cabeça, dor muscular, artralgia e dor periorbital, podendo evoluir para febre hemorrágica e morte do paciente e estima-se que atinja cerca de 390 milhões de pessoas por ano (MARCONDES; XIMENES, 2016; ROSA et al, 2016).

A dengue foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1981, na cidade de Boa Vista, na região norte do país, com surtos dos sorotipos DENV-1 e DENV-4 que foram rapidamente suprimidos. Em 1986, no estado do Rio de Janeiro, houve uma epidemia do sorotipo DENV-1 espalhando-se por sete estados, quando em 1990 surgiram relatos de um novo surto, desta vez com o sorotipo DENV-2 novamente no Rio de Janeiro. Desde 1994, houve um aumento na vetorização da dengue, provocando uma rápida dispersão da doença. No Brasil, o DENV-3 foi primeiramente isolado em 2000, no estado do Rio de Janeiro, havendo grandes epidemias deste sorotipo em 2001 e 2002 neste estado. O DENV-4 ressurgiu no Brasil em 2010, no estado de Roraima, 28 anos depois de ter sido detectado no país (ARAÚJO et al, 2015)

O vírus Chikungunya causa sintomas parecidos com a dengue, no entanto com dores mais severas, enquanto o vírus Zika provoca sintomas fáceis de controlar, mas que em alguns pacientes é observado o aparecimento de síndrome neurológica e doenças autoimunes (MARCONDES; XIMENES, 2016; ROSA et al, 2016).

O vírus Zika apresenta sinais e sintomas que vão desde febre de baixa intensidade (37,8 a 38,5°C), erupções pruriginosas e maculopapulares, conjuntivite e artralgia, a sinais clínicos associados a infecção aguda como dor de cabeça, mialgia, hematospermia, astenia, perda auditiva transitória, dor retro-orbital, sangramento subcutâneo. As principais complicações associadas à infecção por Zika incluem microcefalia congênita e síndrome Guillain–Barré (ATIF et al, 2016).

Sendo o gênero *Aedes sp.* o principal vetor na propagação e transmissão destas arboviroses, as estratégias de prevenção se dão a partir da exterminação de criadouros, bem como o uso de inseticidas e repelentes contra estes insetos. Campanhas de saneamento em grande escala também se constituem como uma medida preventiva, levando em consideração que urbanização e saneamentos precários são fatores que contribuem para a proliferação destes vetores (ATIF et al, 2016).

3.6 Inseticidas e Repelentes

O controle químico de mosquitos vetores de doenças é realizado pelo uso de inseticidas utilizando compostos químicos, que podem afetar todos os estágios do ciclo biológico destes insetos. Na década de 1940, o controle de mosquitos envolveu o uso de inseticidas sintéticos, tais como DDT, clordano, hexacloro de benzeno e tetrafosfato de hexaetila. Os compostos químicos mais comumente utilizados no controle de larvas e pupas são os organofosfatos e os reguladores de crescimento de insetos (LIU et al, 2014; ARAÚJO et al, 2015).

As respostas comportamentais dos mosquitos frente aos compostos químicos são de suma importância para o desenvolvimento de programas de controle destes insetos. Teoricamente, esses compostos podem proteger os seres humanos por pelo menos dois mecanismos diferentes, pela mortalidade imediata ou sem contato modificando o comportamento do mosquito, levando a uma inibição da sua alimentação (NARARAK et al, 2016).

A repelência também representa um papel importante na prevenção de vetores transmissores de doenças. A maioria dos repelentes comerciais é preparada usando produtos químicos como alletrina, N, N-dietil-meta-toluamida (DEET), ftalato de dimetilo (DMP) e N, N-dietilo amida de ácido mendélico (DEM) (GOVINDARAJAN et al, 2016).

Segundo a Resolução RDC nº 19/2013, que dispõe sobre as normas técnicas de produtos cosméticos repelentes de insetos, o uso de DEET em produtos repelentes é proibido para crianças menores de 2 (dois) anos de idade. No caso de crianças entre 2 e 12 anos de idade, o DEET é permitido na concentração de 10%, limitando-se o uso diário a 3 aplicações ao dia, evitando o uso prolongado. Para pessoas com idade superior a 12 anos, são permitidas concentrações acima de 30%, desde que sejam realizados testes de avaliação de risco para humanos, levando em consideração a frequência de aplicação (ANVISA, 2013).

Os derivados de planta, extratos e óleos, são amplamente conhecidos pela sua diversidade química e pela sua variada aplicação na indústria. As plantas possuem uma rica fonte de bioativos químicos que podem ajudar no controle de pragas. O conhecimento popular sobre o uso e a eficácia das plantas contribui de forma relevante para a divulgação de suas propriedades, despertando o interesse de pesquisadores de diferentes áreas do conhecimento (BEZERRA et al, 2014).

No passado, antes da aplicação de inseticidas sintéticos como repelentes, as pessoas plantavam ou queimavam plantas aromáticas locais para se protegerem de mosquitos. Estas técnicas são usadas até hoje em muitas partes do mundo (MISNI; NOR; AHMAD, 2016).

Monoterpenos tais como α -pineno, cineol, eugenol, limoneno, terpinoleno, citronelol, citronel, cânfora e timol estão presentes como componentes majoritários de EOs de várias espécies de plantas já descritos na literatura como repelentes de mosquitos. Entre os sesquiterpenos, o β -cariofileno é altamente citado como um forte repelente contra *A. aegypti*. Embora as propriedades repelentes de vários EOs parecem estar associadas regularmente à presença de monoterpenos e sesquiterpenos (GOVINDARAJAN et al, 2016).

O óleo de citronela é o ingrediente ativo mais utilizado em formulações repelente. No entanto, consumidores não estão dispostos a utilizar repelentes que contenham este óleo devido ao seu odor forte e baixa eficácia contra os mosquitos.

Embora os óleos essenciais sejam relatados contra uma grande variedade de mosquitos, sua alta volatilidade e/ou biodegradabilidade resultou em uma eficácia a curto prazo se comparado às formulações contendo DEET como princípio ativo (MISNI; NOR; AHMAD, 2016).

3.7 Ciclodextrinas

Vários métodos são utilizados para melhorar o perfil de solubilidade de fármacos que possuem baixa biodisponibilidade, devido à baixa solubilidade em água e à uma lenta taxa de dissolução, dentre estes métodos, a complexação destes fármacos com ciclodextrinas são largamente utilizadas (BAL; SENGUPTA; MURTHY, 2013). A complexação de drogas com ciclodextrinas podem permitir aumento da biodisponibilidade do fármaco, aumento da sua solubilidade e estabilidade, assim como diminuem a sua toxicidade (SILVA et al, 2016).

As Ciclodextrinas (CDs) são uma família de oligossacarídeos cíclicos compostos por cadeias de subunidades de glucopirranose ligadas alfa 1,4, representando um dos mais simples compostos de encapsulação. As CDs mais comuns são α -ciclodextrina (α -CD), β -ciclodextrina (β -CD) e γ -ciclodextrina (γ -CD) compostos por 6, 7 e 8 unidades glicosiladas, respectivamente (**figura 3**) (CIOBANU; LANDY; FOURMENTIN, 2013). Dentre estas, a β -ciclodextrina é a mais utilizada devido a sua capacidade de hospedar a maioria das moléculas de interesse, que possuem massa molecular na faixa de 100 a 400g/mol, além do seu preço de custo ser mais razoável se comparado às outras ciclodextrinas (AGUIAR et al, 2014).

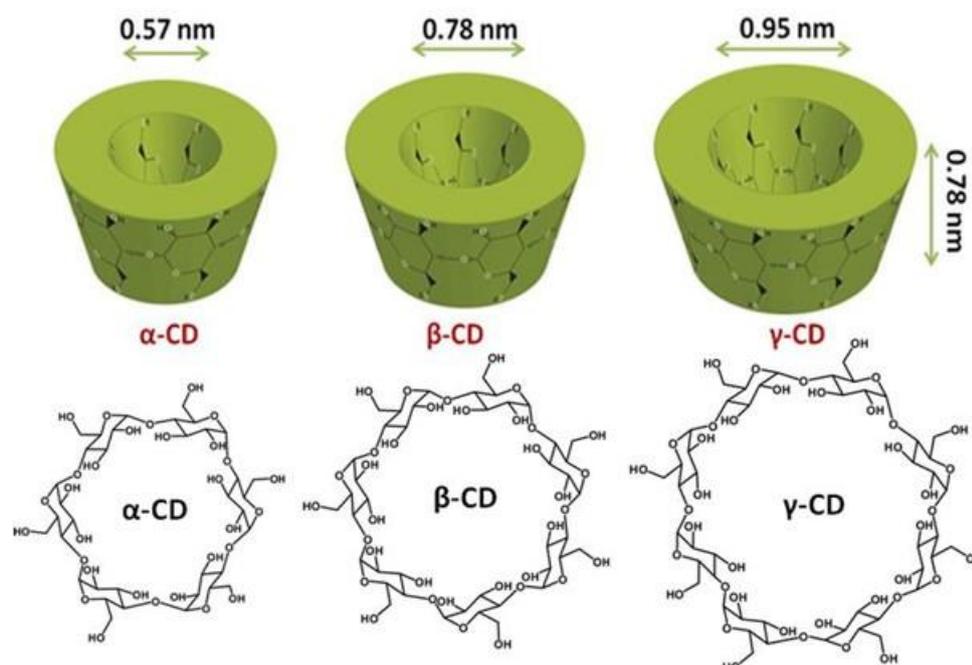
A estrutura molecular das CDs em forma de cesta com uma superfície exterior hidrofílica e uma cavidade interior hidrofóbica explica a sua propriedade de atuar com uma gaiola molecular para hóspedes hidrofóbicos (KFOURY et al, 2014).

Atualmente, as ciclodextrinas têm sido amplamente utilizadas por suas vantagens ao encapsular moléculas instáveis ou insolúveis em água. A encapsulação de OEs permite o aumento da sua solubilidade em água, melhora de sua estabilidade, protegendo-o assim de uma possível oxidação, evaporação ou degradação térmica (SEBAALY et al, 2016).

Kfoury et al (2014) formaram complexos de inclusão de β -ciclodextrina com monoterpenos, como eucaliptol, geraniol, limoneno, linalol, α -pineno, β -pineno, pulegona e timol, preparados de forma eficaz, sendo comprovado nos testes de

espectroscopia de fluorescência, espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e calorimetria diferencial de varredura (DSC). De acordo com os resultados a presença da função oxigenada, da estrutura monoterpeneo é um fator importante para encapsulação eficaz.

Figura 3: Propriedades e estrutura química de α -CD, β -CD e γ -CD.



Fonte: scientia1.files.wordpress.com.

Kellici et al (2016) realizou a caracterização do complexo de inclusão da quercetina, um representante dos flavonoides, com β -ciclodextrina e obteve resposta positiva na redução da proliferação de células cancerígenas T24 da bexiga humana, bem como foi observado o aumento da biodisponibilidade e da solubilidade da quercetina em água. Bal; Sengupta e Murthy (2013) comprovou que a formulação utilizando o complexo de inclusão de carvedilol com β -ciclodextrina incorporado em microcápsulas, foi eficaz no controle da hipertensão arterial por 24 horas em testes *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, U.N.; LIMA, S.G.; ROCHA, M.S.; FREITAS, R.M.; OLIVEIRA, T.M.; SILVA, R.M.; MOURA, L.C.B.; ALMEIDA, L.T.G. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com β -ciclodextrina. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p.50-55, 2014.
- ANDRADE, V.A.; ALMEIDA, A.C.; SOUZA, D.S.; COLEN, K.G.F.; MACÊDO, A.A.; MARTINS, E.R.; FONSECA, F.S.A.; SANTOS, R.L. Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia organoides*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.12, p.1153-1161, 2014.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 9, de 10 de Abril de 2013. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0019_10_04_2013.html>.
- ARAÚJO, H.R.C.; CARVALHO, D.O.; IOSHINO, R.S.; COSTA-DA-SILVA, A.L.; CAPURRO, M.L. *Aedes aegypti* Control Strategies in Brazil: Incorporation of New Technologies to Overcome the Persistence of Dengue Epidemics. **Insects**, v. 6, p. 576-594, 2015.
- ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; AÏT ADDI, E.H.; CASABIANCA, H.; MOUSADIK, A.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F.N.R.; ELAISSARI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.483, p.220–243, 2015.
- ATIF, M.; AZEEM, M.; SARWAR, M.R.; BASHIR, A. Zika virus disease: a current review of the literature. **Infection**, v. 44, p. 695–705, 2016.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446–475, 2008.
- BAL, T.; SENGUPTA, S.; MURTHY, P.N. Formulation and evaluation of carvedilol microcapsules using Eudragit NE30D and sodium alginate. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 4, 2013.
- BARRETO, H.M.; FONTINELE, F.C.; OLIVEIRA, A.P.; ARCANJO, D.D.R.; dos SANTOS, B.H.C.; ABREU, A.P.L.; COUTINHO, H.D.M.; SILVA, R.A.C.; SOUSA, T.O.; MEDEIROS, M.G.F.; CITÓ, A.M.G.L.; LOPES, J.A.D. Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity In Vitro by *Lippia organoides* H.B.K. in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **BioMed Research International**, 2014.
- BEZERRA, F.P.; AGUIAR, R.W.S.; CARVALHO, E.E.N.; BORGES, J.C.M.; VALE, B.N. *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) como novo bioinseticida: análise fitoquímica
- BILIA, A.R.; GUCCIONE, C.; ISACCHI, B.; RIGHESCHI, C.; FIRENZUOLI, F.; BERGONZI, M.C. Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Brasília, 2004. 45p.

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

CACHO, J.I.; CAMPILLO, N.; VINAS, P.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Evaluation of three headspace sorptive extraction coatings for the determination of volatile terpenes in honey using gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1399, p.18–24, 2015.

CAVALCANTE, K.R.L.J.; TAUIL, P.L. Características epidemiológicas da febre amarela no Brasil, 2000-2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.25, n.1, p.11-20, 2016.

CHANG, C.; ORTIZ, K.; ANSARI, A.; GERSHWIN, M. E. The Zika outbreak of the 21st century. **Journal of Autoimmunity**, v.68, p.1-13, 2016.

CHEDIAK, M.; PIMENTA, J.R, F.G., COELHO, G.E.; BRAGA, I.A.; LIMA, J.B.P.; CAVALCANTE, K.R.L.J.; SOUSA, L.C.; MELO-SANTOS, M.A.V.; MACORIS, M.L.G.; ARAÚJO, A.P.; AYRES, C.F.J.; ANDRIGHETTI, M.T.M.; GOMES, R.G.A.; CAMPOS, K.B.; GUEDES, R.N.C. Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.111, n.5, p.311-321, 2016.

CHIKHOUNE, A.; STOUVENEL, L.; IGUER-OUADA, M.; HAZZIT, M.; SCHMITT, A.; LORÈS, P.; WOLF, J.P.; AISSAT, K.; AUGER, J.; VAIMAN, D.; TOURÉ, A. In-vitro effects of *Thymus munbyanus* essential oil and thymol on human sperm motility and function. **Reproductive BioMedicine Online**, v.31, p.411–420, 2015.

CIOBANU, A.; LANDY, D; FOURMENTIN, S. Complexation efficiency of cyclodextrins for volatile flavor compounds. **Food Research International**, v.53, p.110–114, 2013.

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.

ESCOBAR, P.; LEAL, S.M.; HERRERA, L.V.; MARTINEZ, J.R.; STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major componentes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n.2, p.184-190, 2010.

GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M.; ARIVOLI, S.; TENNYSON, S.; BENELLI. Larvicidal and repellent potential of *Zingiber nimmonii* (J. Graham) Dalzell (Zingiberaceae) essential oil: an eco-friendly tool against malaria, dengue, and lymphatic filariasis mosquito vectors? **Parasitology Research**, v. 115, p. 1807–1816, 2016.

KELLICI, T.F.; CHATZIATHANASIADOU, M.V.; DIAMANTISA, D.; CHATZIKONSTANTINO, A.V.; ANDREADELIS, I.;B, CHRISTODOULOU, E.; VALSAMIC, G.; MAVROMOUSTAKOS, T.; TZAKOSA, A.G. The antiproliferative activity of the complex on T24 cancer cells using MTT assay has been also exploited. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, p. 303–311, 2016.

- KFOURY, M.; AUEZOVA, L.; FOURMENTIN, S.; GREIGE-GERGES, H. Investigation of monoterpenes complexation with hydroxypropyl- β -Cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.80, p.51–60, 2014.
- LIU, X.C.; LIU, Q.; CHEN, X.B.; ZHOUD, L.; LIU, Z.L. Larvicidal activity of the essential oil from *Tetradium glabrifolium* fruits and its constituents against *Aedes albopictus*. **Pest Management Science**, v.71, p.1582–1586, 2015.
- LIU, X.C.; LIU, Q.; ZHOU, L.; LIU, Z.L. Evaluation of larvicidal activity of the essential oil of *Allium macrostemon* Bunge and its selected major constituent compounds against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Parasites & Vectors**, v. 7, n.84, 2014.
- LLANA-RUIZ-CABELLO, M.; GUTIÉRREZ-PRAENA, D.; PUERTO, M.; PICHARDO, S.; JOS, A.; CAMEÁN, A.M. In vitro pro-oxidant/antioxidant role of carvacrol, thymol and their mixture in the intestinal Caco-2 cell line. **Toxicology in Vitro**, v.29, p.647–656, 2015.
- LOZON, Y; SULTAN, A; LANSDELL, S.J.; PRYTKOVA, T.; SADEK, B.; YANG, K.S.; HOWARTH, F.C.; MILLAR, N.S.; OZ, M. Inhibition of human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors by cyclic monoterpene carveol. **European Journal of Pharmacology**, v.776, p.44–51, 2016.
- MARCONDES, C.B.; XIMENES, M.F.F.M. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.49, n.1, p.4-10, 2016.
- MARQUES, A.M.; PROVANCE JUNIOR, D.W.; KAPLAN, M.A.C.; FIGUEIREDO, M.R. *Echinodorus grandiflorus*: Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological overview of a medicinal plant used in Brazil. **Food and Chemical Toxicology**, p.1-16, 2017.
- MARQUES, M.M.M.; MORAIS, S.M.; VIEIRA, I.G.P.; VIEIRA, M.G.S.; SILVA, A.R.A.; DE ALMEIDA, R.R.; GUEDES, M.I.F. Larvicidal Activity Of *Tagetes Erecta* Against *Aedes Aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.27, n.2, p.56–158, 2011.
- MISNI, N; NOR, Z.M.; AHMAD, R. New Candidates for Plant-Based Repellents against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.32, n.2, p.117–123, 2016.
- MOREIRA, M.P.; ANDRADE, G.R.S.; ARAUJO, M.V.G.; KUBOTA, T.; GIMENEZ, I.F. Ternary cyclodextrin polyurethanes containing phosphate groups: Synthesis and complexation of ciprofloxacin. **Carbohydrate Polymers**, v.151, p.557–564, 2016.
- MUÑOZ, J.A.V.; STASCHENKO, E.; OCAMPO, C.B.D. Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas nativas contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v.40, n.2, p.198-202, 2014.
- NARARAK, J.; SATHANTRIPHOP, S.; CHAUHAN, K.; TANTAKOM, S.; EIDEN, A.L.; CHAREONVIRIYAPHAP, T. Avoidance Behavior to Essential Oils by *Anopheles minimus*, a Malaria Vector in Thailand. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.32, n.1, p.34–43, 2016.
- NOVATO, T.P.L.; ARAÚJO, L.X.; MONTEIRO, C.M.O.; MATURANO, R.; SENRA, T.O.S.; MATOS, R.S.M.; GOMES, G.A.; CARVALHO, M.G.; DAEMON, E.

Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (E)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, v.212, p.331–335, 2015.

PAULA, J.S.de.; RESENDE, A.M.de.; MIALHE, F.L. Factors associated with the use of herbal medicines for oral problems by patients attending the clinics of the School of Dentistry, Federal University of Juiz de Fora, **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v.11, n.4, 2012.

PÉREZ-SÁNCHEZ, J.; BENEDITO-PALOS, L.; ITZIAR ESTENSORO, I.; PETROPOULOS, Y.; CALDUCH-GINER, J.A.; BROWDY, C.L.; SITJÀ-BOBADILLA, A. Effects of dietary NEXT ENHANCE®150 on growth performance and expression of immune and intestinal integrity related genes in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v.44, p.117-128, 2015.

preliminar e atividade larvívica contra *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae). **Revista Amazônia Science & Health**. v.2, n.3, p. 17-25, 2014.

RIBEIRO, R.V.; BIESKI, I.G.C.; BALOGUN, S.O.; MARTINS, D.T.O. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.205, p.69–102, 2017.

ROSA, C.S.; VERAS, K.S.; SILVA, P.R.; LOPES NETO, J.J.; CARDOSO, H.L.M.; ALVES, L.P.L.; BRITO, M.C.A.; AMARAL, F.M.M. ; MAIA, J.G.S.; MONTEIRO, O.S.; MORAES, D.F.C. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**. v.18, n.1, 2016.

ROY, M.N.; SAHA, S. Probing inclusion complexes of cyclodextrins with amino acids by physicochemical approach. **Carbohydrate Polymers**, v.151, p.458–466, 2016.

SARRAZIN, S.L.F.; SILVA, L.A.; ASSUNÇÃO, A.P.F.; OLIVEIRA, R.B.; CALAO, V.Y.P.; SILVA, R.; STASHENKO, E.E.; MAIA, J.G.S.; MOURÃO, R.H.V. Antimicrobial and Seasonal Evaluation of the Carvacrol-Chemotype Oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Molecules**, v.20, p.1860-1871, 2015.

SARRAZIN, S.L.F.; SILVA, L.A.; OLIVEIRA, R.B.; RAPOSO, J.D.A.; SILVA, J.K.R.; SALIMENA, F.R.G.; MAIA, J.G.S.; MOURÃO, R.H.V. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Lipids in Health and Disease**, v.14, p.145, 2015.

SEBAALYA, C; CHARCOSSET, C.; STAINMESSE, S.; FESSI, H.; GREIGE-GERGES, H. Clove essential oil-in-cyclodextrin-in-liposomes in the aqueous and lyophilized states: From laboratory to large scale using a membrane contactor. **Carbohydrate Polymers**, v.138, p.75–85, 2016.

SILVA, C.V.N.S.; BARBOSA, J.A.P.; FERRAZ, M.S.; SILVA, N.H.; HONDAD, N.K.; RABELLO, M.M.; HERNANDES, M.Z.; BEZERRA, B.P.; CAVALCANTI, I.M.F.; AYALA, A.P.; SANTOS, N.P.S.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Molecular modeling and cytotoxicity of diffractaic acid: HP-β-CD inclusion complex encapsulated in microspheres. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.92, p.494–503, 2016.

SILVA, G.C.; OLIVEIRA, L.M.; LUCCHESI, A.M.; SILVA, T.R.S.; NASCIMENTO, M.N. Propagação vegetativa e crescimento inicial de *Lippia origanoides* (alecrim-de-tabuleiro). **Horticultura brasileira**, v. 33, n. 2, 2015.

SILVA, M.G.N.M.; RODRIGUES, M.A.B.I; ARAUJO, R.E. Sistema de aquisição e processamento de imagens de ovitrampas para o combate a dengue. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v.28, n.4, 2012.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. Ed. Artmed. Porto Alegre-RS. 2017.

SOOSARAEIA, M.; FAKHARB, M.; TESHNIZIC, S.H.; HEZARJARIBIB, H.Z.; BANIMOSTAFAVID, E.A. Medicinal plants with promising antileishmanial activity in Iran: a systematic review and meta-analysis. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 21, p. 63-80, 2017.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**. v.18(3), p. 867-871, 2002.

TELES, S.; PEREIRA, J.A.P.; OLIVEIRA, L.M.; MALHEIRO, R.; LUCCHESCI, A.M.; SILVA, F. *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil production, composition, and antioxidant activity under organic and mineral fertilization: Effect of harvest moment. **Industrial Crops and Products**, v.60, p.217–225, 2014.

TOZIN, L.R.S; MARQUES, M.O.M.; RODRIGUES, T.M. Glandular trichome density and essential oil composition in leaves and inflorescences of *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) in the Brazilian Cerrado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.87, n.2, 2015.

TURINA, A.V.; NOLAN, M.V.; ZYGADLO, J.A.; PERILLO, M.A. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v.122, p.101–113, 2006.

VILLAS BOAS, G.K.; GADELHA, C.A.G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, no. 6, p. 1463-1471, 2007.

ZARA, A.L.S.A.; DOS SANTOS, S.M.; FERNANDES-OLIVEIRA, E.S.; CARVALHO, R.G.; COELHO, G.E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.25, n.2, p.391-404, 2016.

Capítulo I: Atividades inseticida e repelente de óleos essenciais contra mosquitos (Diptera: Culicidae): uma prospecção científica e tecnológica

**Atividades inseticida e repelente de óleos essenciais contra mosquitos (Diptera:
Culicidae): uma prospecção científica e tecnológica**

Resumo:

Doenças causadas por mosquitos são uma das maiores preocupações de saúde pública mundial, sendo estas agravadas com o uso exagerado de produtos químicos que atuam no combate destes. A busca por novas alternativas para atuar no combate à estes vetores têm despertado o interesse de pesquisadores para óleos essenciais de plantas que possuem diversas atividades farmacológicas já comprovadas. Esta prospecção científica e tecnológica tem como objetivo apresentar todo o potencial inseticida e repelente dos óleos essenciais de plantas contra mosquitos transmissores de doenças, para embasar o desenvolvimento de novos produtos naturais como alternativa aos produtos sintéticos empregados para tal finalidade. Foram realizadas buscas de artigos nos bancos de dados *Medical Literature and Retrival System on Line* (MEDLINE/PubMed®); Biblioteca Virtual em Saúde (BVS); Coleção Principal do Web of ScienceTM e Scopus (Elsevier). Para a busca de patentes foram realizadas buscas nas bases de dados de patentes do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), World Intellectual Property Organization (WIPO), no European Patent Office (EPO) e Patentes da América Latina e Espanha (LATIPAT). Foram encontrados 111 artigos e 11 patentes que foram classificados de acordo com a base de dados em que o estudo foi encontrado, o ano no qual foi publicado, a atividade testada e a espécie de mosquito estudados. Pode-se concluir que há um número de estudos publicados, mas um número limitado de patentes, demonstrando ser uma área promissora para o desenvolvimento de novos produtos inseticidas e repelentes de origem natural.

Palavras-Chave: plantas medicinais, óleos essenciais, inseticidas, repelentes.

**Insecticide and repellent activities of essential oils against mosquitos (Diptera:
Culicidae): a scientific and technological prospect**

Abstract:

Diseases caused by mosquitoes are one of the world's biggest public health concerns, and these are exacerbated by the overuse of chemicals that fight against mosquitoes. The search for new alternatives to act in the fight against these vectors has aroused the interest of researchers for essential oils of plants that have several pharmacological activities already proven. This scientific and technological prospect aims to present all the insecticidal and repellent potential of plant essential oils against diseases transmitting mosquitoes, to support the development of new natural products as an alternative to the synthetic products used for this purpose. We searched the Medical Literature and Retrieval System on Line databases (MEDLINE / PubMed®); Virtual Health Library (VHL); Main Collection of the Web of Science™ and Scopus (Elsevier). To search for patents, searches were carried out in the patent databases of the National Institute of Industrial Property (INPI), World Intellectual Property Organization (WIPO), European Patent Office (EPO) and Latin American and Spanish Patent (LATIPAT). We found 111 articles and 11 patents that were classified according to the database in which the study was found, the year in which it was published, the activity and species of mosquito studied. It can be concluded that there are a number of published studies, but a limited number of patents, proving to be a promising area for the development of new insecticides and natural repellents.

Keywords: Medicinal plants, essential oil, insecticidal, repellents.

1 INTRODUÇÃO

Mosquitos (Diptera: Culicidae) transmissores de doenças têm se tornado uma grande preocupação de saúde pública mundial a cada ano. Além de transmitirem várias doenças como a malária, filariose, encefalite japonesa, dengue, chikungunya e febre amarela, estes vetores afetam a saúde e a qualidade de vida de milhões de pessoas em países de clima tropical e subtropical (DUA et al, 2013). Estas doenças podem ocorrer devido ao crescimento desordenado dos grandes centros urbanos, à globalização de viagens e comércio, bem como as alterações climáticas e ambientais que têm favorecido a propagação destas doenças, principais causas de morbidade e mortalidade em seres humanos nos últimos anos (CHEDIAK et al, 2016; ARAÚJO et al, 2015).

Em 2016, foram relatados mais de 1 milhão de casos de doenças transmitidas por vetores, representando 17% de todas as doenças infecciosas. A Região das Américas relatou mais de 2,38 milhões de casos de dengue em 2016, destes foram relatados no Brasil aproximadamente 1,5 milhão de casos, caracterizando um dos maiores surtos mundiais da doença. A malária, transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles*, causa mais de 400.000 mortes por ano em todo o mundo, a maioria crianças com menos de 5 anos de idade. (WHO, 2016)

Atualmente, no combate a estes vetores, são utilizados inseticidas químicos sintéticos, como organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretroides, que representam uma forma efetiva de controle de insetos (BARBOSA et al, 2014; GOVINDARAJAN et al, 2016). O composto DEET (N, N-dietil-3-metilbenzamida) é o repelente de insetos mais utilizado no mercado, entretanto, foram registrados casos em que altos níveis de exposição ao DEET causaram neurotoxicidade, dermatite e reações alérgicas em pacientes (TABANCA et al, 2013).

Apesar de se mostrarem efetivos, foram relatados casos de resistência fisiológica dos mosquitos a esses compostos devido ao seu uso indiscriminado, além de possuírem efeitos tóxicos a seres humanos e ao meio ambiente (GOVINDARAJAN et al, 2016; BESERRA et al, 2014). Produtos inseticidas e repelentes de origem natural estão sendo largamente estudados como alternativa aos produtos sintéticos por serem considerados mais específicos, biodegradáveis e por não possuírem toxicidade aos organismos não-alvo (SOONWERA, 2015). Estudos demonstraram que tem crescido o interesse na

descoberta de novas plantas com atividade inseticida e repelente que se reflete em pelo menos 44 famílias de plantas com estas atividades comprovadas (VERA et al, 2014).

Medicina tradicional, baseada em plantas para amenizar sintomas, prevenir ou curar doenças, tem sido utilizada desde os primórdios em todo o mundo (CHIKHOUNE et al, 2015). No Brasil, devido à sua rica biodiversidade, a OMS estima que 90% da população tenha feito uso de plantas para fins terapêuticos (ROSA et al, 2016). Mais recentemente, o interesse por óleos essenciais de plantas para fins terapêuticos tem crescido (CHIKHOUNE et al, 2015). EUA, China e Brasil são os principais países produtores de óleo essencial, representando 24%, 20% e 8% da produção em volume, respectivamente. O Brasil é famoso por sua diversidade florística; conseqüentemente sua flora deve ser considerada um reservatório importante de moléculas ativas com potenciais aplicações industriais. As espécies de plantas de várias famílias botânicas têm sido descritas pelo seu conteúdo de óleo essencial e por suas atividades biológicas e farmacológicas (PÉREZ-SANCHEZ et al, 2015).

Óleos essenciais (OEs) são compostos voláteis, produtos do metabolismo secundário de plantas, compostos principalmente por terpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (ROSA et al 2016). Atualmente, são conhecidos cerca de 3000 OEs, entretanto, apenas 10% deles têm importância para a indústria farmacêutica, agrônômica, alimentar, sanitária, cosmética e perfumaria (BILIA et al, 2014) Estudos demonstraram que além das atividades inseticidas e repelentes, os OEs possuem atividades bactericida, antiviral e fungicida, antioxidante e antiparasitária (MAJOLO et al, 2016; ASBAHANI et al, 2015; SARRAZIN et al, 2015).

O presente trabalho tem como objetivo realizar uma prospecção científica e tecnológica referente às atividades inseticida e repelente dos óleos essenciais de plantas contra mosquitos transmissores de doenças, visando incentivar estudos para comprovar todo o potencial inseticida dos óleos essenciais, bem como incentivar o desenvolvimento de novos produtos naturais como alternativa no combate a vetores transmissores de doenças.

2 METODOLOGIA

2.1 Prospecção científica

A prospecção científica foi realizada mediante a busca de artigos nas bases de dados selecionadas: *Medical Literature and Retrivial System on Line* (MEDLINE/PubMed®); Biblioteca Virtual em Saúde (BVS); Coleção Principal do Web of Science™ e Scopus (Elsevier). O período de acesso às bases de dados foi em maio de 2017, não havendo restrição em relação ao período temporal de realização dos estudos alvo da revisão.

Para construção da questão de pesquisa e elaboração da estratégia de busca, utilizou-se a metodologia Problema, Intervenção, Contexto (PICO) para pesquisas não clínicas, delimitando-se como questão norteadora: “Há evidências de que óleos essenciais de plantas possuem atividade inseticida e repelente contra insetos pertencentes à família Culicidae?”. Os termos de busca selecionados estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 - Distribuição dos termos de busca utilizados

| Problema (P): Insetos pertencentes à família Culicidae | Intervenção (I): Óleos essenciais de plantas | Contexto (Co): atividade inseticida e repelente |
|---|---|--|
| Culicidae | Oil, Volatile | Insecticides |
| Mosquitoes | Essential Oils | Insect Repellents |
| | Volatile Oils | Insecticidal Activity |
| | Plants, Medicinal | Ovicidal Activity |
| | Medicinal Plants | Larvicidal Activity |
| | Medicinal Herbs | Repellent Activity |
| | Pharmaceutical Plants | |
| | Healing Plants | |

Fonte: Autoria Própria.

Para a busca específica nas bases de dados foram utilizadas combinações entre descritores (para localização de artigos indexados) e palavras-chave referentes a tais descritores (para recuperação de artigos em processo de indexação) em inglês, por meio dos operadores booleanos “AND” e “OR”.

Foram utilizados como critérios de inclusão: a) texto completo disponível; b) presença da aplicabilidade de óleos essenciais de plantas com atividade inseticida e/ou repelente; c) publicações nos idiomas português, inglês ou espanhol. Foram excluídos da pesquisa capítulos de livros, editoriais, patentes, artigos duplicados em outras bases de dados, bem como aqueles que não tratassem do tema a partir da leitura do título e resumo.

Posteriormente à seleção dos artigos nas bases de dados, foi realizada a leitura do texto completo dos artigos que não foram excluídos na primeira fase. A seleção dos artigos foi realizada por três autores e revisada para garantir os critérios de elegibilidade. A organização dos resultados obtidos foi realizada através do software de gerenciamento de referências Mendeley.

2.2 Prospecção tecnológica

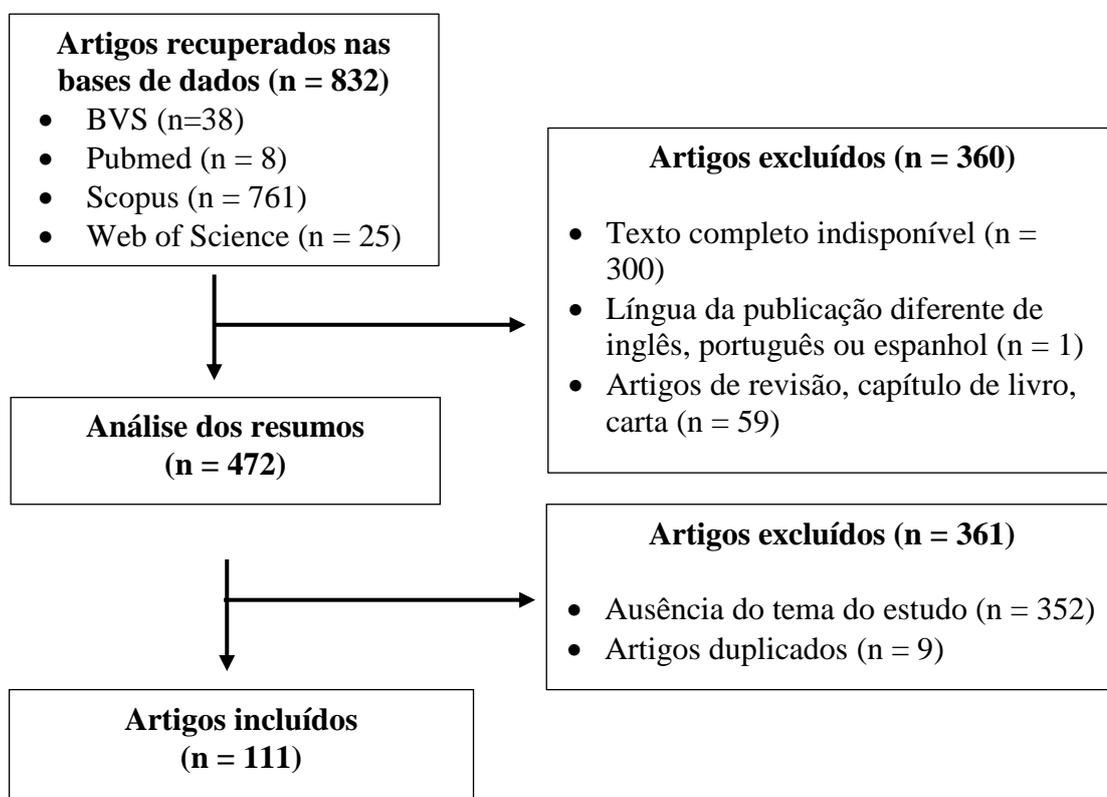
A prospecção tecnológica designa atividades de prospecção centradas nas mudanças tecnológicas, nas mudanças funcionais e no significado de inovação. Constitui uma ferramenta básica para orientar o desenvolvimento de novas tecnologias (AMPARO; RIBEIRO; GUARIEIRO, 2012).

Foram realizadas buscas nas bases de dados de patentes do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), World Intellectual Property Organization (WIPO), European Patent Office (EPO) e Patentes da América Latina e Espanha (LATIPAT). Como palavras-chave foram utilizados os termos “óleo essencial”, “inseticida” e “repelente”, “essential oil”, “insecticidal”, “repellent”, no título e/ou resumo, bem como foi utilizado o operador booleano “AND”. Foram incluídas neste estudo patentes independente do tempo transcorrido desde o depósito, considerando todos os pedidos de patente depositados até o presente momento.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados 832 artigos por meio da busca com os descritores e palavras-chave selecionados, dos quais 472 artigos foram incluídos por atenderem aos critérios de inclusão. Destes, foram selecionados para a revisão 111 artigos. Os passos detalhados desta pesquisa estão apresentados na Figura 1.

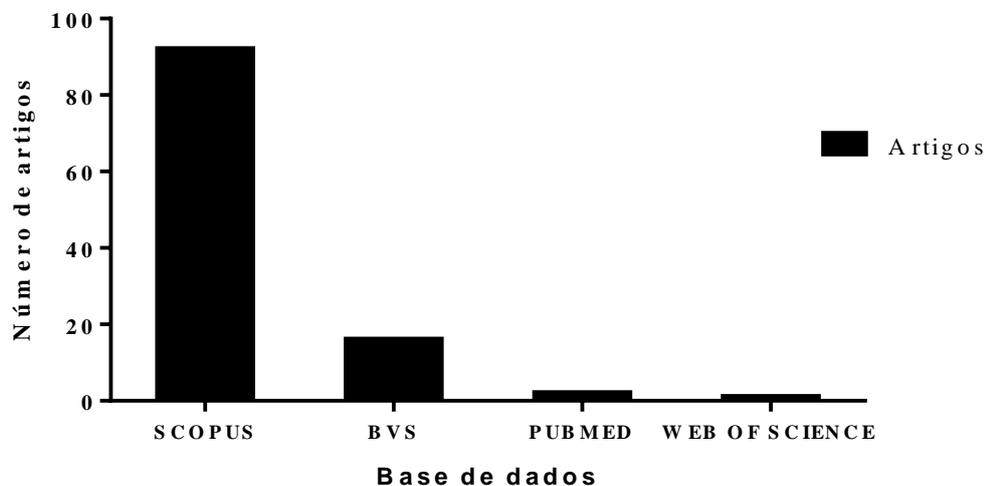
Figura 1 - Fluxograma de seleção dos estudos primários da prospecção científica.



Fonte: Autoria Própria.

De acordo com critérios, de inclusão e exclusão, foram selecionados 92 artigos da coleção virtual Scopus (Elsevier); 16 artigos da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS); 2 artigos do *Medical Literature and Retrieval System on Line* (MEDLINE/PubMed®) e 1 artigo da coleção virtual principal Web of Science, como demonstrado na **Figura 2**.

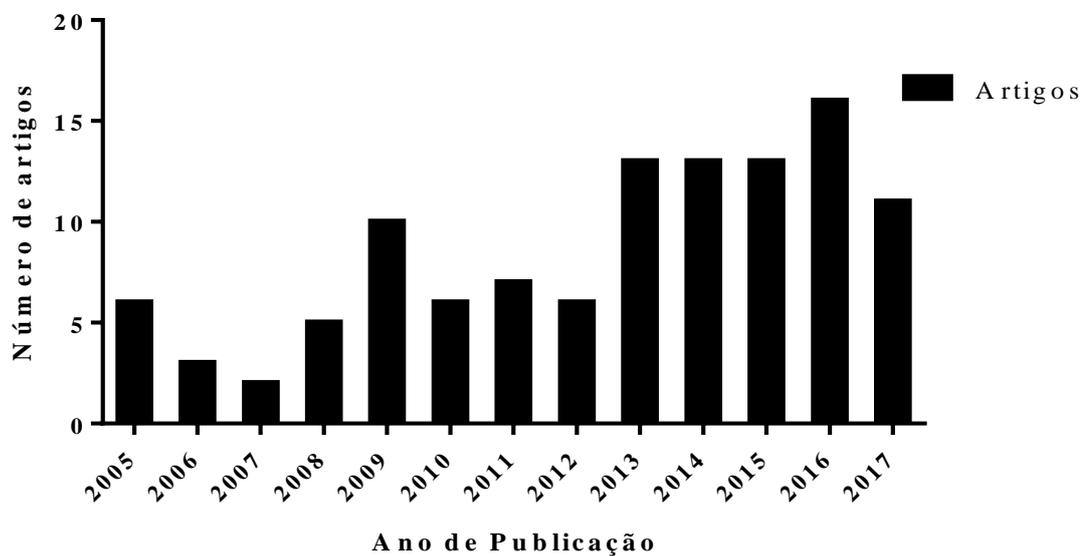
Figura 2: Distribuição dos artigos em suas respectivas bases de dados.



Fonte: Autoria Própria.

Quando foi considerado a distribuição de artigos por ano de publicação dos artigos, **figura 3**, pode-se notar que houve um aumento gradual a partir do ano de 2010, evidenciando um direcionamento de pesquisadores em buscas de novas entidades químicas e produtos alternativos nas fontes naturais vegetais, para atuarem no combate a mosquitos. A literatura mostra uma tendência progressivamente crescente na busca de novas plantas com atividade inseticida, o que se reflete em pelo menos 44 famílias de plantas com atividade inseticida confirmadas, incluindo ações sobre o vírus da dengue (VERA et al, 2014).

Figura 3: Distribuição dos artigos segundo o ano de publicação.

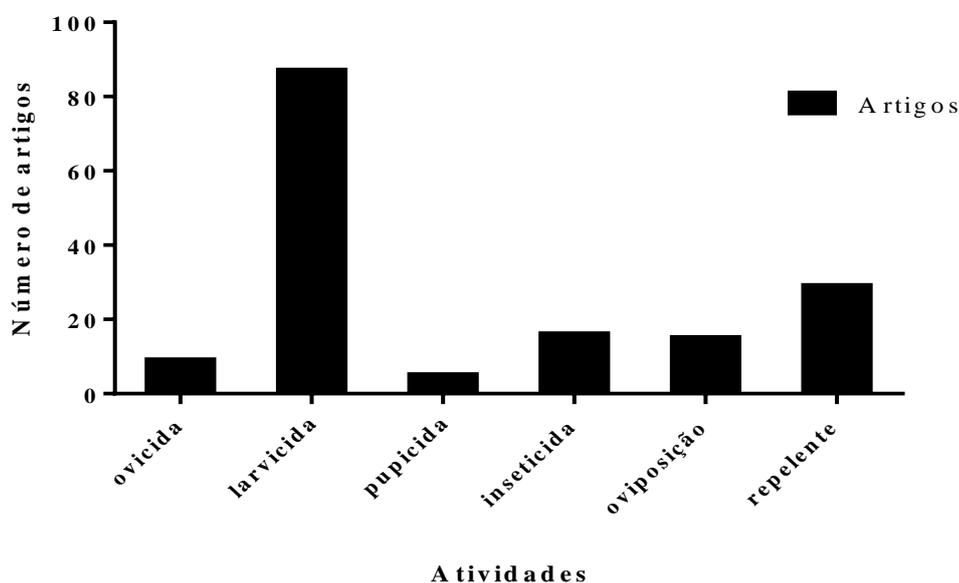


Fonte: Autoria Própria.

O combate a mosquitos transmissores de doenças, é um grande desafio de Saúde Pública em todo o mundo, como pode ser visto nos recentes surtos de Dengue, Chikungunya e Zika, destacando a importância do controle a estes insetos, principalmente em países com clima tropical e subtropical (BENELLI et al, 2017). Por ainda não existir vacinas para arboviroses como a dengue, o uso de larvicidas e repelentes continua sendo a maneira mais efetiva de se controlar estas doenças (MARQUES et al, 2011).

A **Figura 4** mostra a distribuição das atividades biológicas relacionadas a ovicida, larvicida, pupicida, inseticida, oviposição e repelente atribuídas aos óleos essenciais. Dos 111 artigos selecionados pela estratégia de busca, 87 estudos realizaram testes larvicidas, 29 testes para atividade repelente, 16 para atividade inseticida, 15 para atividade de oviposição, 9 para atividade ovicida e apenas 5 testaram a atividade pupicida.

Figura 4: Distribuição das atividades testadas nos artigos selecionados.



. Fonte: Autoria Própria.

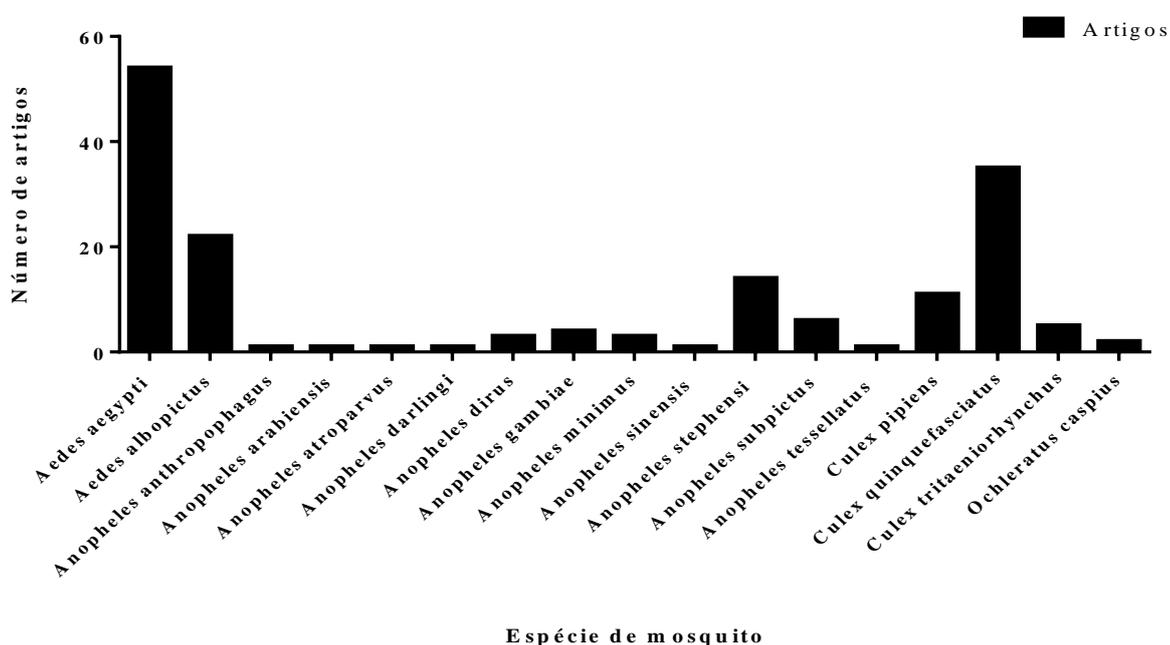
A maioria dos programas de controle destes vetores têm como alvo o combate aos estágios mais jovens dos mosquitos, como ovos, larvas e pupas, visto que o foco em matar o inseto adulto reduz temporariamente a população e pode acarretar em maiores custos operacionais (TABARI et al, 2017).

Por definição, repelente é o produto de origem química ou natural com capacidade de repelir mosquitos e outros artrópodes. O DEET é o agente químico mais amplamente utilizado em formulações repelentes, entretanto sua toxicidade ao ser humano após sua aplicação pode variar de reações leves à graves (RAMIREZ et al, 2012; LALTHAZUALI & MATHEW, 2017). O uso contínuo e extensivo de inseticidas sintéticos para o controle de mosquitos levou a diversos problemas como desenvolvimento de resistência genética em mosquitos e poluição ambiental (DUA et al, 2013).

A **figura 5** mostra as diferentes espécies de mosquitos encontradas nos artigos. A espécie *Aedes aegypti* foi alvo de pesquisa em 54 artigos que testaram atividades dos óleos essenciais. As demais espécies como *Culex quinquefasciatus* testado em 35 trabalhos publicados, *Aedes albopictus* citado em 22 artigos, *Anopheles stephensi* em

14 artigos, *Culex pipiens* em 11 artigos, *Anopheles subpictus* em 6 artigos, *Culex tritaeniorhynchus* em 5 artigos, *Anopheles gambiae* em 4 artigos, *Anopheles dirus* e *Anopheles minimus*, ambos em 3 artigos, *Ochleratus caspius* em 2 artigos e *Anopheles anthropophagus*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles atroparvus*, *Anopheles darlingi*, *Anopheles sinensis*, *Anopheles tessellatus* com 1 artigo cada.

Figura 5: Distribuição das espécies de mosquitos testadas nos artigos selecionados.



Fonte: A autoria Própria.

Os mosquitos dos gêneros *Aedes sp.*, *Anopheles sp.* e *Culex sp.* (Diptera: Culicidae) são os mais importantes vetores transmissores de doenças em nível mundial. Zhao e colaboradores (2017) realizaram um estudo para avaliar o potencial larvicida das raízes de *Echinops grijsii* contra *Aedes albopictus* Skuse (*Stegomyia albopictus*), *Anopheles sinensis* Wiedemann e *Culex pipiens pallens* Coquillett e demonstraram que este óleo essencial possuía mais toxicidade às larvas de *A. albopictus* e *C. pipiens* do que a rotenona utilizada como controle positivo.

Para alcançar medidas mais efetivas de controle destas doenças e evitar os efeitos negativos decorrentes de inseticidas químicos, pesquisadores tem intensificado o desenvolvimento de repelentes naturais a partir de plantas com o intuito de diminuir estes efeitos (LALTHAZUALI & MATHEW, 2017). Estes produtos devem ser efetivos,

ecologicamente sustentáveis, econômicos e apresentarem baixa toxicidade ao homem (OLIVEIRA et al, 2013).

Nesse intuito, os óleos essenciais apresentam-se como uma alternativa no combate aos vetores destas doenças. Os óleos de eucalipto, citronela, tomilho, cravo e hortelã são largamente utilizados como ativos de produtos repelentes de insetos. Estudos também demonstraram que o Azadiractina, anabasina, quassia, nicotina, piretrinas, D-limoneno e carvacrol eram utilizados como inseticidas naturais antes da utilização de produtos sintéticos (KOC; OZ; CETIN, 2012; REHMAN; ALI; KHAN, 2014).

Segundo a Organização Internacional de Padronização, OEs são produtos voláteis extraídos de plantas por destilação a vapor, na maioria dos casos. São misturas complexas, voláteis, lipofílicas, líquidas e odoríferas e possuem um papel importante na defesa contra microorganismos e predadores e na atração de insetos (RAMOS et al, 2017). com sua composição composta majoritariamente de terpenos e fenilpropanoides que já tiveram suas funções contra insetos comprovadas (GOVINDARAJAN; RAJESWARY; BENELLI, 2016).

A maioria dos trabalhos que avaliou a atividade larvicida de OEs, testou apenas OEs isolados e apenas um número limitado focou na toxicidade de seus constituintes marjoritários, bem como em seus possíveis efeitos sinérgicos ou antagônicos (TABARI et al, 2017).

Em um estudo realizado por Lalthazuali & Mathew (2017), que buscou avaliar o potencial repelente dos óleos essenciais de *Ocimum sanctum*, *Mentha piperita*, *Eucalyptus globulus* e *Plectranthus amboinicus* contra *Aedes aegypti* mostrou que o óleo essencial de *O. sanctum*, *M. piperita*, *E. globulus* e *P. amboinicus* na concentração de 20% tiveram resultados comparáveis ao DEET na mesma concentração.

Benelli e colaboradores (2017) avaliaram a eficácia do óleo essencial de *Pinus nigra*, *Hyssopus officinalis*, *Satureja montana*, *Aloysia citrodora* e *Pelargonium graveolens* contra larvas de *Culex quinquefasciatus*, onde o óleo essencial de *S. montana* apresentou a maior mortalidade em larvas de *C. quinquefasciatus*, que pode

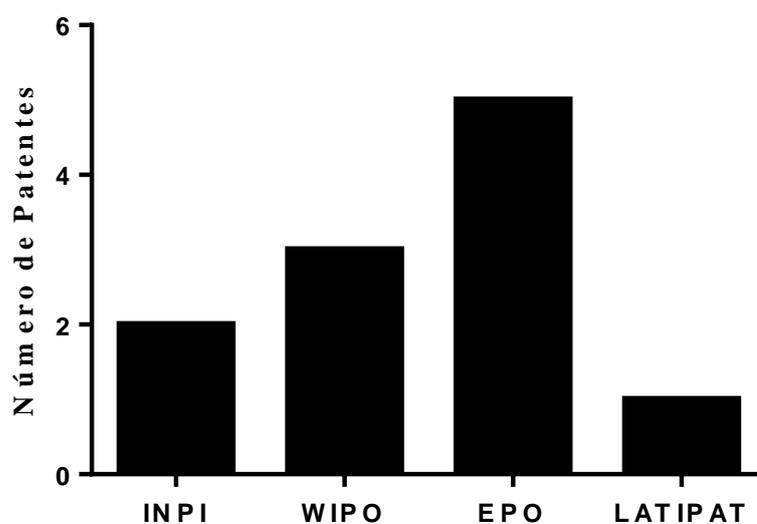
ser devido à presença de compostos fenólicos como timol (18,8%) e carvacrol (22,4%) e seus precursores p-cimeno (18,9%) e γ -terpineno (8,9%). Corroborando com trabalho de Leyva e colaboradores (2008), no qual atribui a ação inseticida dos óleos essenciais aos compostos D-limoneno, α -terpinol, β -mirceno, linolool, 1,8-cineol, 4-terpineol e timol, assim como atividade larvicida ao carvacrol.

b) Prospecção tecnológica

De acordo com critérios, adotados para prospecção tecnológica, foram encontradas 11 patentes utilizando as palavras-chave “óleo essencial”, “inseticida” e “repelente”, em português e inglês como demonstrado no quadro 2. A base de patentes que apresentou um maior número de patentes foi na *European Patent Office*, obtendo-se 5 patentes, que pode ser explicado pelo fato desta base conter dados patentários de mais de 90 países.

Também foram encontrados 3 na base de patentes WIPO, 2 documentos na base do INPI, seguido por 1 patente na LATIPAT.

Figura 6 - Total de patentes pesquisadas nas bases de dados INPI, WIPO, USPTO, EPO e LATIPAT.



Fonte: Autoria Própria.

O quadro 2 apresenta as principais informações das patentes analisadas no presente estudo. Estão apresentados o título da patente, ano de sua publicação, país de origem e a sua especificação na Classificação Internacional de Patentes (CIP).

Quadro 2 - Principais características das patentes analisadas.

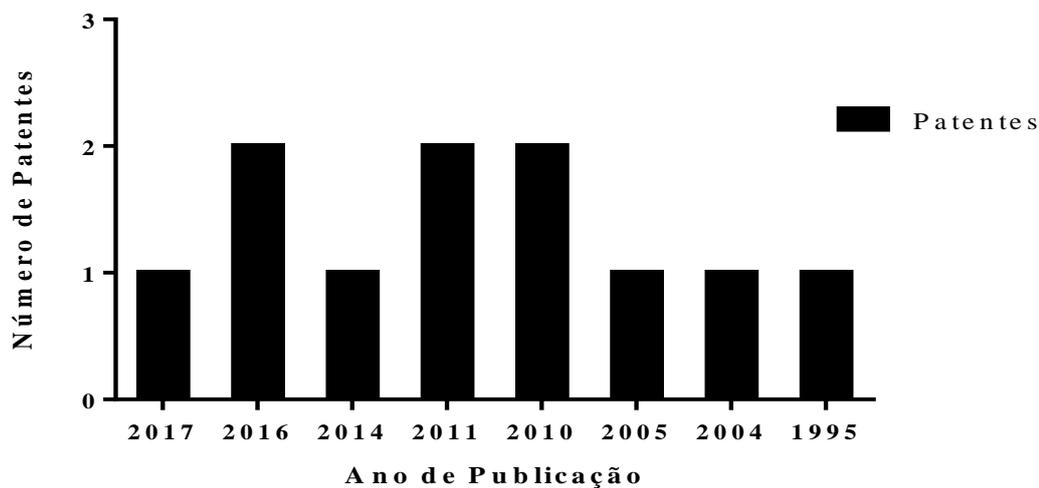
| Título | Ano | País | CIP |
|---|------------|-------------|------------|
| Pest control formulation, method for producing the same, and use | 2017 | Japão | A01N |
| Uso do Óleo Essencial de <i>Siparuma guianensis</i> Aublet (Negramina) em formulações com fins inseticidas e repelentes. | 2016 | Brasil | A01N |
| Sterilization mosquito-repellent incense. | 2016 | China | A01N |
| Pest control formulation, method for producing the same, and use | 2014 | Japão | A01N |
| Insecticide and/or repellent method | 2011 | França | A01N |
| Insecticide, insect repellent, ovicide, larvicide, nymphicide composition, useful to destruct flying and crawling insects, their eggs, larvae, and nymphs, comprises essential oil, proteolytic enzyme, and amphoteric surfactant | 2011 | França | A01N |
| Formulaciones que contienen aceites esenciales microencapsulados. | 2010 | Espanha | A01N |
| Absorption article with anti-mosquito agent and preparation method thereof | 2010 | China | A01N |
| Repellentien zum Schutz gegen Insekten | 2005 | Alemanha | A61K |
| Processo para preparação da vela do óleo de <i>Piper aduncum</i> e processo para uso do óleo de <i>Piper aduncum</i> como agente repelente no combate de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> e <i>Anopheles spp.</i> | 2004 | Brasil | C11B |
| Natural plant insect killing protecting agente | 1995 | China | A01N |

Fonte: Autoria Própria.

De acordo com a destruição em relação ao ano de publicação das patentes, podemos observar que foram publicadas apenas duas patentes no ano de 2016, 2011 e 2010 (18,2%) cada, seguido pelos anos de 2017, 2014, 2005, 2004 e 1995 (9,1%) com 1 publicação cada (**Figura 6**). Este resultado denota um despertar, ainda que sem tanta expressividade, por parte dos pesquisadores acerca do desenvolvimento de produtos que

utilizam óleos essenciais para fins inseticidas e repelentes, necessitando dar continuidade aos estudos já publicados.

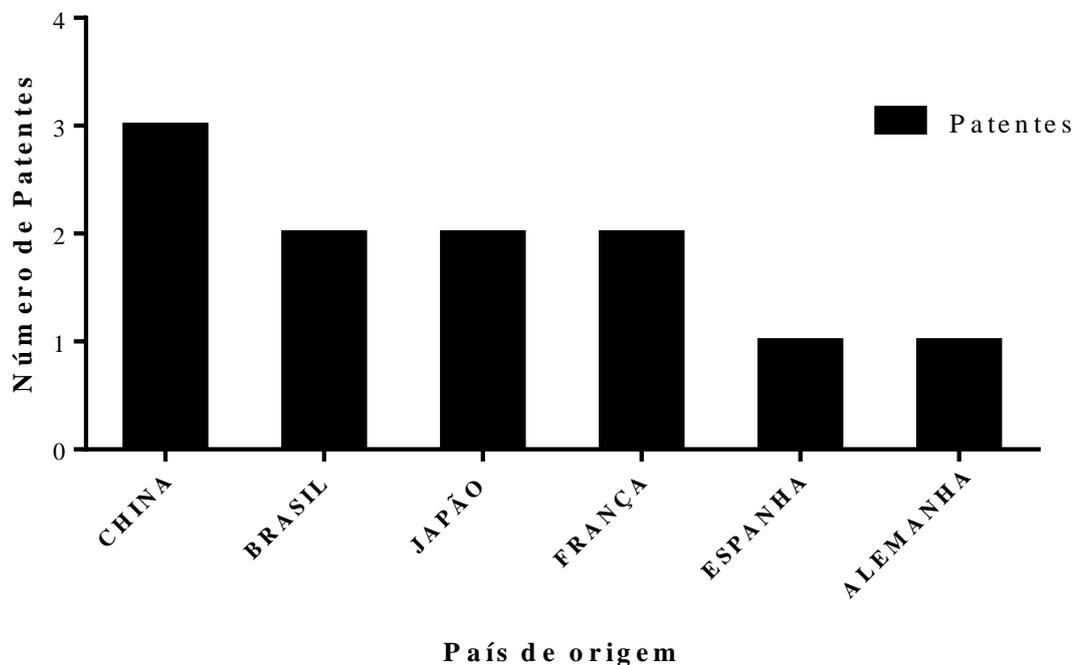
Figura 7 - Número de patentes de acordo com o ano de publicação.



Fonte: Autoria Própria.

Segundo o país de origem das patentes publicadas, podemos inferir que a China foi a detentora de 3 patentes encontradas (27,3%), seguida pelo Brasil, Japão e França com 2 patentes publicadas (18,2%) cada e pela Espanha e Alemanha com 1 patente (9,1%) cada (**figura 7**).

Figura 8 - Número de patentes publicadas segundo o país de origem.



Fonte: Autoria Própria.

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (CIP), a maioria das patentes encontradas estão inseridas na subclasse A01N (81,9%), que corresponde conservação de organismos de humanos, animais ou plantas e suas partes; biocidas, bem como desinfetantes, pesticidas e herbicidas para fins médicos, dentários ou sanitários. Foi encontrada 1 patente inseridas na subclasse C11B (9,1%), que se refere à produção de gorduras ou óleos graxos a partir de matérias- primas por extração, assim como 1 patente inserida na subclasse A61K (9,1%), que se refere à preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas.

4 CONCLUSÃO

Os estudos demonstram a importância dos óleos essenciais de plantas. As potenciais atividades inseticidas e repelentes contra mosquitos vetores de doenças foram encontradas distribuídas em diversas famílias. Os óleos essenciais representam uma importante ferramenta para o controle de vetores, que representam grandes problemas de saúde pública mundial. Foi evidenciada uma escassez de patentes que tratam deste assunto, demonstrando que os pesquisadores não estão protegendo as suas pesquisas e

também fica evidente a necessidade de investimento para prosseguimento dos estudos, com pesquisas preliminares já realizadas. Foram encontradas apenas 11 patentes com atividades inseticidas e repelentes e nenhum com a espécie de *Lippia origanoides* H.B.K.

REFERÊNCIAS

- AMPARO, K.K.S.; RIBEIRO, M.C.O.; GUARIEIRO, L.L.N. Estudo de caso utilizando mapeamento de prospecção tecnológica como principal ferramenta de busca científica. **Perspectivas em Ciência da Informação**, v.17, n.4, p.195-209, 2012.
- ARAÚJO, H.R.C.; CARVALHO, D.O.; IOSHINO, R.S.; COSTA-DA-SILVA, A.L.; CAPURRO, M.L. *Aedes aegypti* Control Strategies in Brazil: Incorporation of New Technologies to Overcome the Persistence of Dengue Epidemics. **Insects**, v. 6, p. 576-594, 2015.
- ASBAHANI, A.E.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; AÏT ADDI, E.H.; CASABIANCA, H.; MOUSADIK, A.E.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F.N.R.; ELAISSARI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.483, p. 220–243, 2015.
- BARBOSA, P.B.B.M.; DE OLIVEIRA, J.M.; CHAGAS, J.M.; RABELO, L.M.A.; DE MEDEIROS, G.F.; GIODANI, R.B.; DA SILVA E.A.; UCHÔA, A.F.; XIMENES, M.F.F.M. Evaluation of seed extracts from plants found in the Caatinga biome for the control of *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, v.113, p.3565–3580, 2014.
- BENELLI, G.; PAVELA, R.; CANALE, A.; CIANFAGLIONE, K.; CIASCETTI, G.; CONTI, F.; NICOLETTI, M.; SENTHIL-NATHAN, S.; MEHLHORN, H.; MAGGI, F. Acute larvicidal toxicity of five essential oils (*Pinus nigra*, *Hyssopus officinalis*, *Satureja montana*, *Aloysia citrodora* and *Pelargonium graveolens*) against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus*: Synergistic and antagonistic effects. **Parasitology International**, v.66, p.166–171, 2017.
- BESERRA, F.P.; AGUIAR, R.W.S.; CARVALHO, E.E.N.; BORGES, J.C.M.; VALE, B.N. *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) como novo bioinseticida: análise fitoquímica preliminar e atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Amazônia Science & Health**, v.2, n.3, p.17-25, 2014.
- BILIA, A.R.; GUCCIONE, C.; ISACCHI, B.; RIGHESCHI, C.; FIRENZUOLI, F.; BERGONZI, M.C. Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014.
- CHEDIAK, M.; PIMENTA JR, F.G., COELHO, G.E.; BRAGA, I.A.; LIMA, J.B.P.; CAVALCANTE, K.R.L.J.; SOUSA, L.C.; MELO-SANTOS, M.A.V.; MACORIS, M.L.G.; ARAÚJO, A.P.; AYRES, C.F.J.; ANDRIGHETTI, M.T.M.; GOMES, R.G.A.; CAMPOS, K.B.; GUEDES, R.N.C. Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.111, n.5, p.311-321, 2016.

CHIKHOUNE, A.; STOUVENEL, L.; IGUER-OUADA, M.; HAZZIT, M.; SCHMITT, A.; LORÈS, P.; WOLF, J.P.; AISSAT, K.; AUGER, J.; VAIMAN, D.; TOURÉ, A. In-vitro effects of *Thymus munbyanus* essential oil and thymol on human sperm motility and function. **BioMedicine Online**, v.31, p.411–420, 2015.

DUA, V.K.; KUMAR, A.; PANDEY, A.C.; KUMAR, S. Insecticidal and genotoxic activity of *Psoralea corylifolia* Linn. (Fabaceae) against *Culex quinquefasciatus* Say, 1823. **Parasites & Vectors**, v.6, n.30, 2013

GOVINDARAJAN, M.; KADAIKUNNAN, S.; ALHARBI, N.S.; BENELLI, G. Acute toxicity and repellent activity of the *Origanum scabrum* Boiss. & Heldr. (Lamiaceae) essential oil against four mosquito vectors of public health importance and its biosafety on non-target aquatic organisms. **Environmental Science and Pollution Research**, v.23, p. 23228–23238, 2016.

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

KOC, S.; OZ, E.; CETIN, H. Repellent activities of some Labiatae plant essential oils against the saltmarsh mosquito *Ochlerotatus caspius* (Pallas, 1771) (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 110, p. 2205–2209, 2012.

LALTHAZUALI & MATHEW, N. Mosquito repellent activity of volatile oils from selected aromatic plants. **Parasitology Research**, v.116, p. 821–825, 2017.

LEYVA, M.; TACORONTE, J.E.; MARQUETTI, M.C.; SCULL, R.; MONTADA, D.; RODRÍGUEZ, Y.; BRUZÓN, R.Y. Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas en larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v.60, n.1, p. 78-82, 2008.

MAJOLO, C.; DA ROCHA, S.I.B.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M.; BIZZO, H.R. Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, p.1–8, 2016.

MARQUES, M.M.M.; MORAIS, S.M.; VIEIRA, I.G.P.; VIEIRA, M.G.S.; SILVA, A.R.A.; ALMEIDA, R.R.de; GUEDES, A.M.I.F. Larvicidal activity of *Tagetes erecta* against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 27, n. 2, p. 156–158, 2011.

OLIVEIRA, G.L.; CARDOSO, S.K.; LARA JÚNIOR, C.R.; VIEIRA, T.M.; GUIMARÃES, E.F.; FIGUEIREDO, L.S.; MARTINS, E.R.; MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C. Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 4, p. 1227-1234, 2013.

PÉREZ-SÁNCHEZ, J.; BENEDITO-PALOS, L.; ITZIAR ESTENSORO, I.; PETROPOULOS, Y.; CALDUCH-GINER, J.A.; BROWDY, C.L.; SITJÁ-BOBADILLA, A. Effects of dietary NEXT ENHANCE®150 on growth performance and expression of immune and intestinal integrity related genes in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v.44, p.117-128, 2015.

RAMIREZ, G.I.J.; LOGAN, J.G.; LOZA-REYES, E.; STASHENKO, E.; MOORES, G.D. Repellents Inhibit P450 Enzymes in *Stegomyia (Aedes) aegypti*. **Plos one**, v.7, n.11, 2012.

RAMOS, R.S.; RODRIGUES, A.B.L.; FARIAS, A.L.F.; SIMÕES, R.C.; PINHEIRO, M.T.; FERREIRA, R.M.A.; BARBOSA, L.M.C.; SOUTO, R.N.P.; FERNANDES, J.B.; SANTOS, L.S.; ALMEIDA, S.S.M.S. Chemical Composition and In Vitro Antioxidant, Cytotoxic, Antimicrobial, and Larvicidal Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. (Lamiaceae). **Scientific World Journal**, 2017.

REHMAN, J.U.; ALI, A.; KHAN, I.A. Plant based products: Use and development as repellents against mosquitoes: A review. **Fitoterapia**, v. 95, p. 65–74, 2014.

ROSA, C.S.; VERAS, K.S.; SILVA, P.R.; LOPES NETO, J.J.; CARDOSO, H.L.M.; ALVES, L.P.L.; BRITO, M.C.A.; AMARAL, F.M.M.; MAIA, J.G.S.; MONTEIRO, O.S.; MORAES, D.F.C. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n.1, p.19-26, 2016.

SARRAZIN, S.L.F.; SILVA, L.A.; OLIVEIRA, R.B.; RAPOSO, J.D.A.; SILVA, J.K.R.; SALIMENA, F.R.G.; MAIA, J.G.S.; MOURÃO, R.H.V. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Lipids in Health and Disease**, v.14, p.145, 2015.

SOONWERA, M. Efficacy of essential oil from *Cananga odorata* (Lamk.) Hook.f. & Thomson (Annonaceae) against three mosquito species *Aedes aegypti* (L.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison), and *Culex quinquefasciatus* (Say). **Parasitology Research**, v.114, p.4531–4543, 2015.

TABANCA, N.; BERNIER, U.R.; ALI, A.; WANG, M.; DEMIRCI, B.; BLYTHE, E.K.; KHAN, S.I.; BASER, K.H.C.; KHAN, I.A. Bioassay-Guided Investigation of Two *Monarda* Essential Oils as Repellents of Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p.8573–8580, 2013.

TABARI, M.A.; YOUSSEFI, M.R.; ESFANDIARI, A.; BENELLI, G. Toxicity of β -citronellol, geraniol and linalool from *Pelargonium roseum* essential oil against the West Nile and filariasis vector *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Research in Veterinary Science**, v.114, p.36–40, 2017.

VERA, S.S.; ZAMBRANO, D.F.; MÉNDEZ-SANCHEZ, S.C.; RODRÍGUEZ-SANABRIA, F.; STASHENKO, E.E.; LUNA, J.E.D. Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, n.113, p.2647–2654, 2014.

WHO (2016). Vector borne diseases. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/en/>.

ZHAO, M.P.; LIU, Q.Z.; LIU, Q.; LIU, Z.L. Identification of Larvicidal Constituents of the essential oil of *Echinops grijsii* roots against the three species of mosquitoes. **Molecules**, v. 22, n.205, 2017.

Capítulo II:

Extração, caracterização química e avaliação do potencial larvicida e repelente do óleo essencial de *Lippia origanoides* e de seus componentes majoritários contra *Aedes aegypti*

Extração, caracterização química e avaliação do potencial larvicida e repelente do óleo essencial de *Lippia origanoides* e de seus componentes majoritários contra *Aedes aegypti*

Resumo:

Mosquitos da espécie *Aedes aegypti* são transmissores de doenças como dengue, chikungunya, zika e febre amarela e são considerados como um dos maiores desafios para saúde pública mundial. Inseticidas e repelentes utilizados para o seu controle resultam em efeitos indesejáveis para o meio ambiente e à saúde humana, bem como resistência dos vetores com a sua utilização excessiva. Como alternativa para diminuir estes efeitos é a sua substituição por produtos naturais, como os óleos essenciais de plantas aromáticas. O presente estudo teve como objetivo avaliar as atividades larvicida e repelente do óleo essencial *Lippia origanoides* H.B.K (OELO), dos componentes majoritários (Carvacrol e Timol) e ainda na forma de complexos de inclusão frente ao *Aedes aegypti*. O OELO foi obtido através do método de hidrodestilação e caracterizado por CG/EM. Os complexos de inclusão foram obtidos por malaxagem e Spray Drying. A avaliação da atividade larvicida foi realizada utilizando 20 larvas de *A. aegypti* no 3º estágio de desenvolvimento e testados nas concentrações de 50; 75; 100; 150 e 200 µg/mL do OELO, dos componentes majoritários (Carvacrol e Timol) e seus respectivos complexos de inclusão. A mortalidade larval foi observada após 24h. O OELO e seus componentes majoritários apresentaram um bom potencial larvicida com CL₅₀ de 112,68; 85,46; 93,1 µg/mL e CL₉₀ 156,1; 107,51; 108,5 µg/mL. Os testes larvicida com o OELO, timol e carvacrol complexados à β-ciclodextrina nas mesmas concentrações demonstraram atividade superior, quando consideradas as concentrações de ativos, presentes em cada complexo. O OELO solubilizados em tween 80 1%, nas concentrações de 250; 500 e 1000 µg/mL apresentaram a atividade repelente de 48% para 250 µg/mL e de 100% nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL. Foram desenvolvidas seis formulações-teste com o OELO e ao final do estudo de estabilidade preliminar foram aprovadas duas formulações. As duas formulações aprovadas seguiram para o teste de atividade repelente frente ao *A. aegypti* e apresentaram 100% de repelência em todo o teste, assim como atividade inseticida. Portanto, pode-se concluir que o OELO, assim como os seus componentes majoritários demonstram ser promissores agentes larvicidas e repelentes no desenvolvimento de produtos naturais para atuarem no combate ao *A. aegypti*.

Palavras-Chave: *Lippia origanoides*, óleo essencial, timol, carvacrol, *Aedes aegypti*.

Extraction, chemical characterization and evaluation of the larvicidal and repellent potential of the essential oil of *Lippia origanoides* and its major components against *Aedes aegypti*

Abstract:

Mosquitoes of the species *Aedes aegypti* are transmitters of diseases like dengue, chikungunya, zika and yellow fever and are considered as one of the greatest challenges for world public health. Insecticides and repellents used for their control result in undesirable effects on the environment and human health, as well as resistance of the vectors with their overuse. As an alternative to diminish these effects is its substitution by natural products, like the essential oils of aromatic plants. The present study had as objective to evaluate the larval and repellent activities of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K (EOLO), the major components (Carvacrol and Thymol) and also in the form of inclusion complexes against *Aedes aegypti*. EOLO was obtained by the hydrodistillation method and characterized by GC/MS. Inclusion complexes were obtained by malaxing and Spray Drying. The evaluation of the larvicidal activity was carried out using 20 larvae of *A. aegypti* in the third stage of development and tested in the concentrations of 50; 75; 100; 150 and 200 µg/mL EOLO, major components (Carvacrol and Thymol) and their inclusion complexes. Larval mortality was observed after 24h. The EOLO and its major components presented a good larvicidal potential with LC50 of 112.68; 85.46; 93.1 µg / mL and CL90 156.1; 107.51; 108.5 µg / ml. The larvicidal tests with EOLO, thymol and carvacrol complexed to the β-cyclodextrin in the same concentrations showed superior activity when considering the active concentrations present in each complex. The EOLO solubilized in 1% tween 80 at concentrations of 250; 500 and 1000 µg/mL showed a repellent activity of 48% at 250 µg/mL and 100% at concentrations of 500 and 1000 µg/mL. Six test formulations were developed with EOLO and at the end of the preliminary stability study two formulations were approved. The two approved formulations followed the test for repellent activity against *A. aegypti* and showed 100% repellency throughout the test, as well as insecticidal activity. Therefore, it can be concluded that EOLO as well as its major components demonstrate promising larvicidal and repellent agents in the development of natural products to combat *A. aegypti*.

Keywords: *Lippia origanoides*, óleo essencial, thymol, carvacrol, *Aedes aegypti*.

1 INTRODUÇÃO

As arboviroses representam grandes problemas de saúde pública com importantes agravos à saúde humana, onde se destacam a Dengue, a Febre Amarela, Chikungunya e Zika. Sendo a dengue uma doença emergente que se tornou uma preocupação de Saúde Pública, devido à sua incidência ter aumentado cerca de 30 vezes nos últimos 50 anos e 50-100 milhões de infecções por ano são estimadas em mais de 100 países endêmicos. Embora a maioria dos pacientes seja assintomática, infecções subsequentes com quatro sorotipos de vírus diferentes, podem resultar em febre hemorrágica com alta mortalidade. Na América Latina, o Brasil se destaca com 98,5% dos casos e a maior taxa de mortalidade (SANTANA et al 2015). Mais recentemente e, o vírus Zika ganhou grande repercussão mundial por causar uma epidemia generalizada no Brasil. Estudos comprovaram que este vírus está associado a casos de deformidades congênitas em recém-nascidos, como a microcefalia, podendo causar inclusive abortos espontâneos (IMPERATO, 2016).

O *Aedes aegypti* é o mosquito vetor da Dengue, Febre Amarela, Chikungunya, Zika e outras arboviroses de impacto na saúde. Este mosquito é altamente antropofílico, possui hábitos diurnos e pode ser encontrado em ambientes que não possuem saneamento adequado. Tem se adaptado a ambientes urbanos, onde realiza sua oviposição e desenvolvimento de seus estádios aquáticos do seu ciclo biológico em recipientes feito pelo homem. A transmissão dos vírus se dá através da picada da fêmea adulta (DIAS; MORAES, 2014).

A estratégia mais eficaz atualmente para eliminar ovos, larvas, pupas e adultos é o uso de inseticidas contendo organoclorados, organofosforados, carbamatos ou piretróides. Entretanto, a aplicação mais frequente desses inseticidas tem causado o surgimento de cepas resistentes, exigindo aumento da dose e aplicações mais frequentes. Sendo assim, o controle mais efetivo dos mosquitos tornou-se insuficiente, dependente do limitado ao número de inseticidas efetivos disponíveis no mercado, bem como o agravante dos efeitos deletérios que estes compostos podem causar ao ecossistema e saúde humana (SILVA et al, 2015).

No entanto, este controle vetorial tem se constituído um grande desafio, principalmente em países em desenvolvimento em a população de insetos resistente tem prevalecido, surgindo a necessidade de inovações tecnológicas, sendo as fontes naturais

como as plantas, uma alternativa para o controle de mosquitos e incidência de arboviroses transmitidas por eles (ZARA et al, 2016; MAR et al, 2018).

As substâncias oriundas das plantas representam importante estratégia de manutenção da própria existência humana. O homem primitivo, através dos métodos de observação e tentativas, selecionou as plantas com fins alimentícios, terapêuticos e as que podiam ser tóxicas (BENDAZZOLI, 2000). As principais vantagens das moléculas de produtos naturais estão relacionadas com a especificidade nas suas atividades biológicas e a capacidade de se ligar a receptores biológicos (VILLAS BOAS e GADELHAS, 2007). Os fitoquímicos derivados de fontes vegetais podem atuar como larvicidas, reguladores de crescimento de insetos, atraentes oviposição e repelentes, podendo, portanto, desempenhar um papel importante na interrupção da transmissão de doenças transmitidas por mosquitos tanto a nível individual como a nível comunitário (MANJARI et al, 2014).

Na natureza, os óleos essenciais e outros extratos obtidos de plantas foram evocados como fontes relevantes de produtos naturais (BAKKALI et al., 2008; VEIGA Jr. et al., 2005). São produzidos como metabólitos secundários e desempenham um importante papel de proteção das plantas contra bactérias, fungos, vírus, insetos e herbívoros (SIMÕES et al, 2017). São importantes ainda para atrair alguns insetos para realizar a polinização das espécies vegetais e repelir outros. Portanto os óleos essenciais são substâncias voláteis naturais encontradas em grande variedade de plantas, com importância comercial, utilizados principalmente nas indústrias alimentícia, farmacêutica ou química, como potenciadores de sabor, odorizantes de fragrâncias e como inseticidas (KUMAR; WAHAB; WARIKOO, 2011).

A *Lippia origanoides* pertencente à família Verbenaceae, rico em óleos essenciais, amplamente distribuído pela América do Sul e América Central, sendo encontrado no Cerrado brasileiro. Conhecida na região Norte como “salva-do-marajo” e “alecrim-d’angola”, e no estado do Piauí como “alecrim-do-campo”. Esse arbusto aromático é usado na culinária e na medicina tradicional para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, doenças respiratórias e como antisséptico para irritação na boca e garganta (SARRAZIN et al, 2015; BARRETO et al, 2014). A composição do óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K é classificado em 5 quimiotipos diferentes de acordo com os seus componentes majoritários: Quimiotipo A (p-cimeno, α e β -felandreno e limoneno), Quimiotipo B (carvacrol), Quimiotipo C (timol), Quimiotipo D (1,8-cineol)

e Quimiotipo E ((E)-metil-cinamato e (E)-nerolidol). Essas variações na sua composição e rendimento ocorrem devido à influência de fatores externos como qualidade do solo e condições climáticas, levando conseqüentemente a influência em sua atividade biológica (SARRAZIN et al, 2015).

Uma característica intrínseca dos óleos essenciais é sua natureza lipofílica, que por vezes dificulta a sua solubilidade em matrizes à base de água. Como proposta para solucionar este problema seria a complexação destes óleos em ciclodextrinas (CDs), aumentando sua solubilidade e a estabilidade, quando incorporado numa formulação (LIANG et al, 2012). As CDs possuem estrutura adequada à formação de complexos com substâncias que necessitam aumentar a sua estabilidade e solubilidade, comitadamente. A sua estrutura externa é essencialmente hidrofílica, o que facilita a sua solubilidade em água e em outra substância polares, enquanto a sua cavidade interior é hidrofóbica, onde ficam alojadas as moléculas que se deseja trabalhar (KRINGEL et al, 2017).

O presente estudo teve como objetivo avaliar as atividades larvicida e repelente do óleo essencial, dos componentes majoritários (Carvacrol e Timol) de *Lippia origanoides* H.B.K, dos respectivos componentes complexados à β -ciclodextrina frente ao *Aedes aegypti* e o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica repelente.

2 METODOLOGIA

2.1 Reagentes

Carvacrol, Timol, Tween 80 e β -ciclodextrina foram adquiridos na Sigma-Aldrich, EUA.

2.2 Coleta do material vegetal

As partes aéreas de *L. origanoides* H.B.K foram coletadas no período da manhã, na cidade de José de Freitas (latitude 04°45'23" sul e longitude 42°34'32" oeste), Estado do Piauí, Brasil. A exsicata foi depositada no Herbário Graziela Barroso, na Universidade Federal do Piauí, sob o número TEPB09205.

2.3 Obtenção do óleo essencial

Para extração do óleo essencial, folhas limpas e selecionadas foram pesadas e submetidas ao processo de extração por hidrodestilação, em aparelho extrator tipo Clevenger (**figura 1**). Para tanto, aproximadamente 100g de folhas foram fragmentadas e colocadas em um balão volumétrico de fundo redondo com capacidade para 2 L, no

qual foi adicionado água destilada. O processo de extração foi realizado durante um período de aproximadamente 4 horas. O óleo foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur descartável, acondicionado em frasco de vidro âmbar hermeticamente fechado e posteriormente armazenados em refrigerador a 4°C.

Figura 1 - Aparelho de hidrodestilação tipo Clevenger modificada.



Fonte: Autoria própria.

2.3.1 Caracterização do óleo essencial por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas

A caracterização química dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) (**figura 2**).

Amostras de 1µL de óleo essencial foram injetadas e submetidas a seguinte programação: injetor = 220 °C, detector = 240 °C, coluna = 60°C a 240°C, 3°C.min⁻¹. O gás utilizado foi gás Hélio, com vazão de 1 mL. min⁻¹. Os espectros de massas foram comparados com as entradas da biblioteca eletrônica Wiley229 e conferidos visualmente com espectros de massas disponíveis na literatura (ADAMS, 2007) e comparação dos índices de Kóvats, dos espectros com os da biblioteca do CG-EM e com dados da literatura.

Figura 2 - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas.



Fonte: Autoria própria.

2.4 Preparo dos complexos de inclusão

2.4.1 Malaxagem

Para a complexação do OELO e de seus constituintes majoritários (timol e carvacrol) com a molécula de β -ciclodextrina pelo método de Malaxagem foram solubilizadas quantidades equimolares de OELO e β -CD na proporção 1:1 em temperatura ambiente em uma solução de etanol P.A. e água destilada (1:3). Os compostos foram homogeneizados com o auxílio de gral e pistilo durante 60 minutos. Posteriormente, o complexo foi colocado em estufa durante 24 horas para secagem. Foi calculado o rendimento do pó, em seguida, o complexo foi armazenado em dessecador até a realização dos testes. O mesmo procedimento foi realizado com o timol e o carvacrol separadamente.

2.4.2 Spray Drying

Para a complexação do OELO e de seus constituintes majoritários (timol e carvacrol) com a molécula de β -ciclodextrina pelo método de *spray drying* na proporção de 1:1, obtendo-se os complexos de inclusão (CI), foram solubilizadas quantidades equimolares de OELO e β -CD, em temperatura ambiente, em uma solução de etanol

P.A. e água destilada (1:3). Os compostos foram homogeneizados com o auxílio de um agitador magnético por 30 minutos. Posteriormente, essa solução foi injetada no aparelho *spray-drying* de bancada (BUCHI B-290) (**figura 3**) com uma pressão de entrada de 0,9 Bar, temperatura de entrada de 95 °C e fluxo da amostra de 3 mL min⁻¹. Foi calculado o rendimento do pó, em seguida, o complexo foi armazenado em dessecador até a realização dos testes. O mesmo procedimento foi realizado com o timol e o carvacrol separadamente.

Figura 3 - Aparelho *spray-drying* de bancada (BUCHI B-290).



Fonte: Autoria própria.

2.5 Desenvolvimento das formulações farmacêuticas

2.5.1 Formulação gel

Foram preparadas seis formulações (F1, F2, F3, F4, F5 e F6): três com base de lecitina de soja nas concentrações 0,0 1,0 e 1,5% de OELO e três a base de hidroxietilcelulose nas concentrações 0,0 1,0 e 1,5% de OELO (**tabela 1**).

Para a formulação Gel utilizando a lecitina de soja como agente gelificante de propriedades emulsionantes, na concentração de 2%, adicionado Optiphen® como conservante e quantidade suficiente de água para 100 g. A formulação foi homogeneizada e incorporado o óleo de *Lippia origanoides* nas concentrações de 1% e 1,5% como substância ativa.

Para a formulação Gel utilizando hidroxietilcelulose como base na concentração de 2% foi adicionado em água a 50°C e homogeneizado por 1 hora sem interrupção. Foram adicionados o conservante e propilenoglicol, nas concentrações de 0,25% 3%, O óleo de *Lippia origanoides* nas concentrações de 1% e 1,5% como substância ativa, foi incorporado após a base pronta e resfriada.

Tabela 1 - Composição das bases das formulações.

| COMPONENTES | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 |
|---|------|----|------|-------|-------|-------|
| Fosfolídeos de soja Lecigel® | 2% | 2% | 2% | - | - | - |
| Hidroxietilcelulose Natrosol® | - | - | - | 2% | 2% | 2% |
| Optiphen® | 2% | 2% | 2% | - | - | - |
| Conservante | - | - | - | 0,25% | 0,25% | 0,25% |
| Propilenoglicol | - | - | - | 3% | 3% | 3% |
| Óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> | - | 1% | 1,5% | - | 1% | 1,5% |
| Água q.s.p. | 100g | | | | | |

Legenda: (-): componente não adicionado
 F1 / F2 / F3 / F4 / F5 / F6: formulações-teste
 Fonte: Autoria própria.

2.5.2 Avaliação preliminar de estabilidade das formulações

2.5.2.1 Testes preliminares de estabilidade

O teste de estabilidade preliminar é realizado na fase inicial da fabricação de um produto, testando formulações utilizando vários parâmetros em condições extremas de

temperatura em espaço de tempo reduzido. Este teste não possui a finalidade de determinar a vida útil do produto, mas consiste em auxiliar na triagem das formulações (BRASIL, 2004). Os testes de estabilidade preliminar e acelerada foram executados em conformidade com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (BRASIL, 2004).

As formulações classificadas macroscopicamente como estáveis, após 24h de sua manipulação, foram submetidas aos testes preliminares de estabilidade: resistência à centrifugação, características organolépticas, valores de pH e determinação da espalhabilidade. Todos os testes foram realizados nos seguintes momentos: 24 horas após a manipulação (Tempo zero), após ciclo gelo-degelo, após estresse térmico e após 12 dias de sua manipulação e mantida em condições ambiente (Temperatura ambiente). Em todos os momentos todos os parâmetros foram realizados em triplicata.

2.5.2.1.1 Resistência a centrifugação

As amostras de 5g de cada formulação foram centrifugadas durante 30 min a 3000 rpm e no final observou-se a ocorrência ou não de separação de fases. O produto deve permanecer estável e qualquer sinal de instabilidade indica a necessidade de reformulação. A aprovação neste teste é um indicativo de estabilidade das preparações cosméticas avaliadas (BRASIL, 2004). Este teste foi realizado em triplicata.

2.5.2.1.2 Estresse térmico

Amostras de 15g de cada formulação foram submetidas ao aquecimento em banho termostatizado na faixa de temperatura de 40,0 a 80,0°C (**figura 4**). Programou-se o aumento da temperatura de $10,0 \pm 1,0$ em $10,0 \pm 1,0$ °C, mantendo-se por trinta minutos em cada temperatura. As leituras foram realizadas ao término de 80,0°C após o arrefecimento natural das amostras à temperatura ambiente (VELASCO et al, 2008).

Figura 4 - Banho termostatzado.



Fonte: Autoria própria.

2.5.2.1.3 *Ciclo gelo/desgelo*

O ciclo de gelo/desgelo foi realizado com 10g de cada tipo de formulação fabricada, alternando-os da geladeira à $5\pm 2,0^{\circ}\text{C}$ para a estufa à $50\pm 2,0^{\circ}\text{C}$, a cada 24 horas, durante 12 dias. Esse teste auxilia nas observações de alterações que podem ocorrer devido ao estresse de temperatura, acelerando o surgimento dos possíveis sinais de instabilidade (BRASIL et al, 2004).

2.5.2.1.4 *Características organolépticas*

Observou-se as formulações, primeiramente, pelos critérios cor, odor e aspecto. Além desses critérios verificou-se outros que poderiam estar diferentes das formulações iniciais analisadas. Essas características foram observadas após a formulação, após o stress térmico e a cada mudança do ciclo gelo/desgelo (BRASIL, 2004).

2.5.2.1.5 *Determinação do pH*

A determinação do pH foi realizada usando pHmetro digital, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. O eletrodo foi inserido diretamente nas amostras analisadas (BRASIL, 2004). Este teste foi realizado em triplicata e o resultado corresponde à média de três determinações.

2.5.2.1.6 Determinação da Espalhabilidade

A determinação da espalhabilidade foi realizada de acordo com metodologia previamente descrita na literatura por Knorst (1991). No equipamento utilizado, uma placa molde circular, de vidro (diâmetro = 20 cm; espessura = 0,2 cm), com orifício central de 1,2 cm de diâmetro, foi colocada sobre uma placa-suporte de vidro (20 cm x 20 cm) posicionada sobre uma escala milimetrada (**figura 5**).

A amostra foi introduzida no orifício da placa molde e a superfície foi nivelada com espátula. A placa molde foi cuidadosamente retirada e sobre a amostra foi colocada uma placa de vidro de peso conhecido. Após um minuto, foi realizada a leitura dos diâmetros abrangidos pela amostra, em duas posições opostas, com auxílio da escala do papel milimetrado. Posteriormente, foi calculado o diâmetro médio. Este procedimento foi repetido acrescentando-se sucessivamente outras placas, em intervalos de um minuto. Os resultados foram expressos em espalhabilidade (mm^2) da amostra em função do peso aplicado (gramas), de acordo com a equação abaixo, sendo que os mesmos correspondem à média de três determinações (BRASIL, 2004). Utilizou-se para o teste 10 placas, as quais variavam o peso entre 76,95 g e 309,70 g e foram aplicadas de forma decrescente perfazendo um total de 1533,2 g quando todas se apresentavam sobrepostas.

$$Ei = d^2 \cdot \pi / 4$$

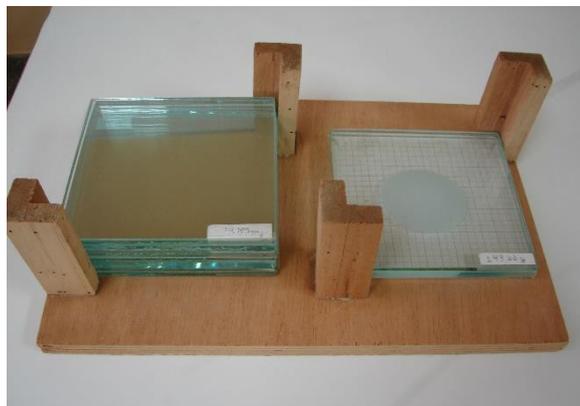
Onde:

Ei = espalhabilidade da amostra para um determinado peso i (mm^2);

d = diâmetro médio (mm);

$\pi = 3,14$.

Figura 5 - Aparelho de espalhabilidade.



Fonte: Autoria própria.

2.5.2.1.7 Microscopia óptica

A análise microscópica foi realizada medindo-se o diâmetro de 100 gotículas em ocular micrométrica. Para tanto as amostras do creme e creme-gel foram diluídas em solução de propilenoglicol em água (1:1), na proporção de uma parte de amostra para 10 partes da solução. A lâmina foi preparada e observada em microscópio óptico Olympus CX 40 com objetivas de 10 e 40 vezes e uma ocular 10x aumento (CARVALHO, 2007).

2.6 Avaliações das Atividades Biológicas

2.6.1 Animais

As linhagens de *A. aegypti*, isentas de agentes patogênicos ou inseticidas, para os bioensaios foram obtidas do Núcleo de Entomologia do Piauí (NEPI) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) - Campus Petrônio Portela. As colônias foram mantidas em temperatura controlada de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $80 \pm 10\%$ e ciclos claro/escuro de 12 horas, onde as larvas foram mantidas diariamente com ração autoclavada para felinos, enquanto os machos adultos foram alimentados com solução de sacarose a 10% e as fêmeas com sangue de galinhas.

Foram utilizadas 12 galinhas provenientes do Núcleo de Entomologia do Piauí (NEPI) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) - Campus Petrônio Portella, que são utilizadas para alimentação das colônias de mosquitos como para a realização dos

ensaios de avaliação da atividade repelente. Estas foram mantidas em galinheiro de alvenaria com tela, coberto de telha cerâmica, com água potável e alimentação à base de ração balanceada, *ad libitum*. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI - CEEA/UFPI, sob protocolo número 301/17 (**Anexo I**).

2.6.2 Atividade larvicida

2.6.2.1 Avaliação da atividade larvicida do OELO e de seus constituintes majoritários contra Aedes aegypti

Vinte larvas foram colocadas em béqueres de vidro de 50 mL com 29,5 ml de água destilada e 500 µL de solução de Tween 80 1% contendo o óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K, timol e carvacrol nas concentrações de 50; 75; 100; 150 e 200 µg/mL. O controle foi tratado como acima, mas sem óleo essencial. Cada béquer foi deixado à temperatura ambiente durante 24 horas, ao fim desse período foi realizada a contagem de larvas mortas. Cada tratamento foi realizado em triplicata e calculado da concentração letal (CL). A toxicidade do óleo foi relatada como CL₅₀ e CL₉₀, que representa as concentrações em µg/ml que mataram 50 e 90% de larvas (AGUIAR et al, 2015).

2.6.2.2 Avaliação da atividade larvicida do OELO, Timol e Carvacrol complexados à β-ciclodextrina

Vinte insetos foram colocados em béqueres de vidro de 50 mL com 29,5 ml de água destilada e 500 µL de solução de Tween 80 1% contendo complexos de inclusão com OELO, Timol e Carvacrol nas concentrações de 50; 75; 100; 150 e 200 µg/mL. O controle foi tratado como acima, mas sem o OELO e seus marcadores. Cada béquer foi deixado à temperatura ambiente durante 24 horas, ao fim desse período foi realizada a contagem de larvas mortas. Cada tratamento foi realizado em triplicata. A toxicidade do óleo foi relatada como CL₅₀ e CL₉₀, que representa as concentrações em µg/ml que matarão 50 e 90% de larvas (AGUIAR et al, 2015).

2.6.3 Atividade repelente

2.6.3.1 Avaliação da atividade repelente *in vitro* do óleo essencial e dos componentes majoritários

O OE foi solubilizado em Tween 80 para obter concentrações de 0; 250; 500 e 1000 µg/mL. O teste da atividade repelente foi realizado entre 8:00 e 14:00 devido ao hábito alimentar da espécie. 20 mosquitos fêmeas adultos entre 3 e 10 dias após emergirem, foram colocados em gaiolas de laboratório (24×24×24 cm) e mantidas sem alimentação durante 12 horas. Antes de cada ensaio, as galinhas tiveram as penas de suas pernas retiradas, após isso foram lavadas com sabão neutro sem cheiro e deixados secar durante 10 min. Após aplicação dos tratamentos, as galinhas foram colocadas sobre as gaiolas e foram contabilizadas o números de mosquitos que realizaram pouso ou alimentação nos tempos de 10, 20, 30 e 60 minutos. As experiências foram realizadas em triplicata (**figura 6**).

Figura 6 - Avaliação da atividade repelente do OELO contra *Aedes aegypti*.

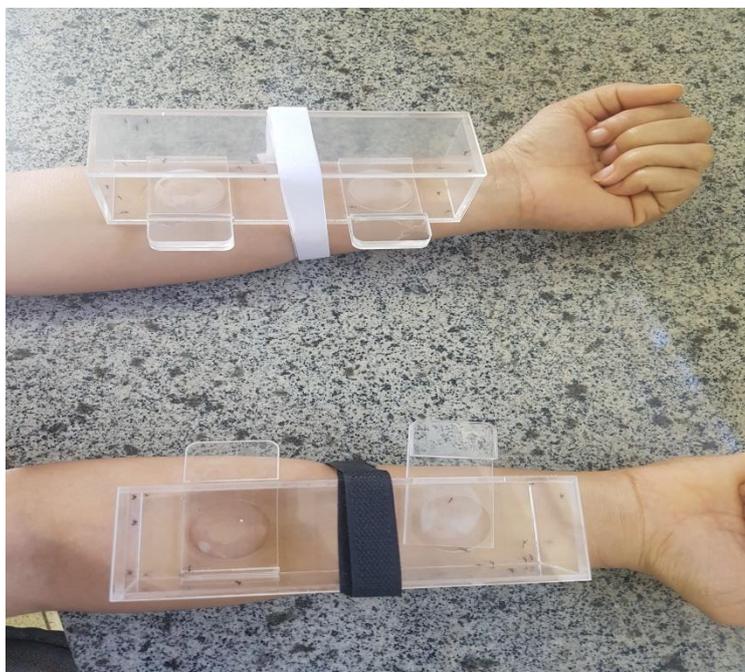


Fonte: Autoria própria.

2.6.3.2 Avaliação da atividade repelente das formulações

Para avaliação da atividade repelente, *in vivo*, foi desenvolvido um instrumento de teste de atividade repelente, confeccionado de material transparente de acrílico, de formato retangular, com dimensões 16x5x4 cm e com duas aberturas compostas por engrenagem deslizantes que permite a abertura para introdução das fêmeas de *A. aegypti*, e a exposição da pele com as formulações com o ambiente que contem as fêmeas de *A. aegypti*, modelo adaptado de Castillo; Stashenko; Duque (2017) (**figura 7**).

Figura 7 - Instrumento de teste de atividade repelente em humano.



Fonte: Autoria própria.

Na atividade repelente, foram utilizados antebraços de voluntários com idade entre 18 e 50 anos, após aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal do Piauí, CAAE: 74885917.5.0000.5214.

Antes do teste os voluntários foram esclarecidos quanto a importância da pesquisa e os riscos, após concordarem com a participação foi-lhes apresentado o termo de consentimento livre e esclarecido para proscição das assinaturas.

A parte utilizada para os testes em todos os voluntários foi o antebraço direito e esquerdo depois de realizada higienização com água e sabão neutro e seco com papel absorvente e aguardado um período de 10 min antes da aplicação das formulações. Em cada antebraço foi aplicado a quantidade de 0,5 gramas, considerando sempre um antebraço para as formulações com a substância ativa e outro antebraço para o controle negativo.

No instrumento de teste da atividade repelente, foram adicionadas 20 fêmeas de *A. aegypti* (5-12 dias de vida), aclimatados e sem alimentação por 24 horas. O instrumento foi acoplado em cada antebraço dos voluntários e observados nos tempos 10, 20, 30 e 60 minutos, sendo contabilizados a quantidade de fêmeas que conseguiram se aproximar da área exposta. Cada tratamento foi testado em triplicata.

2.7 Análises Estatísticas

Os resultados foram apresentados como a média \pm desvio padrão da média para cada grupo de experimento. Os ensaios foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando o valor $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Os valores da concentração letal média (CL_{50}) e da concentração letal a 90% (CL_{90}) foram calculados por regressão de probitos, utilizando o pacote SPSS® versão 22 e assumindo um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Para análises de variância utilizou-se Oneway ANOVA e o pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$) no software GraphPad Prism® 6.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização química do óleo essencial de *Lippia origanoides*

Através da análise de cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG/EM) foram identificados 10 compostos do óleo essencial através da comparação do seu índice de retenção com o índice presente na literatura. A **tabela 2** e a **figura 8** apresentam os constituintes do óleo essencial, sua composição percentual e seus valores do índice Kovats listados por ordem de eluição. Os principais constituintes do óleo estudado foram carvacrol (56,31%), seguido pelo p-cimeno (14,5%) e timol (10,62%), os espectros de massas destes constituintes estão apresentados na **figura 9**. A porcentagem das composições dos 7 compostos restantes variaram de 0,75 a 6,88%.

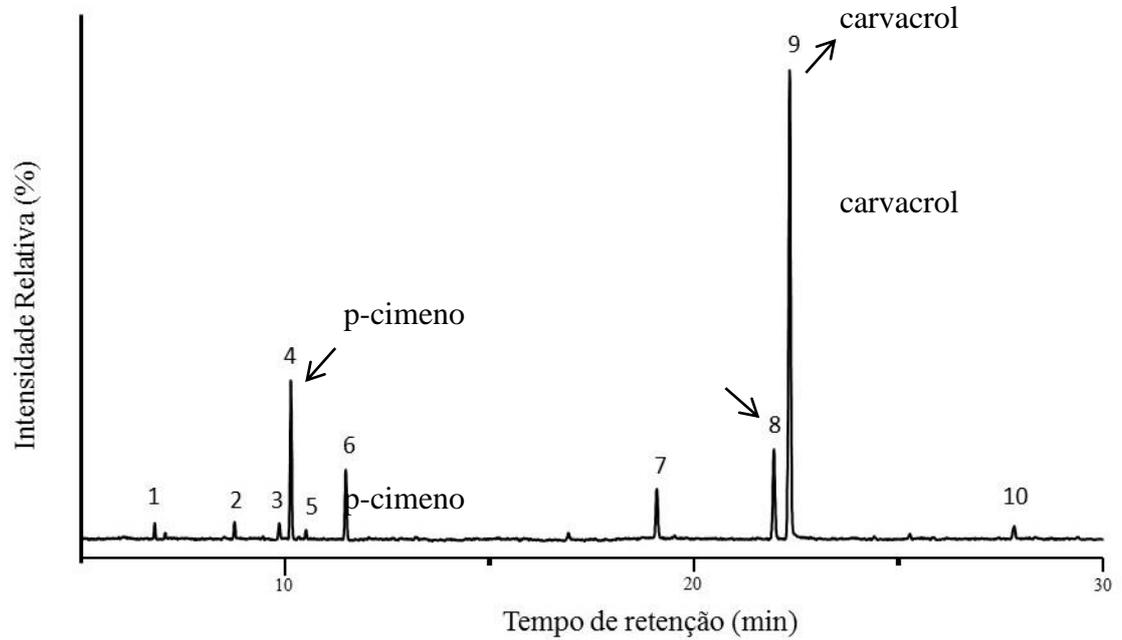
O óleo analisado pode ser classificado como quimiotipo B por apresentar o carvacrol como composto com maior concentração. O óleo essencial de *L. origanoides* *H.B.K* que ocorrem tanto no Brasil quanto na Colômbia foram classificados em quimiotipos, segundo a maior concentração dos seus diferentes componentes, como: Quimiotipo A (p-cimene, α - e β -felandreno e limoneno); Quimiotipo B (carvacrol); Quimiotipo C (timol); Quimiotipo D (1,8-cineol) e Quimiotipo E ((E)-metil-cinamato e (E)-nerolidol). (SARRAZIN et al, 2015b).

Tabela 2 - Composição química do óleo essencial de *L. origanoides* *H.B.K*

| Pico | Componente | Área (%) | IR (calculado) | IR literat. |
|------|----------------------|----------|----------------|-------------|
| 1 | α -tujeno | 1,07 | 974 | 924 |
| 2 | mirceno | 1,32 | 1034 | 988 |
| 3 | α -terpineno | 1,47 | 1064 | 1014 |
| 4 | p-cimeno | 14,5 | 1072 | 1020 |
| 5 | 1,8-cineol | 0,75 | 1082 | 1026 |
| 6 | γ -terpineno | 6,88 | 1107 | 1054 |
| 7 | timol metil éter | 5,48 | 1283 | 1232 |
| 8 | timol | 10,62 | 1348 | 1289 |
| 9 | carvacrol | 56,31 | 1357 | 1298 |
| 10 | β -cariofileno | 1,6 | 1485 | 1408 |

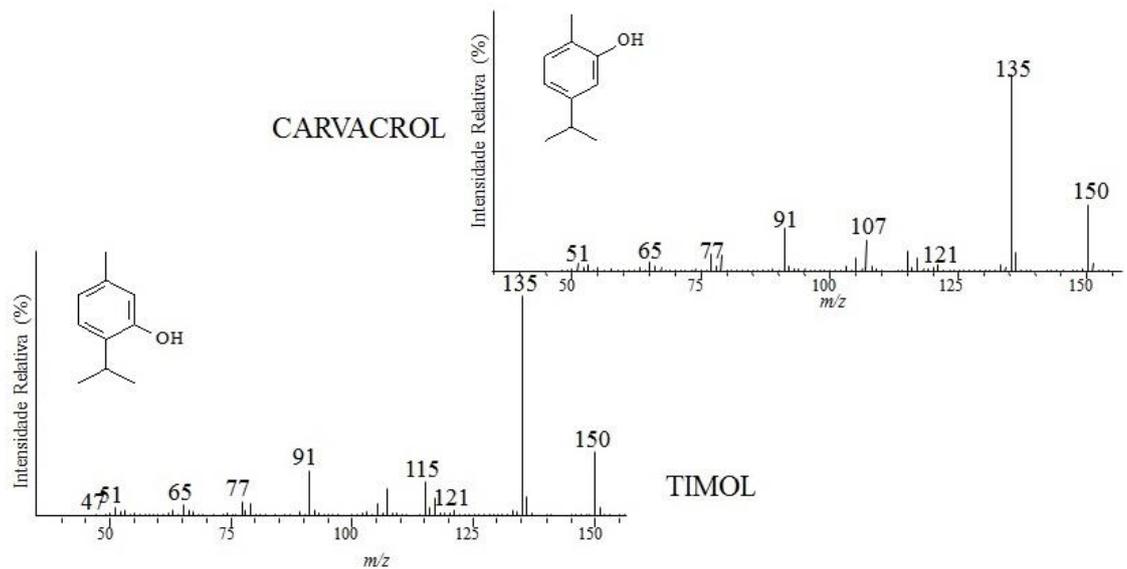
Fonte: Autoria Própria.

Figura 8 - Cromatograma dos íons totais (TIC) dos constituintes voláteis do óleo essencial de *Lippia origanoides*.



Fonte: Autoria Própria.

Figura 9 - Espectros de massas dos compostos majoritários do óleo essencial das partes aéreas de *L. origanoides* H.B.K .



Fonte: Autoria Própria.

De acordo com os resultados da caracterização deste óleo, podemos inferir que os principais componentes são monoterpenos. Estes já foram relatados por vários autores por possuírem atividade larvicida contra mosquitos dos gêneros *Culex*, *Anopheles* e *Aedes* (CASTILLO; STASHENKO; DUQUE, 2017).

Corroborando com os resultados encontrados, um estudo realizado com amostras coletadas na Colômbia por Castillo; Stashenko; Duque (2017), demonstrou que os maiores componentes majoritários do OELO foram carvacrol (50,6%), timol (11,5%) e *p*-cimeno (8,7%). Em outro estudo realizado no estado de Minas Gerais, Brasil, com as partes aéreas de *L. origanoides* H.B.K., foram identificados 15 compostos onde os que apresentaram as maiores concentrações foram carvacrol (29%), *o*-cimeno (25,6%) e timol metil éter (11,5%) (ANDRADE et al, 2014).

O óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K. coletado em Anapurus, Maranhão, Brasil, apresentou como componente majoritário o 1,8-cineol (64,1%). Já a análise de três espécimes coletadas na Colômbia apresentaram diferentes composição com predominância de timol (56%), predominância de carvacrol (40%) e predominância de *p*-cimeno (12%), respectivamente. Pode haver diferenças na composição dos óleos essenciais que podem estar atribuídos às variações do estado fenológico e à fatores ambientais. Estas alterações afetam significativamente os processos bioquímicos e fisiológicos da planta, que regulam o metabolismo e conseqüentemente a biossíntese dos óleos essenciais. (SARRAZIN et al, 2015a).

3.2 Avaliação preliminar de estabilidade das formulações

3.2.1 Testes preliminares de estabilidade

Os estudos de estabilidade de cosméticos são realizados com o intuito de indicar o grau de estabilidade do produto, garantindo sua segurança e eficácia, desde a sua fabricação até o término da sua validade. Estes estudos geram subsídios para orientação na escolha dos componentes da formulação, do material de acondicionamento adequado, formas de apresentação, na escolha de material de acondicionamento e de embalagem alternativos, bem como a confirmação do prazo de validade estimado (SILVA et al, 2015; NISHIKAWA, et al, 2007).

3.2.1.1 Características organolépticas

Em relação às características organolépticas, nas formulações F1, F2 e F3 não houve alteração no aspecto, cor e odor. Quanto às formulações F4, F5 e F6, não houve alteração quanto ao odor, entretanto, apresentou alteração na cor e aspecto após os testes de estresse térmico, ciclo gelo/degelo e em temperatura ambiente, no qual houve aumento da temperatura durante os testes. Os resultados das verificações das características organolépticas das formulações estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Características organolépticas das formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 em tempo zero, após teste estresse térmico, após teste ciclo gelo-degelo e em amostras mantidas a temperatura ambiente.

| TEMPOS | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 |
|-----------------------------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------------------|
| Zero | | | | | | |
| Aspecto | homogêneo | homogêneo | homogêneo | homogêneo | homogêneo | homogêneo |
| Cor | branco | branco | branco | incolor | amarelado | amarelado |
| Odor | ausente | carac. óleo essencial | carac. óleo essencial | ausente | carac. óleo essencial | carac. óleo essencial |
| Estresse térmico | | | | | | |
| Aspecto | homogêneo | homogêneo | homogêneo | homogêneo | heterogêneo | heterogêneo |
| Cor | branco | branco | branco | incolor | amarelado | amarelado |
| Odor | ausente | carac. óleo essencial | carac. óleo essencial | ausente | carac. óleo essencial | carac. óleo essencial |
| Ciclo gelo/degelo | | | | | | |
| Aspecto | homogêneo | homogêneo | homogêneo | homogêneo | heterogêneo | heterogêneo |
| Cor | branco | branco | branco | incolor | amarelado | amarelado |
| Odor | ausente | carac. óleo essencial | carac. óleo essencial | ausente | carac. óleo essencial | carac. óleo essencial |
| Temperatura ambiente | | | | | | |
| Aspecto | homogêneo | homogêneo | homogêneo | homogêneo | heterogêneo | heterogêneo |
| Cor | branco | branco | branco | incolor | amarelado | amarelado |
| Odor | ausente | carac. óleo essencial | carac. óleo essencial | ausente | carac. óleo essencial | carac. óleo essencial |

Fonte: Autoria própria.

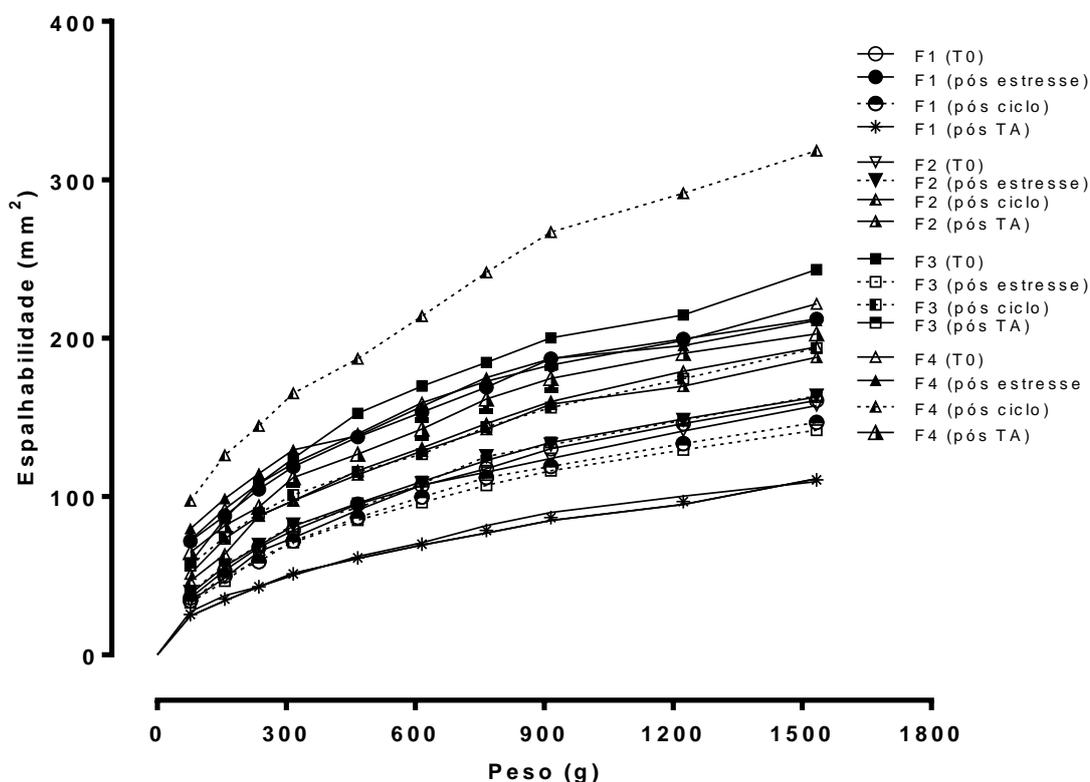
3.2.1.2 Determinação do pH

Na análise do pH, observou-se que as amostras mantiveram-se na faixa entre 5,0-6,0, mantendo-se assim dentro de uma faixa adequada para produtos cosméticos e dermatológicos.

3.2.1.3 Determinação da Espalhabilidade

Durante os testes de espalhabilidade, foi observado que as formulações à base de hidroxietilcelulose apresentaram uma elevada espalhabilidade após os testes de estresse, principalmente naquele em que houve aumento excessivo da temperatura. Foram excluídos dos estudos as formulações F5 e F6 por apresentarem instabilidades como separação de fases durante os testes. Enquanto as formulações à base de fosfolipídio de soja, F1, F2, F3 e F4 à base de hidroxietilcelulos e apresentaram uma boa espalhabilidade e menos variação nestes valores quando submetidos às variações de temperatura, prosseguindo assim nos testes de estabilidade, assim como no bioensaio de repelência.

Figura 10 - Valores de espalhabilidade das formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 em tempo zero, após teste estresse térmico, após teste ciclo gelo-degelo e em amostras mantidas a temperatura ambiente.



Legenda: T0: tempo zero.
 pós ciclo: após ciclo gelo/degelo.
 pós estresse: após estresse térmico
 TA: temperatura ambiente por 12 dias.
 Fonte: Autoria própria.

3.2.1.4 Microscopia óptica

O teste de microscopia óptica aplicado para determinar o diâmetro das gotículas na formulação tópica não foi adequado para as formulações. As partículas, possivelmente, estavam finamente dispersas, com diâmetro não detectado com a microscopia óptica. Estes resultados não comprometem a qualidade das formulações, uma vez que essas características não correspondem à instabilidade.

3.3 Avaliações das atividades biológicas

3.3.1 Avaliação da atividade larvicida do OELO e de seus constituintes majoritários contra *Aedes aegypti*

O OELO testado nas concentrações de 50; 75; 100; 150 e 200 µg/mL apresentou atividade larvicida contra *A. aegypti*, com concentração letal cinquenta CL₅₀ e CL₉₀ de 89,28 e 114,5 µg/mL, respectivamente. Os componentes majoritários, carvacrol e timol, nas concentrações de 50; 75; 100; 150 e 200 µg/mL foi constatada CL₅₀ e CL₉₀ de 54,5 e 89,1 µg/mL, e 68,0 e 92,3 µg/mL, respectivamente. No entanto, ao testar o OE, timol e carvacrol complexados à β-ciclodextrina nas mesmas concentrações, demonstraram aparentemente baixa atividade, só que não, uma vez que a concentração do óleo e dos componentes majoritários estão diluídos, quando consideramos a massa molecular da β-ciclodextrina e a média da massa dos componentes majoritários, Tabela 4 e Figura 11.

Tabela 4 - Atividade larvicida do óleo essencial de *Lippia organoides* contra *Aedes aegypti*.

| Composto | CL ₅₀ (µg/mL) | CL ₉₀ (µg/mL) | χ ² |
|---------------|--------------------------|--------------------------|----------------|
| OELO | 112,68 | 156,1 | 26,61* |
| Carvacrol | 85,46 | 107,51 | 14,3* |
| Timol | 93,1 | 108,5 | 0,01* |
| OELO-mlx | 262,87 | 346,29 | 1,6 |
| Carvacrol-mlx | 256,05 | 335,36 | 1,37 |
| Timol-mlx | 295,27 | 377,91 | 0,2 |
| OELO-SD | 265,66 | 360,71 | 5,27 |
| Carvacrol-SD | 319,87 | 430,94 | 2,29 |
| Timol-SD | 317,81 | 411,66 | 0,32 |

Legenda: OELO: óleo essencial de *Lippia organoides* H.B.K.

OELO-mlx: óleo essencial de *Lippia organoides* H.B.K. complexado por malaxagem.

Carvacrol-mlx: carvacrol complexado por malaxagem.

Timol-mlx: timol complexado por malaxagem.

OELO-SD: óleo essencial de *Lippia organoides* H.B.K. complexado por spray-drying.

Carvacrol-SD: carvacrol complexado por spray-drying.

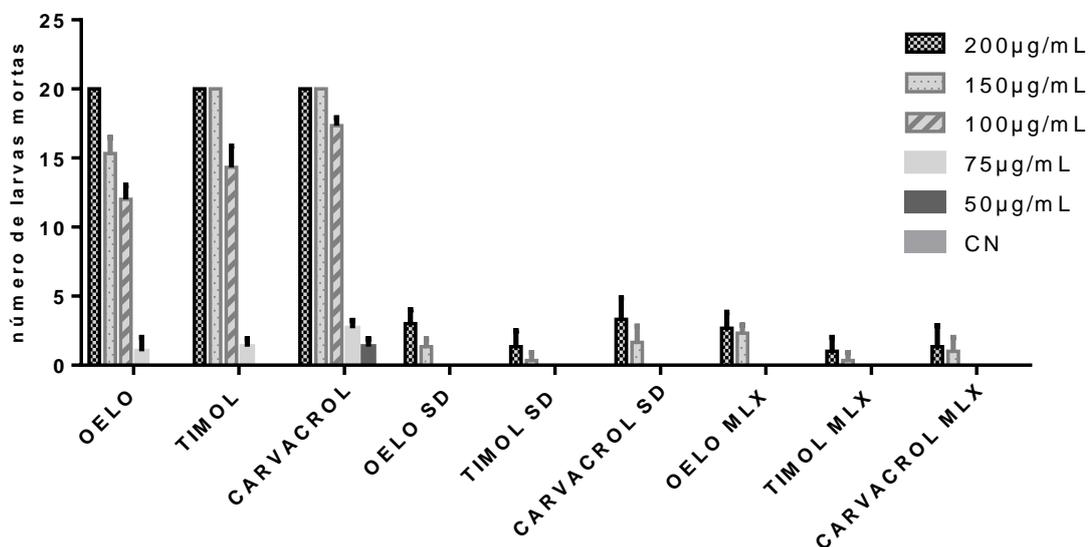
Timol-SD: timol complexado por spray-drying.

χ²: qui-quadrado

*P<0.05, nível de significância

A busca por larvicidas naturais ecologicamente seguros, com alta eficácia e que sejam de menor custo, tem impulsionado a descoberta de novos óleos essenciais com potencial larvicida promissor para o desenvolvimento de produtos que possam atuar como medidas complementares e suplementares no combate a mosquitos transmissores de doenças (SUMITHA & THOPPIL, 2016).

Figura 11 - Atividade larvicida do óleo essencial de *Lippia origanoides* contra *Aedes aegypti*.



Fonte: Autoria própria.

Em um estudo no qual foi avaliada a atividade larvicida do OE do rizoma de *Zingiber nimmonii* em larvas de 3º estágio tardio de *Aedes aegypti*, a CL_{50} e CL_{90} foi de 44,46 e 85,88 µg/mL, respectivamente (GOVINDARAJAN et al, 2016a). Em outro estudo também realizado por Govindarajan et al (2016b), avaliou o OE das folhas frescas de *Plectranthus barbatus* em 20 larvas do 3º estágio tardio de *Aedes albopictus*, apontando uma CL_{50} e CL_{90} de 87,25 e 107,56, respectivamente.

O mecanismo de ação dos OEs que proporciona à morte larval de mosquitos ainda não foi claramente elucidada, além dos bioensaios, são realizados estudos enzimáticos nos insetos, com o intuito de auxiliar no esclarecimento do mecanismo de ação destes compostos (LEVYA et al, 2016). Uma hipótese foi testada utilizando o óleo essencial de *Piper corcovadensis*, onde os autores concluíram que o óleo inibiu as enzimas digestivas presentes no intestino das larvas de *A. aegypti*, como a tripsina e a quimiotripsina, que são de suma importância para a nutrição, desenvolvimento e crescimento destas larvas (SILVA et al, 2016).

A atividade larvicida dos óleos essenciais pode ser atribuída à presença de monoterpenos como componentes principais desses óleos (CASTRO et al, 2016; CHAUHAN et al, 2016).

O timol e o carvacrol são monoterpenos fenóis biossintetizados a partir do γ -terpineno, que por sua vez é gerado a partir do p -cimeno, estes últimos compostos sempre estão presentes no mesmo óleo. É importante considerar que o timol e o carvacrol são isômeros, variando apenas a posição do grupo hidroxila no anel fenólico (SARRAZIN et al, 2015a).

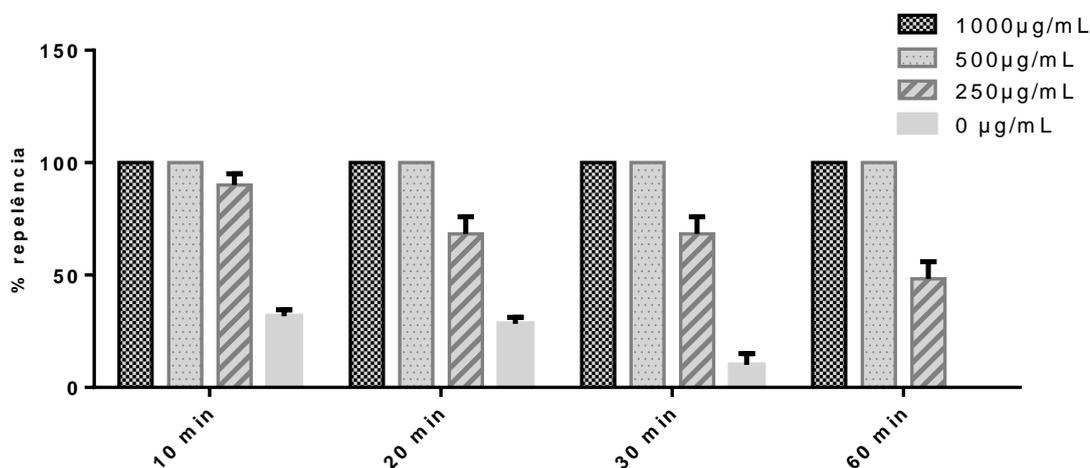
Em estudo realizado por Govindarajan et al (2013), o timol foi testado contra as larvas de 3º estágio das espécies *Aedes subpictus* e *Aedes albopictus*, apresentando 2,5 vezes mais toxicidade do que o OE com CL_{50} e CL_{90} de 22,06 e 24,83; e 40,06 e 44,28 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

A investigação acerca do mecanismo de ação de novos bioinseticidas no combate a mosquitos em todo o seu ciclo biológico são de suma importância, pois podem fornecer informações necessárias para o desenvolvimento de novas formulações e distribuição a serem adotadas para uma possível comercialização, além de definir estratégias para o gerenciamento da resistência causada pelo uso indiscriminado de inseticidas sintéticos (WANG et al, 2016)

3.3.2 Avaliação da atividade repelente do OELO contra *Aedes aegypti*

O bioensaio repelente demonstrou que o OELO possui boa atividade repelente. As concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram repelência de 100% durante o tempo de 60 minutos, na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, apresentou repelência de 68% em 30 minutos de teste, diminuindo para 48% no fim do teste (**figura 12**). A partir dos resultados demonstrados, o óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K apresenta grande potencial para uma promissora formulação repelente.

Figura 12 - Atividade repelente do óleo essencial de *Lippia origanoides* contra *Aedes aegypti*.



Fonte: Autoria Própria.

A aplicação de repelentes e/ou materiais tratados com inseticidas são considerados a forma mais antiga e comum para proteção pessoal contra picadas de mosquitos (CONTI et al, 2013). Repelentes de insetos são produtos que previnem insetos, tais como os mosquitos de se alimentarem através da picada sob a pele humana ou animal (MAMOOD et al, 2017). A atividade contra mosquitos já foi relatada para alguns óleos essenciais, como anis, eucalipto, hortelã, manjerição e louro (KOC; OZ; CETIN, 2012).

Atualmente, o dietiltoluamida (DEET) é conhecido por ser o agente repelente de mosquitos com maior eficácia no mercado, proporcionando até 8h de proteção contra estes insetos. Entretanto, apesar da sua eficácia, pode apresentar odor e textura na pele desagradáveis, bem como possíveis reações alérgicas, aumentando a demanda por formulações contendo produtos naturais (MISNI; MOHAMED; AHMAD, 2016).

Resultados da atividade repelente do óleo essencial de *Ruta chapelensis* apontaram uma boa repelência contra *Aedes aegypti* utilizando doses consideradas baixas, com RD_{50} foi de $0,000215 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ da pele, enquanto RD_{90} foi de $0,007613 \mu\text{L}/\text{cm}^2$. Na dose mais alta testada o OE manteve a repelência de 50% dos mosquitos por 45 minutos (CONTI et al, 2013).

Govindarajan (2011) realizou um estudo em que testaram o OE de quatro espécies de plantas *Cymbopogon citrates*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Rosmarinus officinalis* e *Zingiber officinale* contra *Culex tritaeniorhynchus* e *Anopheles subpictus*, onde a maior repelência observada foi no OE de *Z. officinale*, no qual a maior concentração testada forneceu 100% de proteção no tempo de 150 minutos.

O óleo essencial de *Polygonum hydropiper* apresentou a atividade repelente foi até 323,2 min e 302,6 min após aplicação a 10 e 5 ppm, respectivamente. Durante o período de estudo, não foram observadas irritações na pele, sensações quentes ou erupções cutâneas, demonstrando ser um princípio ativo em potencial para o desenvolvimento de formulações repelentes seguras e eficazes (MAHESWARAN & IGNACIMUTHU, 2015).

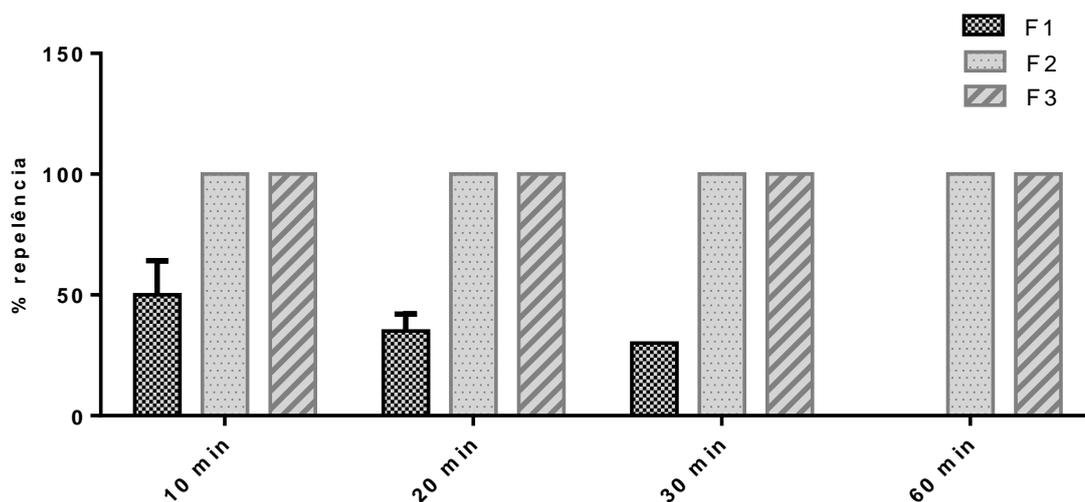
Os óleos essenciais após a sua atividade repelente comprovada podem ser utilizados como princípios ativos de repelentes comerciais, tanto individualmente como em associação com outros produtos naturais ou mesmo em produtos sintéticos com o intuito de diminuir a sua concentração utilizada. É importante ressaltar que após resultados obtidos em laboratórios, os óleos testados devem ser explorados para avaliar a sua eficácia em estudos de campo, bem como para estudar a sua viabilidade econômica e residual para serem considerados em programas de controle de insetos (KHANDAGLE et al, 2011).

3.3.3 Avaliação da atividade repelente das formulações

Após a conclusão dos testes de estabilidade preliminar, foram aprovadas as formulações F1, F2 e F3 para prosseguirem para realização dos testes de repelência contra fêmeas de *A. aegypti*. Os resultados demonstraram que as formulações F2 e F3 mantiveram 100% de repelência em todo tempo decorrido do teste (60 minutos). Durante a observação da atividade repelente foi observada a atividade inseticida, com a morte de todos os mosquitos ao fim do teste, 60 minutos. A formulação-teste F1, que não foi adicionado nenhuma concentração de óleo essencial não confirmou atividade repelente, durante o experimento, sendo observada uma adaptação dos mosquitos e de forma decrescente a atividade repelente com o passar do tempo, índice de repelência média de 50% no tempo de 10 minutos, 35% em 20 minutos, 30% em 30 minutos e 0%

no fim do teste e não foi observada nenhuma atividade inseticida, como era previsto (figura 13).

Figura 13 - Atividade repelente das formulações F1, F2 e F3 contra *Aedes aegypti*.



Legenda: F1: formulação à base de fosfolipídeo de soja 0%.

F2: formulação à base de fosfolipídeo de soja 1%.

F3: formulação à base de fosfolipídeo de soja 1,5%.

Fonte: Autoria própria.

A eficácia dos repelentes é dependente da sua volatilidade e da sua fixação na pele durante as atividades diárias. Para uma proteção adequada e eficaz destes mosquitos vetores de doenças é necessária a sua reaplicação regular. No entanto, os óleos essenciais de plantas oferecem um curto tempo de duração do efeito repelente devido à alta volatilidade de seus compostos (MAMOOD et al, 2017; KEZIAH et al, 2015). Neste contexto, embora as formulações desenvolvidas e testadas neste estudo se mostraram efetivas e promissoras contra o *A. aegypti*, são necessários estudos mais completos, como os estudos de estabilidade acelerada e de prateleira, bem como testes de campo que avaliam o efeito repelente em espaços mais amplos e em períodos maiores de tempo.

4 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que o óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K e seus componentes majoritários, timol e carvacrol apresentaram atividade larvicida contra *Aedes aegypti*.

As formulações de complexos de inclusão do óleo com β -ciclodextrina foi possível observar a potencialização da atividade larvicida contra *A. aegypti*.

As formulações das formas farmacêuticas obtidas de óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K, incorporadas em excipientes a base de fosfolipídeos de soja (Lecigel®) apresentou melhor resultado nos testes de estabilidade preliminar quando comparada com as formulações produzidas em excipientes a base de hidroxietilcelulose (Natrosol®).

Em relação ao teste de estabilidade preliminar, das seis formulações desenvolvidas, as formulações-teste F2 e F3 foram aprovadas nos ensaios, bem como apresentaram índice de repelência de 100% durante todos os bioensaios de repelência contra as fêmeas de *A. aegypti*. E em paralelo ao teste de repelência foi possível observar a atividade inseticida contra fêmeas de *A.aegypti* de forma dose dependente.

Portanto ficou notório o potencial do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K para o desenvolvimento de produtos com aplicabilidade larvicida, repelente e inseticida para atuar no combate do mosquito *A.aegypti*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry. Allured Publishing Corporation Carol Stream, Illinois. 2007, 804 p.
- AGUIAR, R.W.S; DOS SANTOS, S.F.; MORGADO, F.S.; ASCENCIO, S.D.; LOPES, M.M.; VIANA, K.F.; DIDONET, J.; RIBEIRO, B.M. Insecticidal and Repellent Activity of *Siparuna guianensis* Aubl. (Negramina) against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **PLoS ONE**, v.10, n.2, 2015.
- ANDRADE, V.A.; ALMEIDA, A.C.; SOUZA, D.S.; COLEN, K.G.F.; MACÊDO, A.A.; MARTINS, E.R.; FONSECA, F.S.A.; SANTOS, R.L. Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia origanoides*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.12, p.1153-1161, 2014.
- BARRETO, H.M.; FONTINELE, F.C.; OLIVEIRA, A.P.; ARCANJO, D.D.R.; SANTOS, B.H.C.; ABREU, A.P.L.; COUTINHO, H.D.M.; SILVA, R.A.C.; SOUSA,

- T.O.; MEDEIROS, M.G.F.; CITÓ, A.M.G.L.; LOPES, J.A.D. Phytochemical prospection and modulation of antibiotic activity in vitro by *Lippia origanoides* H.B.K. in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **BioMed Research International**, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Brasília, 2004. 45p.
- CASTILLO, R.M.; STASHENKO, E.; DUQUE, J.E. Insecticidal and repellent activity of several plant-derived essential oils against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.33, n. 1, p. 25–35, 2017.
- CASTRO, D.S.B.; SILVA, D.B.; TIBÚRCIO, J.D.; SOBRAL, M.E.G.; FERRAZ, V.; TARANTO, A.G.; SERRÃO, J.E.; SIQUEIRA, J.M.; ALVES, S.N. Larvicidal activity of essential oil of *Peumus boldus* Molina and its ascaridole-enriched fraction against *Culex quinquefasciatus*. **Experimental Parasitology**, v. 171, p. 84-90, 2016.
- CHAUHAN, N.; MALIK, A.; SHARMA, S.; DHIMAN, R.C. Larvicidal potential of essential oils against *Musca domestica* and *Anopheles stephensi*. **Parasitology Research**, v. 115, p. 2223–2231, 2016.
- CONTI, B.; LEONARDI, M.; PISTELLI, L.; PROFETI, R.; OUERGHEMMI, I.; GIOVANNI BENELLI, G. Larvicidal and repellent activity of essential oils from wild and cultivated *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae) against *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae), an arbovirus vector. **Parasitology Research**, v. 112, p. 991–999, 2013.
- 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.
- GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M.; ARIVOLI, S.; TENNYSON, S.; BENELLI, G. Larvicidal and repellent potential of *Zingiber nimmonii* (J. Graham) Dalzell (Zingiberaceae) essential oil: an eco-friendly tool against malaria, dengue, and lymphatic filariasis mosquito vectors? **Parasitology Research**, v.115, p.1807–1816, 2016.
- GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M.; HOTI, S.L.; BHATTACHARYYA, A.; BENELLI, G. Eugenol, α -pinene and β -caryophyllene from *Plectranthus barbatus* essential oil as eco-friendly larvicides against malaria, dengue and Japanese encephalitis mosquito vectors. **Parasitology Research**, v. 115, p. 807–815, 2016.
- GOVINDARAJAN, M.; SIVAKUMAR, R.; RAJESWARY, M.; VEERAKUMAR, K. Mosquito larvicidal activity of thymol from essential oil of *Coleus aromaticus* Benth. against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus*, and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 112, p. 3713–372, 2013.
- GOVINDARAJAN, M. Larvicidal and repellent properties of some essential oils against *Culex tritaeniorhynchus* Giles and *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 106-111, 2011.
- IMPERATO, P.J. The Convergence of a Virus, Mosquitoes, and Human Travel in Globalizing the Zika Epidemic. **Journal Community Health**, v. 41, p. 674–679, 2016.
- KEZIAH, E.A.; NUKENINE, E.N.; DANGA, S.P.; YOUNOUSSA, L.; ESIMONE, C.O. Creams formulated with *Ocimum gratissimum* L. and *Lantana camara* L. crude extracts and fractions as mosquito repellents against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Journal of Insect Science**, v.15, n.1, 2015.

- KHANDAGLE, A.J.; TARE, V.S.; RAUT, K.D.; MOREY, R.A. Bioactivity of essential oils of *Zingiber officinalis* and *Achyranthes aspera* against mosquitoes. **Parasitology Research**, v. 109, p. 339–343, 2011.
- KOC, S.; OZ, E.; CETIN, H. Repellent activities of some Labiatae plant essential oils against the saltmarsh mosquito *Ochlerotatus caspius* (Pallas, 1771) (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 110, p. 2205–2209, 2012.
- KRINGEL, D.H.; ANTUNES, M.D.; KLEIN, B.; CRIZEL, R.L.; WAGNER, R.; OLIVEIRA, R.P.; DIAS, A.R.G.; ZAVAREZE, E.R. Production, Characterization, and Stability of Orange or Eucalyptus Essential Oil/ β -Cyclodextrin Inclusion Complex. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 11, 2017.
- KUMAR, S.; WAHAB, N.; WARIKOO, R. Bioefficacy of *Mentha piperita* essential oil against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.1, n.2, p. 85-88, 2011.
- LEYVA, M.; FRENCH-PACHECO, L.; QUINTANA, F.; MONTADA, D.; CASTEX, M.; HERNANDEZ, A.; MARQUETTI, M.C. *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake (Myrtales: Myrtaceae): Natural alternative for mosquito control. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 979–984, 2016.
- LIANG, H.; YUAN, Q.; VRIESEKOOOP, F.; LV, F. Effects of cyclodextrins on the antimicrobial activity of plant-derived essential oil compounds. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1020–1027, 2012.
- MAHESWARAN, R.; IGNACIMUTHU, S. Effect of confertifolin from *Polygonum hydropiper* L. against dengue vector mosquitoes *Aedes aegypti* L. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 8280–8287, 2015.
- MAMOOD, S.N.H.; HIDAYATULFATHI, O.; BUDIN, S.B.; AHMAD ROHI, G.; ZULFAKAR, M.H. The formulation of the essential oil of *Piper aduncum* Linnaeus (Piperales: Piperaceae) increases its efficacy as an insect repellent. **Bulletin of Entomological Research**, v. 107, p. 49–57, 2017.
- MANJARI, M.S.; KARTHI, S.; RAMKUMAR, G.; MUTHUSAMY, R.; NATARAJAN, D.; SHIVAKUMAR, M.S. Chemical composition and larvicidal activity of plant extracts from *Clausena dentata* (Willd) (Rutaceae) against dengue, malaria, and filariasis vectors. **Parasitology Research**, v.113, p.2475–248, 2014.
- MAMOOD, S.N.H.; HIDAYATULFATHI, O.; BUDIN, S.B.; AHMAD ROHI, G.; ZULFAKAR, M.H. The formulation of the essential oil of *Piper aduncum* Linnaeus (Piperales: Piperaceae) increases its efficacy as an insect repellent. **Bulletin of Entomological Research**, v. 07, n.1, p. 49-57, 2017.
- MAR, J.M.; SILVA, L.S.; AZEVEDO, S.G.; FRANÇA, L.P.; GOES, A.F.F.; SANTOS, A.L.; BEZERRA, J.A.; NUNOMURA, R.C.S.; MACHADO, M.B.; SANCHES, E.A. *Lippia organoides* essential oil: An efficient alternative to control *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. **Industrial Crops & Products**, v. 111, p. 292–297, 2018.
- MISNI, N.; NOR, Z.M.; AHMAD, R. New candidates for plant-based repellents against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 32, n. 2, p. 117–123, 2016.
- NISHIKAWA, D.O.; ZAGUE, V.; PINTO, C.A.S.O.; VIEIRA, R.P.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R.; BABY, A.R. Avaliação da estabilidade de máscaras faciais peel-

off contendo rutina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.2, p.227-232, 2007.

SANTANA, H.T.; TRINDADE, F.T.T.; STABELI, R.G.; SILVA, A.A.E.; MILITÃO, J.S.L.T.; FACUNDO, V.A. Essential oils of leaves of Piper species display larvicidal activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Campinas**, v.17, n.1, p.105-111, 2015.

SARRAZIN, S.L.F.; SILVA, L.A.; OLIVEIRA, R.B.; RAPOSO, J.D.A.; SILVA, J.K.R.; SALIMENA, F.R.G.; MAIA, J.G.S.; MOURÃO, R.H.V. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Lipids in Health and Disease**, v.14, p.145, 2015.

SARRAZIN, S.L.F.; SILVA, L.A.; ASSUNÇÃO, A.P.F.; OLIVEIRA, R.B.; CALAO, V.Y.P.; SILVA, R.; STASHENKO, E.E.; MAIA, J.G.S.; MOURÃO, R.H.V. Antimicrobial and Seasonal Evaluation of the Carvacrol-Chemotype Oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Molecules**, v.20, p.1860-1871, 2015.

SARRAZIN, S.L.F.; SILVA, L.A.; ASSUNÇÃO, A.P.F.; OLIVEIRA, R.B.; CALAO, V.Y.P.; SILVA, R.; STASHENKO, E.E.; MAIA, J.G.S.; MOURÃO, R.H.V. Antimicrobial and Seasonal Evaluation of the Carvacrol-Chemotype Oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Molecules**, v.20, p.1860-1871, 2015.

SILVA, M.F.R.; BEZERRA-SILVA, P.C.; LIRA, C.S.; ALBUQUERQUE, B.N.L.; AGRA NETO, A.C.; PONTUAL, E.V.; MACIEL, J.R.; PAIVA, P.M.G.; NAVARRO, D.M.A.F. Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae). **Experimental Parasitology**, v. 165, p. 64-70, 2016.

SILVA, R.C.; MILET-PINHEIRO, P.; SILVA, P.C.B.; SILVA, A.G.; SILVA, M.V.; NAVARRO, D.M.A.F.; SILVA, N.H. (E)-Caryophyllene and α -Humulene: *Aedes aegypti* Oviposition Deterrents Elucidated by Gas Chromatography-Electrophysiological Assay of Commiphora leptophloeos Leaf Oil. **PLoS ONE**, v.10, n.12, 2015.

SILVA, L.C.; CARVALHEDO, L.F.; VIEIRA, J.P.C.; SILVA, L.A.C.; MONTEIRO, O.S.; CARMO, L.H.A. Delineamento de formulações cosméticas com óleo essencial de *Lippia gracilis* Schum (Alecrim-de-Tabuleiro) de origem amazônica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.36, n.2, p. 319-326, 2015.

SUMITHA, K.V.; THOPPIL, J.E. Larvicidal efficacy and chemical constituents of *O. gratissimum* L. (Lamiaceae) essential oil against *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 115, p. 673–680, 2016.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VELASCO, M.V.R.; MACIEL, C.P.M.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.S.O.; CONSIGLIERI, V.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Desenvolvimento e Teste Preliminar da Estabilidade de formulações cosméticas acrescidas de extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.2, p. 181-196, 2008,

VILLAS BOAS, G.K.; GADELHA, C.A.G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros:

bases para a discussão de uma política nacional. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, no. 6, p. 1463-1471, 2007.

WANG, Z.; PERUMALSAMY, H.; WANG, M.; SHUC, S.; AHNC, Y. Larvicidal activity of *Magnolia denudata* seed hydrodistillate constituents and related compounds and liquid formulations towards two susceptible and two wild mosquito species. **Pest Management Science**, v. 72, p. 897–906, 2016.

ZARA, A.L.S.A.; DOS SANTOS, S.M.; FERNANDES-OLIVEIRA, E.S.; CARVALHO, R.G.; COELHO, G.E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.25, n.2, p.391-404, 2016.

4 CONCLUSÃO

- A prospecção científica e tecnológica relatou uma escassez de patentes que tratam da atividade larvicida e repelente dentro da temática do trabalho;
- O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação e caracterizado através de cromatografia gasosa, apresentando como componentes majoritários, os monoterpenos carvacrol e timol;
- O óleo essencial isolado de *L. origanoides* H.B.K e seus componentes majoritários apresentaram atividade larvicida contra *A. aegypti*.
- Nos bioensaios de repelência do óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K e de seus constituintes majoritários, nas concentrações de 1000 µg/mL e 500 µg/mL foi demonstrando índice de repelência de 100% e atividade inseticida ao fim do teste.
- As formulações de complexos de inclusão do óleo com β-ciclodextrina foi observada a potenciação da atividade larvicida contra *A. aegypti*.
- As formulações das formas farmacêuticas obtidas de óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K, incorporadas em excipientes a base de fosfolípidos de soja (Lecigel®) apresentou melhor resultado nos testes de estabilidade preliminar quando comparada com as formulações produzidas em excipientes a base de hidroxietilcelulose (Natrosol®).
- As formulações F2 e F3 aprovadas nos testes de estabilidade preliminar, apresentaram atividades repelente e inseticida contra fêmeas de *A.aegypti* de forma dose dependente.
- Portanto ficou notório o potencial do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K para o desenvolvimento de produtos com aplicabilidade larvicida, repelentes e inseticida para atuar no combate do mosquito *A.aegypti*.

ANEXOS

Anexo I

| | | |
|--|--|---|
|  | MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS |  |
| <small>Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550 Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceoapi@ufpi.edu.br</small> | | |

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"Desenvolvimento de produtos inseticidas e repelentes a partir do óleo essencial de *Lippia origanoides* e seus derivados contra *Aedes aegypti*",** registrada nº 301/17, sob a responsabilidade da Profa. Dra. **MARIA DAS GRAÇAS FREIRE DE MEDEIROS** do Departamento de Farmácia/ CCS/ UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **05/05/2017**.

| | |
|-------------------------|--|
| Finalidade | <input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica |
| Vigência da Autorização | Setembro 2017 à Fevereiro 2018 |
| Espécie/Linhagem/raça | Aves |
| Nº de Animais | 12 |
| Peso/ Idade | --- |
| Sexo | Fêmeas |
| Origem | Aviário- Núcleo de Entomologia do Piauí- Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal do Piauí. |

Teresina, 05 de Maio de 2017.


 Prof^o. Ivete L. de Mendonça
Coord. de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora

Anexo II



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de produtos inseticidas e repelentes a partir do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. contra *Aedes aegypti*.

Pesquisador: Maria das Graças Freire de Medeiros

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 74885917.5.0000.5214

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

Patrocinador Principal: Universidade Federal do Piauí - UFPI

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.308.998

Apresentação do Projeto:

A presente pesquisa propõe o desenvolvimento de produtos a partir do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. de utilidade inseticida e repelente para atuar no combate ao *A. aegypti*. O mosquito *Aedes aegypti* é responsável pela transmissão de uma das doenças emergentes de maior repercussão nos últimos anos, a dengue. Este mosquito também é capaz de transmitir outras arboviroses como, zika, chikungunya e febre amarela. Inseticidas sintéticos são amplamente utilizados devido ao seu baixo custo, eficiência e toxicidade aos invertebrados, no entanto esta utilização exacerbada levou à uma resistência dos mosquitos. Uma alternativa eficiente seria o desenvolvimento de inseticidas a partir de compostos naturais por serem biodegradáveis e produzirem menos efeitos adversos a organismos não-alvo e ao meio ambiente. Óleos essenciais são compostos de plantas aromáticas que possuem atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, além de propriedades medicinais. A *Lippia origanoides* H.B.K. (*Verbanacea*) é uma planta aromática encontrada no nordeste e região central da América do Sul e amplamente utilizada para fins medicinais. No Brasil, podemos encontrá-la no bioma de Cerrado. O óleo essencial (OE) extraído das folhas de *L. origanoides* apresenta atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e acaricida.

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br



Continuação do Parecer: 2.308.998

Objetivo da Pesquisa:

Desenvolver produtos inseticidas e repelentes a partir do óleo essencial de Lippia origanoides e seus derivados contra Aedes aegypti.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A pesquisa poderá oferecer riscos de grau leve aos pesquisadores, bem como aos voluntários participantes, sendo estes riscos apresentados no

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As colônias serão criadas em laboratórios, portanto se apresentarão hígidos, livres de

patógenos. Se algum dos participantes ou pesquisadores desta pesquisa apresentarem algum tipo reação alérgica, seja pela picada do mosquito ou

pela administração do repelente, estes serão encaminhados imediatamente ao hospital mais próximo e será prestada toda assistência necessária

por parte dos pesquisadores responsáveis pela pesquisa.

Benefícios:

Espera-se contribuir com a literatura sobre a utilização e otimização das atividades biológicas atribuídas aos óleos essenciais;

Os resultados da pesquisa poderão posteriormente ser base de estudos e numa perspectiva futura, a implementação deste composto de origem

natural como produto repelente;

O desenvolvimento de inovação científica em estudos relativos a produtos naturais;

O fortalecimento da pesquisa científica e difusão no meio acadêmico dos conhecimentos gerados na UFPI.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de apresentação obrigatória conferidos pelo secretário.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de pesquisa apto a ser desenvolvido.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br



**UFPI - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PIAUÍ - CAMPUS
MINISTRO PETRÔNIO**



Continuação do Parecer: 2.308.998

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|-------------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_971289.pdf | 26/09/2017 09:24:54 | | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | PROJETO_COMITE_JANSY.pdf | 26/09/2017 09:24:13 | Maria das Graças Freire de Medeiros | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.pdf | 26/09/2017 09:23:51 | Maria das Graças Freire de Medeiros | Aceito |
| Outros | TCUD.pdf | 31/08/2017 09:36:15 | Maria das Graças Freire de Medeiros | Aceito |
| Outros | Termo_de_Confidencialidade.pdf | 31/08/2017 09:33:12 | Maria das Graças Freire de Medeiros | Aceito |
| Outros | carta_de_encaminhamento.pdf | 31/08/2017 09:32:01 | Maria das Graças Freire de Medeiros | Aceito |
| Outros | Curriculo_lattes_pesquisador.pdf | 31/08/2017 09:29:09 | Maria das Graças Freire de Medeiros | Aceito |
| Orçamento | ORCAMENTO.pdf | 30/08/2017 09:08:33 | Maria das Graças Freire de Medeiros | Aceito |
| Cronograma | CRONOGRAMA.pdf | 30/08/2017 09:03:32 | Maria das Graças Freire de Medeiros | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Autorizacao_institucional.pdf | 30/08/2017 08:47:30 | Maria das Graças Freire de Medeiros | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | declaracao_dos_pesquisadores.pdf | 30/08/2017 08:46:57 | Maria das Graças Freire de Medeiros | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_de_rosto_assinada.pdf | 30/08/2017 08:42:05 | Maria das Graças Freire de Medeiros | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

TERESINA, 02 de Outubro de 2017

Assinado por:
Herbert de Sousa Barbosa
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-650
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br