



Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical
Mestrado e Doutorado
UNIFAP / EMBRAPA-AP / IEPA / CI-Brasil



TAIRES PENICHE DA SILVA

OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DA
NANOEMULSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.
SOBRE *Aedes aegypti* E *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: CULICIDAE)

MACAPÁ, AP

2017

TAIRES PENICHE DA SILVA

OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DA NANOEMULSÃO DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. SOBRE *Aedes aegypti* E *Culex*
quinquefasciatus (DIPTERA: CULICIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical da Universidade Federal do Amapá como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto

Co-orientador: Prof. Dr. Caio Pinho Fernandes

MACAPÁ, AP
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

615.321

S586o Silva, Taires Peniche da.

Obtenção e avaliação da atividade larvicida da nanoemulsão do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. Sobre *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) / Taires Peniche da Silva; orientador, Raimundo Nonato Picanço Souto. – Macapá, 2017.

82 f.

Dissertação (mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical.

1. Larvicida. 2. Doenças tropicais. 3. Plantas medicinais. I. Souto, Raimundo Nonato Picanço, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

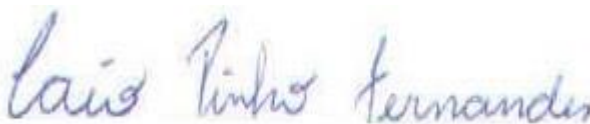
TAIRES PENICHE DA SILVA

OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DA NANOEMULSÃO DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. SOBRE *Aedes aegypti* E *Culex*
quinquefasciatus (DIPTERA: CULICIDAE)



Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto

Universidade Federal do Amapá -UNIFAP



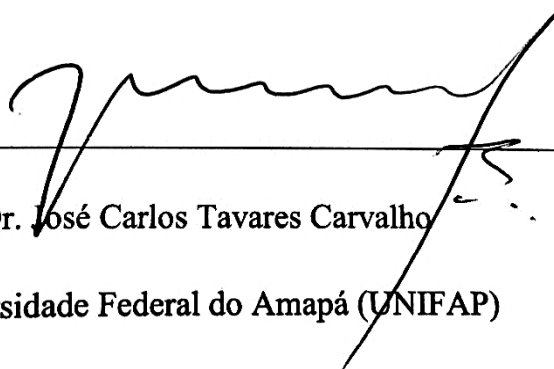
Dr. Caio Pinho Fernandes

Universidade Federal do Amapá -UNIFAP



Dr. Ricardo Adaime

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa



Dr. José Carlos Tavares Carvalho

Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)

Aprovada em 18 de abril de 2017, Macapá, AP, Brasil

Dedico este trabalho aos meus
familiares, que são minha força para
seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus que me abençoou com amor, sabedoria e saúde para chegar até aqui.

Aos meus pais, Estevam e Marcelina, por todo apoio, amor e por todas as preces.

Ao Igor, que não mede esforços para me ajudar e apoiar. Muito obrigada pelos momentos de alegria.

Aos meus irmãos, pelos conselhos, risos e cumplicidade.

Aos demais familiares que depositaram em mim seus pensamentos positivos e que torceram por este final.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Raimundo Nonato, por todo conhecimento passado, pela compreensão e paciência com a qual me orientou nestes dois anos.

Ao Prof. Dr. Caio Pinho Fernandes, pela incrível dedicação que destinou a mim durante este processo.

Aos amigos da turma PPGGIO 2015, Adriano Ferreira, Aline Ribeiro, Jéssica Alves, Hélio Ruy, Daniel Valentim, Yuri Silva, Omar Landázuri, Sigelfrann Soares e Victor Rodriguez, uns já trazia da graduação, outros, estes longos dois anos se ocuparam de nos fazer amigos e reconhecer no rosto de cada um as dificuldades e as vitórias de transpassar diversos obstáculos.

Ao Jonatas Lobato, que não ofereceu somente ajuda no desenvolvimento da dissertação; ofereceu paciência e amizade. Obrigada pelos bons momentos, boas risadas, por tudo!

Aos amigos, Keison, Felipe, Ivan, Renato, Bayron, Telma, Tânia, Eric, Jéssica, Gabi, Vivi, Michelle, Angélica, Natália, Felipe, Igor Fernando, Mayerli, Karen, Cele, obrigada pelas conversas e carinho, principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos amigos do Arthrolab, Camila Gama, Vivian, Camila Mendes, Bruna, Karen, Inana, Tiago, Érika e Ricardo.

Ao Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica – NANOFITO. Em especial ao professor Rodrigo Cruz, Ícaro Sarquis, Frankli Amaral, Fernanda Borges, Antônio e Letície Pessoa, muito obrigada pela ajuda e companhia.

Ao Laboratório de Pesquisa em Fármacos, pelos equipamentos para realização de algumas análises.

À Unifap e ao PPGBIO, pela oportunidade de estar concluindo o mestrado.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigada!

PREFÁCIO

Esta dissertação está dividida em dois capítulos (artigos), seguindo o formato alternativo proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO) e segue normas da Ecology até o final da introdução geral. O primeiro capítulo, intitulado **“Novel aqueous nanoemulsion prepared with *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. essential oil: a promising larvicidal agent in integrated control practices against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)”** aborda a ação larvicida da nanoemulsão de *H. suaveolens* contra larvas do mosquito *Ae. aegypti*, vetor da dengue, chikungunya e zika, com estimativa de concentração letal (CL₅₀), e seguiu as normas do periódico Parasitology Research, para o qual foi previamente submetido. No segundo capítulo, intitulado **“Efeito larvicida da nanoemulsão do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. contra *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)”** foi realizado estudo sobre o Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo requerido (EHLr) da nanoemulsão do óleo essencial de *Hyptis suaveolens*, avaliação larvicida sobre *Cx. quinquefasciatus*, estimativa de CL₅₀ e CL₉₀ e estudo morfológico das larvas, o mesmo foi formatado para ser submetido ao periódico Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.

RESUMO

Peniche, Taires. OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DA NANOEMULSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. SOBRE *Aedes aegypti* E *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: CULICIDAE). Macapá, 2017. Dissertação (Mestre em Biodiversidade Tropical) – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá.

O interesse crescente nas alternativas “ecofriendly” do controle de vetores é observado no mundo inteiro. Neste contexto, as nanoemulsões aquosas aparecem como sistemas promissores de liberação de agentes larvicidas bioativos, incluindo produtos naturais de baixa polaridade, de origem vegetal. Nosso estudo teve como objetivo obter uma nanoemulsão óleo em água utilizando-se o óleo essencial extraído de folhas de *Hyptis suaveolens* e avaliar seu potencial larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. A análise por cromatografia gasosa revelou que o 1,8 - cineol foi a principal substância do óleo essencial, correspondendo a 26,34% da composição relativa. A segunda análise mostrou predominância de monoterpenos com TR inferior a 15 minutos. Observou-se baixo tamanho médio de gotículas, indicando a formação de nanoemulsões. Os valores estimados de LC₅₀ e LC₉₀ após 24h foram respectivamente 202,66 (152,508 - 321,745) ppm e 339,618 (253,747-616,336) ppm para *Aedes aegypti*. A ação larvicida para *Culex quinquefasciatus* demonstrou valores de CL₅₀ = 102,41 (77,5253 – 149,14) ppm e 70,8105 (44,5282 – 109,811)ppm, para 24 e após 48 horas, respectivamente. A mortalidade no controle com tensoativo ficou abaixo de 9%. As imagens de micrografia de varredura mostraram alterações no tegumento das larvas. A ausência de aquecimento na preparação da nanoemulsão e utilização de um agitador magnético convencional pode ser considerada uma vantagem em termos de custos na preparação. Além disso, os tensoativos que foram utilizados são biodegradáveis, não sendo utilizado solvente orgânico, resultando em um sistema nanoestruturado “verde”. Portanto, o presente estudo fornece informações valiosas sobre a nanobiotecnologia de agentes larvicidas de origem vegetal, abrindo perspectivas para a preparação viável destes novos sistemas com grande potencial para serem utilizados em práticas integrativas de controle de vetores de doenças.

Palavras-chave: Nanotecnologia; chikungunya; filariose; dengue; zika.

ABSTRACT

Peniche, Taires. LARVICIDAL ACTIVITY NANOEMULSION *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. OF ESSENTIAL OIL AGAINST *Aedes aegypti* AND *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: CULICIDAE). Macapá, 2017. Dissertação (Mestre em Biodiversidade Tropical) – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá.

Growing interest in ecofriendly alternatives of vector control is observed worldwide. On this context, aqueous nanoemulsions appear as promising delivery-systems of bioactive larvicidal agents, including low polar natural products from plant origin. Our study aimed to generate an oil in water nanoemulsion using the essential oil extracted from the leaves of *Hyptis suaveolens* and evaluate its larvicidal potential against *Aedes aegypti* larvae. Gas chromatograph analysis revealed that 1,8 - cineole was the major compound, corresponding to 26.34% of the relative composition. The second analysis showed a predominance of monoterpenes with RT lower than 15 minutes. A low mean droplet size, which remained around 150 nm, was observed even after seven days of storage. The average size of droplets was ≤ 200 nm. The estimated values of LC₅₀ and LC₉₀ after 24h were 202.66 (152.508 - 321.745) ppm and 339.618 (253.747-616.336) ppm for *Aedes aegypti*, respectively. The larvicidal action against *Culex quinquefasciatus* showed values of LC₅₀ = 102.41 (77.5253 - 149.14) ppm and 70.8105 (44.5282 - 109.811) ppm, for 24 and 48 hours, respectively. The mortality in the control with surfactant was below 9%. The scanning micrographs showed changes in the integument of the larvae. The absence of a heating step on the nanoemulsion preparation and utilization of a conventional magnetic stirrer can be considered an advantage in terms of costs of the preparation. Moreover, the surfactant which was used is biodegradable and no organic solvent was used, making this a green nanostructure system. Thus, the present study provides valuable information concerning nanobiotechnology of larvicidal agents from plant origin, opens perspectives for viable preparation of these novel systems with great potential to be used in integrative practices of disease vector control.

Keywords: Nanotechnology; chikungunya; filariais; dengue; zika.

ILUSTRAÇÕES

Figura 1 <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (A) macho e (B) fêmea. Setas indicam as antenas diferentes e tamanho dos palpos.....	14
Figura 2 <i>Culex quinquefasciatus</i> (A) macho e (B) fêmea. Setas indicam as antenas diferentes e tamanho dos palpos.	15
Figura 3 <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit..	20
Figura 4- Prancha botânica de <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit.....	21

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1. DIPTERA: CULICIDAE	13
1.1.1. <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> Linnaeus.....	13
1.1.2. <i>Culex quinquefasciatus</i> Say.....	15
1.3. ÓLEOS ESSENCIAIS E NANOEMULSÕES	16
1.4. PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL COM ATIVIDADE BIOLÓGICA SOBRE CULICIDAE.....	18
1.5. <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit. (Lamiaceae)	19
2. HIPÓTESE.....	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. OBJETIVO GERAL.....	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4. REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO 1 - Novel aqueous nanoemulsion prepared with <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit. essential oil: a promising larvicidal agent in integrated control practices against <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae)	32
CAPÍTULO 2 – Efeito larvicida da nanoemulsão do óleo essencial de <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit. contra <i>Culex quinquefasciatus</i> (Diptera: Culicidae)	54
5. CONCLUSÕES.....	81
ANEXO 1. CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO	82

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. DIPTERA: CULICIDAE

Diptera é uma das maiores e mais diversas ordens de insetos e reúnem moscas (Brachycera) e mosquitos (Nematocera: Culicidae). Os dípteros são reconhecidos por peculiaridades na morfologia externa, como a atrofiação das asas posteriores a balancins ou halteres, são insetos holometábolos e seu estágio larval geralmente apresenta aparência vermiforme, não possuindo pernas verdadeiras (Gullan and Cranston 2007). Os adultos possuem o corpo dividido em metâmeros, agrupados em três regiões distintas: cabeça, tórax e abdômen (Triplehorn and Johnson 2011).

Culicidae é uma família numerosa e cosmopolita, conhecidos de forma geral como mosquitos, pernilongos, muriçocas e carapanãs. Possuem uma probóscide fina e peças bucais alongadas. As larvas e pupas são aquáticas, sendo mais ativas em águas lentas. A hematofagia ocorre pelas fêmeas, que necessitam de sangue para a maturação dos ovos, enquanto os machos frequentemente alimentam-se de néctar (Carvalho et al. 2012).

Mosquitos são objetos de muitos estudos, sobretudo, porque muitos desempenham um papel relevante como transmissores ou vetores de patógenos que causam doenças, sendo uma ameaça para milhões de pessoas (Carvalho et al. 2012). São os responsáveis por parasitoses como malária e filariose, e diversas arboviroses amplamente distribuídas no mundo, tais como, febre amarela, dengue, chikungunya e outras doenças virais (Anjali et al. 2012, Seo et al. 2012, Benelli 2015). Gêneros como *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*, vetores da malária, dengue e filariose, respectivamente, são importantes para a entomologia médica, sendo considerados problemas de saúde pública (Dharmagadda et al. 2005).

1.1.1. *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus

O gênero *Aedes* Meigen 1818 está amplamente distribuído em todo o mundo, principalmente em regiões neotrópicas. *Ae. aegypti* apresenta cor escura, com variações próximas à coloração marrom. As fêmeas apresentam palpos curtos não ultrapassando o tamanho da probóscide. Já os machos podem apresentar esses apêndices curtos ou longos e normalmente suas antenas são plumosas com flagelômeros distais mais longos que os demais (Forattini 2002) (Figura 1). Esta espécie está diretamente ligada ao ambiente antrópico, o que resulta em importância epidemiológica por ser vetor de agentes etiológicos causadores da febre amarela urbana, dengue, febre chikungunya e vírus Zika (ZIKV).



Figura 1 - *Aedes (Stegomyia) aegypti* (A) macho e (B) fêmea. Setas indicam as antenas diferentes e tamanho dos palpos. Fonte: Próprio autor.

A dengue tem sido relatada como uma das mais importantes arboviroses no mundo, sendo estimados mais de 50 milhões de casos por ano e mais 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco para a doença (WHO 2012). É uma arbovirose causada por sorotipos de vírus distintos (DENV – 1, 2, 3 e 4) (Maciel-de-Freitas et al. 2014). É endêmica das regiões tropicais e subtropicais, onde o principal vetor são fêmeas do mosquito do gênero *Aedes* e subgênero *Stegomyia* (Braga and Valle 2007). No Brasil o vetor é *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Cavalcanti et al. 2004) que causou 1.500.535 casos da doença no país em 2016 (BRASIL 2017a).

Aedes aegypti L. também é um dos vetores da febre chikungunya (CHIKV), doença que desde 2013 tem sido reportada na América do Sul (Fischer and Staples 2014). Em 2015, no Brasil, foram notificados 20.661 casos autóctones suspeitos de febre de chikungunya, e destes, 7.823 foram confirmados (BRASIL 2016b). Em 2016, houve um registro de 151.318 casos, chegando a 196 óbitos por febre chikungunya e distribuídos em 13 estados (BRASIL 2017a). Além da febre chikungunya, no mês de março de 2015 foi notificado o primeiro caso de infecção pelo vírus zika (ZIKV) no Brasil. O governo declarou emergência de saúde pública nacional devido ao aumento dos casos de microcefalia em crianças nascidas de mães infectadas com o vírus zika (Dyer 2015). Segundo o Ministério da Saúde, em 2015 foram registrados 3.530 casos de microcefalia com suspeita de infecção pelo vírus Zika, distribuídos em 21 unidades federadas e 724 municípios (BRASIL 2016a). Em 2016, houve um aumento para 10.867 casos notificados, sendo 2.366 confirmados e resultando em 200 óbitos por microcefalia, distribuídos em 1.837 municípios brasileiros (BRASIL 2017b).

Apesar dos esforços para o controle de *A. aegypti*, os órgãos de saúde pública, organizações, institutos de pesquisas e campanhas comunitárias, o combate ao vetor tem se mostrado um desafio (Maciel-de-Freitas et al. 2014).

1.1.2. *Culex quinquefasciatus* Say

Em sua morfologia, as fêmeas de *Culex* têm a probóscide longa e nos machos os palpos maxilares são mais longos que a probóscide. As antenas são filiformes, mais curtas e consideravelmente plumosas em machos (Figura 2). As fêmeas têm preferência por ambientes com alto teor de matéria orgânica para postura, lugares com água parada e poluída, o que facilita a alimentação e desenvolvimento dos estágios larvais (Forattini 2002). *Culex quinquefasciatus* é o vetor do helminto *Wuchereria* e outros gêneros que causam a filariose linfática, uma doença crônica amplamente distribuída em regiões tropicais e neotropicais (Veerakumar et al. 2014). Mais de 120 milhões de pessoas são infectadas por parasitos da filariose no mundo e cerca de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas de risco para a doença. O nematoide *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae) é o agente etiológico da doença na África e nas Américas (WHO 2013).

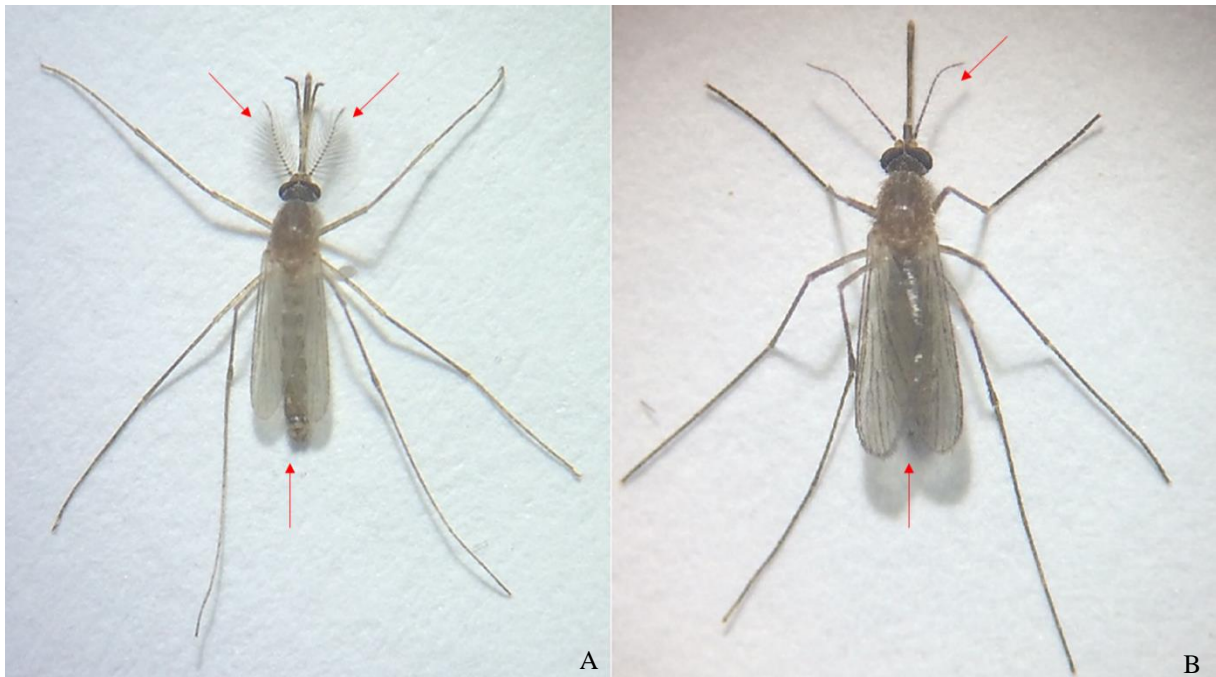


Figura 2 - *Culex quinquefasciatus* (A) macho e (B) fêmea. Setas indicam as antenas diferentes e tamanho dos palpos. Fonte: Próprio autor.

A espécie *Cx. quinquefasciatus* é sinantrópica, bem adaptada à ambientes antropizados e peridomiciliares (Amorim et al. 2013). No Brasil, é vetor da filariose linfática, também

conhecida como elefantíase (Fontes et al. 2012, Korte et al. 2013, Brandao et al. 2015) e do vírus Oropouche (OROV) que causa febre Oropouche. Esta é uma arbovirose presente principalmente na região amazônica (Figueiredo 2007), recentemente encontrada também em Mato Grosso (Cardoso et al. 2015). A filariose linfática tem distribuição exclusivamente urbana no Brasil (Rocha and Fontes 1998, Simonsen and Mwakitalu 2013), e já foi notificada em cidades do Pará, Amazonas, Alagoas, Bahia e Rio Grande do Sul. Hoje se restringe à região Nordeste, no estado de Pernambuco, com grandes números de casos notificados. O governo criou um plano para erradicação da doença, que visa o tratamento dos pacientes crônicos e o controle do vetor das microfilárias (OPAS/OMS 2014). Também são transmissores de arboviroses, entre elas o vírus do oeste do Nilo. Além disso, estudos para investigar o potencial desse mosquito como vetor do vírus zika, o qual pode estar associado a microcefalia no Brasil, tem sido realizado (Fernandes et al. 2016, Evans et al. 2017, Hart et al. 2017). A distribuição desse inseto vetor é concentrada em países do hemisfério sul, entretanto, estão presentes também na América do norte e sul da Ásia (Samy et al. 2016).

A Organização Mundial da Saúde relata que doenças transmitidas por vetores representam cerca de 16% da carga global de doenças. Muitas são doenças tropicais ou arboviroses, consideradas problemas de saúde pública e havendo uma grande necessidade de controle de seus vetores (WHO 2015). As arboviroses são um desafio para a saúde pública em regiões tropicais em todo o mundo. O desmatamento, a urbanização acelerada e a falta de saneamento básico podem contribuir para a proliferação de insetos vetores e disseminação de arbovírus no Brasil (Brandao et al. 2015, Cardoso et al. 2015).

1.3. ÓLEOS ESSENCIAIS E NANOEMULSÕES

Os óleos essenciais são produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste a vapor d' água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (Simões and Spitzer 2010). São misturas complexas de substâncias voláteis de baixo peso molecular e na maioria das vezes possuem odor forte. São constituídos principalmente por terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) (Bettioli and Morandi 2009). Outros componentes proporção podem são encontrados, tais como, fenilpropanoídes, óxidos aromáticos, éteres, álcoois, ésteres, aldeídos e cetona. Esses constituintes voláteis dos óleos determinam o aroma do vegetal, que pode ser obtido de partes não-lenhosas da planta (Batish et al. 2008) ou extraídos de flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, madeira, frutos e raízes (Burt 2004).

As plantas utilizam os óleos essenciais na natureza para fins de proteção, exercendo diversas ações biológicas de acordo com as necessidades do vegetal, dentre elas, atividade

bactericida, antifúngica, antiviral, efeitos em herbívoros através da redução da palatabilidade, atração ou repelência de insetos (Bakkali et al. 2008). Devido às suas características e propriedades, os óleos essenciais têm sido aplicados com resultados satisfatórios em diversos estudos como pesticidas naturais, conferindo menos riscos ao meio ambiente e ao ser humano (Amer and Mehlhorn 2006).

Óleos essenciais podem atuar como pró-oxidantes e afetar organelas (mitocôndrias) e a membrana celular interna de eucariotos. Servem como alternativa aos produtos químicos sintéticos e ajudam a manter o equilíbrio ecológico (Bakkali et al. 2008), controlando vetores de patógenos, por exemplo. De acordo com Isman (2000), estudos apontam atividades biológicas neurotóxicas destes óleos essenciais contra insetos.

Produtos do metabolismo secundário de plantas e derivados deles, como óleos essenciais, podem ser potencializados através do desenvolvimento de sistemas nanoestruturados (Vianna Santos et al. 2014).

Segundo McClements (2012), nanoemulsões consistem de dois líquidos imiscíveis dispersos um no outro sob a forma de pequenas gotículas esféricas ($r < 100$ nm). Normalmente são formadas utilizando-se óleo, água e tensoativos, que ajudam a garantir a estabilidade. São cineticamente estáveis, tem baixa viscosidade e a estabilidade é determinada pelo método de preparação (Solans et al. 2005, Wang et al. 2007, Sugumar et al. 2014). Esses sistemas coloidais termodinamicamente instáveis são normalmente formados por gotículas oleosas em meio aquoso, sendo nanoemulsões do tipo óleo em água nesse caso (Rao and McClements 2012). De acordo com Tadros et al. (2004), as nanoemulsões são utilizadas na indústria de cosméticos e farmacêutica, principalmente devido ao tamanho reduzido de suas gotículas. Essa característica permite diversas vantagens, como maior poder de penetração na pele, rápida absorção de seus princípios ativos e distribuição uniforme sobre os substratos. Segundo Gutiérrez et al. (2008), novas aplicações estão sendo desenvolvidas para utilização das nanoemulsões como produtos de consumo.

As nanoemulsões a base de óleos naturais são acessíveis, economicamente viáveis e possuem menor toxicidade em relação aos organofosforados. Portanto, podem ser uma alternativa aos inseticidas sintéticos no controle de insetos vetores, principalmente mosquitos (Anjali et al. 2012). O fato dos produtos derivados de plantas serem biodegradáveis e potencialmente menos tóxicos para organismos não-alvo (Dias et al. 2015) tornam essas nanoemulsões promissoras como larvicidas (Cavalcanti et al. 2004, Kanis et al. 2012, Oliveira et al. 2016), ovicidas (Tennyson et al. 2015) e repelentes (Dharmagadda et al. 2005, Solomon et al. 2012).

1.4. PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL COM ATIVIDADE BIOLÓGICA SOBRE CULICIDAE

As plantas de diferentes famílias têm sido alvo de muitos estudos, pois produzem substâncias derivadas do seu metabolismo secundário, tais como terpenoides, fenólicos, alcaloides, glicosídeos e outros, que são considerados promissores para o controle de mosquitos e outros insetos vetores (Gullan and Cranston 2007, Bakar et al. 2012, Yadav et al. 2014). Estes constituintes fitoquímicos desempenham funções importantes nas interações da planta com o ambiente em que está inserida, a exemplo da relação planta-inseto, na qual as plantas liberam substâncias químicas que apresentam ação repelente ou atrativa aos insetos, dependendo da necessidade do vegetal (Verpoorte 1998).

As substâncias oriundas do metabolismo secundário de plantas estão sendo testadas em espécies de insetos vetores para fins principalmente de repelência e larvicida. Plantas aromáticas, principalmente das famílias Myrtaceae e Lamiaceae, têm sido utilizadas para repelir insetos (Isman 2000).

Plantas nativas do Brasil já foram testadas para avaliação das suas atividades biológicas, principalmente larvicida contra *Ae. aegypti*, com óleos de *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae), *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae), *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae), *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) e o extrato de *Annona glabra* L. (Annonaceae) para fins de controle de vetores (Mendonça et al. 2005). Além disso, nanoemulsões das espécies *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae) (Oliveira et al. 2016) e *Copaifera duckei* Dwyer (Fabaceae) (copaíba) (Rodrigues et al. 2014) foram testadas com resultados muito satisfatórios como larvicidas, com o objetivo de atuarem como potenciais inseticidas naturais, eficazes para o controle do vetor da dengue, chikungunya, vírus zika e febre amarela.

Freitas et al. (2010) avaliaram a atividade larvicida de plantas que são habitualmente utilizadas com fins medicinais, como *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis* e *Alpinia speciosa* em *Ae. aegypti*. A nanoemulsão do óleo essencial de *R. officinalis* (Lamiaceae) foi testada por Duarte et al. (2015) sobre larvas de *Ae. aegypti* e resultados satisfatórios de mortalidade foram obtidos, demonstrando o potencial de inseticidas naturais como alternativa aos sintéticos. Sugumar et al. (2014) relataram a avaliação da nanoemulsão de óleo essencial de eucalipto em larvas do vetor da filariose, *Culex quinquefasciatus*. Adicionalmente, Anjali et al. (2012) e Oliveira et al. (2017), avaliaram a ação larvicida positiva de nanoemulsões de *Azadirachta indica* e *Pterodon emarginatus*, respectivamente, em larvas do vetor da filariose.

Espécies diferentes têm sido combinadas para avaliar o potencial de atividade em larvas de vetores. Extratos de *Andrographis lineata* e *Andrographis paniculata* (Acanthaceae) foram avaliados individualmente em imaturos de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, porém os resultados foram mais satisfatórios quando os extratos foram misturados (Renugadevi et al. 2013). Arboviroses transmitidas por vetores causam graves problemas para a saúde pública nos países em que são endêmicas. Portanto, esforços em trabalhos com produtos naturais para controle de larvas de insetos vetores são promissores (Mathew et al. 2009), como no manejo integrado de vetores.

1.5. *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae)

O gênero *Hyptis* Jacq. pertence à família Lamiaceae. Muitos gêneros dessa família são utilizados para fins medicinais, principalmente devido aos seus óleos essenciais (Govindarajan et al. 2012), sendo a grande maioria das espécies altamente aromáticas. Ele é composto por cerca de 400 espécies e é cosmopolita, ocorrendo principalmente nas Américas (Peerzada 1997). É utilizado na medicina tradicional para tratar doenças gastrointestinais, cólicas, infecções da pele e muitas outras (Azevedo et al. 2001). Possui muitas espécies ricas em óleos essenciais com substâncias de potencial utilização para a indústria farmacêutica (Falcão et al. 2003).

A espécie *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Figura 3) é uma planta de crescimento rápido, considerada invasora e está distribuída em regiões tropicais e subtropicais, não ocorrendo em regiões mais frias (Azevedo et al. 2001). Apresenta um aroma característico mentolado e é utilizada como repelente de mosquitos em muitas regiões da África, onde é chamada de hortelã de arbusto, sendo queimada dentro das casas (Abagli et al. 2012). No Brasil é conhecida como bamburral, alfazema-de-caboclo e alfavaca-brava (Almeida and de Albuquerque 2002, Agra et al. 2008).

Estudos com o extrato ou o óleo essencial de *H. suaveolens* têm demonstrado propriedades antifúngicas (Moreira et al. 2010) e bactericida, especialmente contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Joy et al. 2008, Ríos Tesch et al. 2015). É um óleo constituído principalmente por terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) 1,8-cineol, eugenol, β -cariofileno e β -pineno (Peerzada 1997, McNeil et al. 2011).

A eficácia de *H. suaveolens* foi descrita para atividade repelente contra alguns artrópodes (Tripathi and Upadhyay 2009, Soares et al. 2010) e larvicida contra mosquitos do gênero *Aedes* (Amusan et al. 2006, Conti et al. 2012), *Culex* e *Anopheles* (Abagli et al. 2012).

A utilização do óleo essencial têm sido principalmente em insetos vetores da malária, dengue, febre amarela (Amusan et al. 2006) e chikungunya (Yadav et al. 2015).

As propriedades bioativas de *H. suaveolens*, em insetos apenas estão descritas para os extratos e óleo essencial e ainda não há registros avaliação de uma nanoemulsão. Portanto, existe a necessidade de mais pesquisas com a derivados inovadores da espécie, principalmente para fins de controle de insetos vetores de arboviroses e doenças tropicais.



Figura 3 - *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. Fonte: Próprio autor.

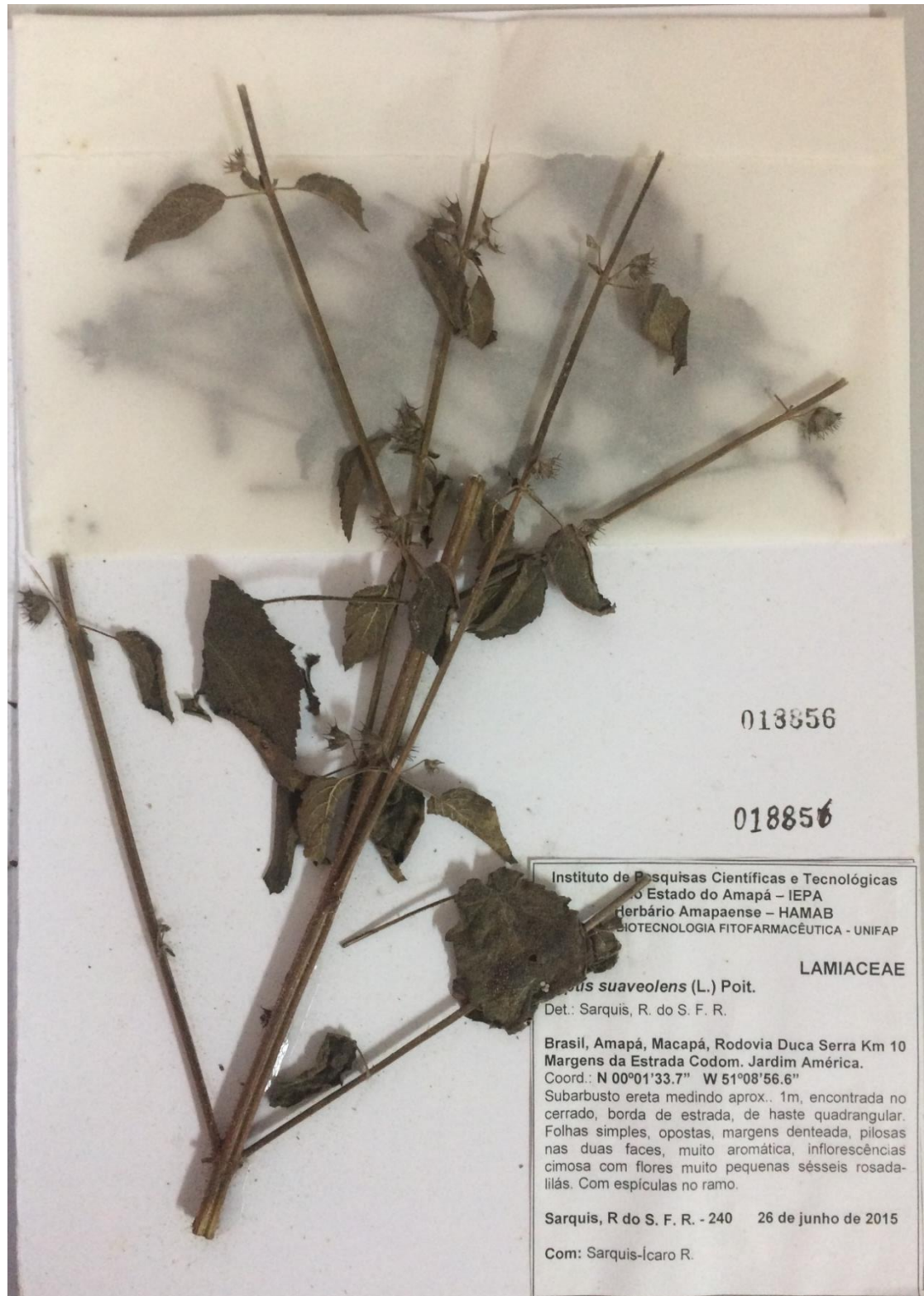


Figura 4 - Prancha botânica de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. Fonte: Próprio autor.

2. HIPÓTESE

A nanoemulsão do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* possui atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Obtenção e avaliação da atividade larvicida da nanoemulsão de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. sobre *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em condições de laboratório.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e caracterizar o óleo essencial de *Hyptis suaveolens*;
- Obter e caracterizar a nanoemulsão de *Hyptis suaveolens*;
- Avaliar a atividade larvicida de diferentes concentrações da nanoemulsão de *Hyptis suaveolens* em *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*;
- Estimar a concentração letal (CL₅₀) da nanoemulsão de *Hyptis suaveolens* em larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.

4. REFERÊNCIAS

- Abagli, A. Z., T. B. C. Alavo, F. Avlessi, and M. Moudachirou. 2012. Potential of the Bush Mint, *Hyptis suaveolens* Essential Oil for Personal Protection Against Mosquito Biting. *J Am Mosq Control Assoc* **28**:15-19.
- Agra, M. d. F., K. N. Silva, I. J. Lima Diniz Basilio, P. F. de Freitas, and J. M. Barbosa-Filho. 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy* **18**:472-508.
- Almeida, C., and U. P. de Albuquerque. 2002. Check-list of the family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **45**:343-353.
- Amer, A., and H. Mehlhorn. 2006. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitology Research* **99**:466-472.
- Amorim, L. B., E. Helvecio, C. M. Fontes de Oliveira, and C. F. Junqueira Ayres. 2013. Susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) populations to the chemical insecticide temephos in Pernambuco, Brazil. *Pest Management Science* **69**:1307-1314.
- Amusan, A. A. S., A. B. Idowu, and F. S. Arowolo. 2006. Comparative toxicity effect of bush tea leaves (*Hyptis suaveolens*) and orange peel (*Citrus sinensis*) oil extract on larvae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Tanzania Journal of Health Research* **7**:174-178.
- Anjali, C. H., Y. Sharma, A. Mukherjee, and N. Chandrasekaran. 2012. Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsion - a potent larvicidal agent against *Culex quinquefasciatus*. *Pest Management Science* **68**:158-163.
- Azevedo, N. R., I. F. P. Campos, H. D. Ferreira, T. A. Portes, S. C. Santos, J. C. Seraphin, J. R. Paula, and P. H. Ferri. 2001. Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry* **57**:733-736.
- Bakar, A. A., S. Sulaiman, B. Omar, and R. Mart Ali. 2012. Evaluation of *Melaleuca cajuputi* (Family:Myrtaceae) Essential Oil in Aerosol Spray Cans against Dengue Vectors in Low Cost Housing Flats. *Journal of Arthropod-Borne Diseases* **6**:28-35.
- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Idaomar. 2008. Biological effects of essential oils--A review. *Food Chem Toxicol* **46**:446-475.
- Batish, D. R., H. P. Singh, R. K. Kohli, and S. Kaur. 2008. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management* **256**:2166-2174.

- Bettioli, W., M. A. B. Morandi. 2009. *Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas*. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna. São Paulo. Brasil.
- Benelli, G. 2015. Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. *Parasitol Res* **114**:2801-2805.
- Braga, I. A., and D. Valle. 2007. *Aedes Aegypti*: Insecticides, Mechanisms of Action and Resistance. *Epidemiol. Serv. Saúde* **16**:279-293.
- Brandao, E., C. Bonfim, A. Alves, C. Oliveira, C. E. Montenegro, T. Costa, A. Maciel, and Z. Medeiros. 2015. Lymphatic filariasis among children and adolescents: spatial identification via socio-environmental indicators to define priority areas for elimination. *International Health* **7**:324-331.
- BRASIL. 2016a. Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de microcefalias no Brasil. Page 3 *in* Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, editor. 08, Brasília, Brasil.
- BRASIL. 2016b. Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika. Page 10 *in* Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, editor. 3, Brasília, Brasil.
- BRASIL. 2017a. Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika Page 11. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Brasília, DF, Brasil.
- BRASIL. 2017b. INFORME EPIDEMIOLÓGICO Nº 57 - MONITORAMENTO DOS CASOS DE MICROCEFALIA NO BRASIL. Page 3. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Brasília, DF, Brasil.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-- a review. *Int J Food Microbiol* **94**:223-253.
- Cardoso, B. F., O. P. Serra, L. B. da Silva Heinen, N. Zuchi, V. C. de Souza, F. G. Naveca, M. A. Mendes dos Santos, and R. D. Silhessarenko. 2015. Detection of Oropouche virus segment S in patients and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **110**:745-754.
- Carvalho, C. J., J. A. Rafael, M. S. Couri, and V. C. Silva. 2012. DIPTERA. Páginas 701-743 *in* J. A. Rafael, G. A. Melo, C. J. Carvalho, S. A. Casari, and R. Constantino. *Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia*. Holos Editora. Ribeirão Preto. São Paulo. Brasil.
- Cavalcanti, E. S. B., S. M. de Moraes, M. A. A. Lima, and E. W. P. Santana. 2004. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **99**:541-544.

- Conti, B., G. Benelli, G. Flamini, P. L. Cioni, R. Profeti, L. Ceccarini, M. Macchia, and A. Canale. 2012. Larvicidal and repellent activity of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) essential oil against the mosquito *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Parasitol Research* **110**:2013-2021.
- Dharmagadda, V. S., S. N. Naik, P. K. Mittal, and P. Vasudevan. 2005. Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresource Technology* **96**:1235-1240.
- Dias, C. N., L. P. Lima Alves, K. A. da Franca Rodrigues, B. M. C. Aranha, C. S. Rosa, F. M. Mendonca do Amaral, O. S. Monteiro, E. H. de Aguiar Andrade, J. G. Soares Maia, and D. F. Coutinho Moraes. 2015. Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils Extracted from Brazilian Legal Amazon Plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Duarte, J. L., J. R. R. Amado, A. E. M. F. M. Oliveira, R. A. S. Cruz, A. M. Ferreira, R. N. P. Souto, D. Q. Falcão, J. C. T. Carvalho, and C. P. Fernandes. 2015. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **25**:189-192.
- Dyer, O. 2015. Zika virus spreads across Americas as concerns mount over birth defects. *Bmj-British Medical Journal* **351**:h6983.
- Evans, M. V., T. A. Dallas, B. A. Han, C. C. Murdock, and J. M. Drake. 2017. Data-driven identification of potential Zika virus vectors. *Elife* **6**:e22053.
- Falcão, D. Q., S. B. O. Fernandes, and F. S. Menezes. 2003. Triterpenos de *Hyptis fasciculata* Benth. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **13**:81-83.
- Fernandes, R. S., S. S. Campos, A. Ferreira-de-Brito, R. M. d. Miranda, K. A. Barbosa da Silva, M. G. d. Castro, L. M. S. Raphael, P. Brasil, A.-B. Failloux, M. C. Bonaldo, and R. Lourenço-de-Oliveira. 2016. *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus. *Plos Neglected Tropical Diseases* **10**:e0004993.
- Figueiredo, L. T. M. 2007. Emergent arboviruses in Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical* **40**:224-229.
- Fischer, M., and J. E. Staples. 2014. Chikungunya Virus Spreads in the Americas - Caribbean and South America, 2013-2014. *Mmwr-Morbidity and Mortality Weekly Report* **63**:500-501.

- Fontes, G., A. B. Leite, A. R. Vasconcelos de Lima, H. Freitas, J. P. Ehrenberg, and E. M. Mauricio da Rocha. 2012. Lymphatic filariasis in Brazil: epidemiological situation and outlook for elimination. *Parasites & Vectors* **5**.
- Forattini, O. P. 2002. *Culicidologia Médica*. EDUSP. São Paulo. São Paulo. Brasil.
- Freitas, F. P., S. P. Freitas, G. C. S. Lemos, I. J. C. Vieira, G. A. Gravina, and F. J. A. Lemos. 2010. Comparative Larvicidal Activity of Essential Oils from Three Medicinal Plants against *Aedes aegypti* L. *Chemistry & Biodiversity* **7**:2801-2807.
- Govindarajan, M., R. Sivakumar, M. Rajeswari, and K. Yogalakshmi. 2012. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. *Parasitol Res* **110**:2023-2032.
- Gullan, P. J., and P. S. Cranston. 2007. *Os insetos: um resumo de entomologia*. Roca, São Paulo, SP. Brasil.
- Gutiérrez, J. M., C. González, A. Maestro, I. Solè, C. M. Pey, and J. Nolla. 2008. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **13**:245-251.
- Hart, C. E., C. M. Roundy, S. R. Azar, J. H. Huang, R. Yun, E. Reynolds, G. Leal, M. R. Nava, J. Vela, P. M. Stark, M. Debboun, S. Rossi, N. Vasilakis, S. Thangamani, and S. C. Weaver. 2017. Zika Virus Vector Competency of Mosquitoes, Gulf Coast, United States. *Emerg Infect Dis* **23**:559-560.
- Isman, M. B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* **19**:603-608.
- Joy, B., M. Omanakutty, and M. Mathew. 2008. Antibacterial Effects and Chemical Composition of the Essential Oil of *Hyptis suaveolens* Poit Leaves. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* **11**:384-390.
- Kanis, L. A., J. S. Prophiro, S. Vieira Eda, M. P. Nascimento, K. M. Zepon, I. C. Kulkamp-Guerreiro, and O. S. Silva. 2012. Larvicidal activity of *Copaifera* sp. (Leguminosae) oleoresin microcapsules against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Parasitol Res* **110**:1173-1178.
- Korte, R. L., G. Fontes, J. d. S. Almeida Aranha Camargo, E. M. Mauricio da Rocha, E. A. Cavalcante de Araujo, M. Z. de Oliveira, R. V. dos Santos, and L. M. Aranha Camargo. 2013. Survey of Bancroftian filariasis infection in humans and *Culex* mosquitoes in the western Brazilian Amazon region: implications for transmission and control. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical* **46**:214-220.

- Maciel-de-Freitas, R., F. C. Avendanho, R. Santos, G. Sylvestre, S. C. Araujo, J. B. Pereira Lima, A. J. Martins, G. E. Coelho, and D. Valle. 2014. Undesirable Consequences of Insecticide Resistance following *Aedes aegypti* Control Activities Due to a Dengue Outbreak. PLoS ONE **9**.
- Mathew, N., M. G. Anitha, T. S. Bala, S. M. Sivakumar, R. Narmadha, and M. Kalyanasundaram. 2009. Larvicidal activity of *Saraca indica*, *Nyctanthes arbor-tristis*, and *Clitoria ternatea* extracts against three mosquito vector species. Parasitol Res **104**:1017-1025.
- McClements, D. J. 2012. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. Soft Matter **8**:1719-1729.
- McNeil, M., P. Facey, and R. Porter. 2011. Essential Oils from the *Hyptis* genus- A Review (1909-2009). Natural Product Communications **6**:1775-1796.
- Mendonça, F. A., K. F. da Silva, K. K. dos Santos, K. A. Ribeiro Junior, and A. E. Sant'Ana. 2005. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. Fitoterapia **76**:629-636.
- Moreira, A. C. P., E. d. O. Lima, P. A. Wanderley, E. S. Carmo, and E. L. de Souza. 2010. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaves essential oil against *Aspergillus* species Brazilian Journal of Microbiology **41**:28-33.
- Oliveira, A. E. M. F. M., J. L. Duarte, J. R. R. Amado, R. A. S. Cruz, C. F. Rocha, R. N. P. Souto, R. M. A. Ferreira, K. Santos, E. C. da Conceição, L. A. R. de Oliveira, A. Kelecom, C. P. Fernandes, and J. C. T. Carvalho. 2016. Development of a Larvicidal Nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel Oil. PLoS ONE **11**:e0145835.
- Oliveira, A. E. M. F. M., J. L. Duarte, R. A. S. Cruz, R. N. P. Souto, R. M. A. Ferreira, T. Peniche, E. C. da Conceição, L. A. R. de Oliveira, S. M. M. Faustino, A. C. Florentino, J. C. T. Carvalho, and C. P. Fernandes. 2017. *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion as a promising tool for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) control. Journal of Nanobiotechnology **15**:11.
- OPAS/OMS. 2014. O Brasil avança para a eliminação da transmissão da Filariose Linfática. Brasília, DF, Brasil.
- Peerzada, N. 1997. Chemical Composition of the Essential Oil of *Hyptis suaveolens*. Molecules **2**:165-168.
- Rao, J., and D. J. McClements. 2012. Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. Food Hydrocolloids **29**:326-334.

- Renugadevi, G., T. Ramanathan, p. R. Shanmuga, and P. Thirunavukkarasu. 2013. Studies on effects of *Andrographis paniculata* (Burm.f.) and *Andrographis lineata* nees (Family: Acanthaceae) extracts against two mosquitoes *Culex quinquefasciatus* (Say.) and *Aedes aegypti* (Linn.). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **6**:176-179.
- Ríos Tesch, N., R. Marquez Yanez, X. Mendoza Rojas, L. Rojas-Fermin, J. Velasco Carrillo, T. Diaz, F. Mora Vivas, C. Yanez Colmenares, and P. Melendez Gonzalez. 2015. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oil *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae) from the Venezuelan Plains. *Revista Peruana de Biología* **22**:103-107.
- Rocha, E. M. M., and G. Fontes. 1998. Bancroftian filariasis in Brazil. *Revista De Saude Publica* **32**:98-105.
- Rodrigues, E. d. C. R., A. M. Ferreira, J. C. E. Vilhena, F. B. Almeida, R. A. S. Cruz, A. C. Florentino, R. N. P. Souto, J. C. T. Carvalho, and C. P. Fernandes. 2014. Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (*Copaifera duckei*) oleoresin. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **24**:699-705.
- Samy, A. M., A. H. Elaagip, M. A. Kenawy, C. F. J. Ayres, A. T. Peterson, and D. E. Soliman. 2016. Climate Change Influences on the Global Potential Distribution of the Mosquito *Culex quinquefasciatus*, Vector of West Nile Virus and Lymphatic Filariasis. *PLoS ONE* **11**.
- Seo, S. M., H. M. Park, and I. K. Park. 2012. Larvicidal activity of ajowan (*Trachyspermum ammi*) and Peru balsam (*Myroxylon pereira*) oils and blends of their constituents against mosquito, *Aedes aegypti*, acute toxicity on water flea, *Daphnia magna*, and aqueous residue. *J Agric Food Chem* **60**:5909-5914.
- Simonsen, P. E., and M. E. Mwakitalu. 2013. Urban lymphatic filariasis. *Parasitology Research* **112**:35-44.
- Simões, C. O., and V. Spitzer. 2010. Óleos Voláteis.in E. P. S. C. O. Simões, G. Gosmann, J. P. Mello, L. A. Mentz, and P. R. Petrovick, editor. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.
- Soares, S. F., L. M. Borges, R. de Sousa Braga, L. L. Ferreira, C. C. Louly, L. M. Tresvenzol, J. R. de Paula, and P. H. Ferri. 2010. Repellent activity of plant-derived compounds against *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) nymphs. *Vet Parasitol* **167**:67-73.
- Solans, C., P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar, and M. J. Garcia-Celma. 2005. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **10**:102-110.

- Solomon, B., F. F. Sahle, T. Gebre-Mariam, K. Asres, and R. H. Neubert. 2012. Microencapsulation of citronella oil for mosquito-repellent application: formulation and in vitro permeation studies. *Eur J Pharm Biopharm* **80**:61-66.
- Sugumar, S., S. K. Clarke, M. J. Nirmala, B. K. Tyagi, A. Mukherjee, and N. Chandrasekaran. 2014. Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. *Bulletin of Entomological Research* **104**:393-402.
- Tadros, T., R. Izquierdo, J. Esquena, and C. Solans. 2004. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* **108**:303-318.
- Tennyson, S., J. Ravindran, A. Eapen, and J. William. 2015. Ovicidal activity of *Ageratum houstonianum* Mill. (Asteraceae) leaf extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* **5**:199-203.
- Tripathi, A. K., and S. Upadhyay. 2009. Repellent and insecticidal activities of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) leaf essential oil against four stored-grain coleopteran pests. *International Journal of Tropical Insect Science* **29**:219.
- Triplehorn, C. A., and N. F. Johnson. 2011. *Estudo dos insetos*. Cengage Learning edition, São Paulo.
- Verpoorte, R. 1998. Antimicrobially Active Alkaloids. in Roberts, M.F.,M. Wink. *Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications*. Plenum Press. New York. New York. USA.
- Veerakumar, K., M. Govindarajan, M. Rajeswary, and U. Muthukumaran. 2014. Low-cost and eco-friendly green synthesis of silver nanoparticles using *Feronia elephantum* (Rutaceae) against *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi*, and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* **113**:1775-1785.
- Vianna Santos, R. C., L. Q. Soares Lopes, C. F. Dos Santos Alves, V. P. Fausto, K. Pizzutt, V. Barboza, M. E. De Souza, R. P. Raffin, P. Gomes, D. Takamatsu, Y. Morinaga, A. A. Boligon, M. L. Athayde, C. C. Felippi, and R. D. A. Vaucher. 2014. Antimicrobial activity of tea tree oil nanoparticles against American and European fowlbrood diseases agents. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **17**:343-347.
- Wang, L., X. Li, G. Zhang, J. Dong, and J. Eastoe. 2007. Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations. *Journal of Colloid and Interface Science* **314**:230-235.
- WHO. 2012. *Handbook for Integrated Vector Management*. Page 66 in *World Health Organization*, editor., Geneva, Switzerland.

- WHO. 2013. Lymphatic filariasis: managing morbidity and preventing disability: an aide-mémoire for national programme managers. *in* World Health Organization, editor.
- Yadav, R., S. N. Tikar, A. K. Sharma, V. Tyagi, D. Sukumaran, A. K. Jain, and V. Veer. 2015. Screening of some weeds for larvicidal activity against *Aedes albopictus*, a vector of dengue and chikungunya. *Journal of Vector Borne Diseases* **52**:88-94.
- Yadav, R., V. Tyagi, S. N. Tikar, A. K. Sharma, M. J. Mendki, A. K. Jain, and S. Devanathan. 2014. Differential Larval Toxicity and Oviposition Altering Activity of Some Indigenous Plant Extracts against Dengue and Chikungunya Vector *Aedes albopictus*. *Journal of Arthropod-Borne Diseases* **8**:174-185.

CAPÍTULO 1 - Novel aqueous nanoemulsion prepared with *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. essential oil: a promising larvicidal agent in integrated control practices against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Artigo submetido ao periódico "Parasitology Research"

Novel aqueous nanoemulsion prepared with *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. essential oil: a promising larvicidal agent in integrated control practices against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Taires Peniche ¹ · Jonatas L. Duarte ² · Igor A. P. Sidônio ³ · Frankli A. S. Amaral ³ · Icaro R. Sarquis ³ · Rosângela S. F. R. Sarquis ³ · Rodrigo A. S. Cruz ³ · Anna E. M. F. M. Oliveira ³ · Ricardo M. A. Ferreira ¹ · Leandro Rocha ⁴ · Luis A. C. Tietbohl ⁴ · Alexandro C. Florentino ⁵ · José C. T. Carvalho ² · Caio P. Fernandes* ³ · Raimundo N. P. Souto ¹

¹ Laboratório de Artrópodes, Universidade Federal do Amapá, Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amapá, Campus Universitário Marco Zero do Equador, Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira, KM, 02 Bairro Zerão, CEP: 68902–280, Macapá, AP, Brazil

² Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Curso de Farmácia, Universidade Federal do Amapá, Campus Universitário Marco Zero do Equador, Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira, KM, 02 Bairro Zerão, CEP: 68902–280, Macapá, AP, Brazil

³ Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica, Curso de Farmácia, Universidade Federal do Amapá, Campus Universitário Marco Zero do Equador, Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira, KM, 02 Bairro Zerão, CEP: 68902–280, Macapá, AP, Brazil

⁴ Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais, LTPN, Departamento e Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Rua, Mario Viana, 523, CEP: 24241-000, Santa Rosa, Niterói, RJ, Brazil

⁵ Laboratório de Absorção Atômica e Bioprospecção, Curso de Farmácia, Universidade Federal do Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek Km 02, Jardim Marco Zero, CEP: 68903-419, Macapá, AP, Brazil

*Correspondent author: +55 96 4009 2927 / caiofernandes@unifap.br

Abstract

Growing interest in ecofriendly alternatives of vector control is observed worldwide. On this context, aqueous nanoemulsions appear as promising delivery-systems of bioactive larvicidal agents, including low polar natural products from plant origin. Our study aimed to generate an oil in water nanoemulsion using the essential oil extracted from leaves of *Hyptis suaveolens* and evaluate its larvicidal potential against *Aedes aegypti* larvae. Gas chromatograph analysis revealed that 1,8 - cineole was the major compound, corresponding to 26.34% of the relative composition. Low mean droplet size, which remained around 150 nm was observed even after seven days of storage. The estimated LC₅₀ and LC₉₀ values after 24h were, respectively, 202.66 (152.508 – 321.745) ppm and 339.618 (253.747– 616.336) ppm. The absence of a heating step on the nanoemulsion preparation and utilization of a conventional magnetic stirrer can be considered an advantage in terms of costs of the preparation. Moreover, the surfactant which was used is biodegradable and no organic solvent was used, making this a green nanostructure system. Thus, the present study provides valuable information concerning nanobiotechnology of larvicidal agents from plant origin, opens perspectives for viable preparation of these novel systems with great potential to be used in integrative practices of vector control.

Keywords: Chikungunya, dengue, nanodispersion, third-instar larvae, zika

Introduction

Mosquitoes are vectors of pathogen, being a threat to million of people worldwide. They are responsible by transmission of arboviruses (Anjali et al. 2012; Benelli 2015; Seo et al. 2012), which represent around 16% of diseases and are considered a critical public health problem (WHO 2015). Therefore, vector control is required (Benelli 2016a). Nowadays, the main strategy involves utilization of synthetic insecticides (organophosphate, pyrethroids, carbamates and organochlorine), however, they can be harmful for humans and induce resistance in mosquitoes (Naqqash et al. 2016).

Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus 1762) develop a main role in transmission of tropical diseases (Marcondes and Ximenes 2016). Chikungunya fever (CHIKV) is one of this diseases, being reported in South America since 2013 (Fischer and Staples 2014). In 2016, 26.598 cases were notified in Brazil, resulting in 159 death (BRASIL 2016). The first report of infection by zika virus (ZIKV) in Brazil occurred in 2015. Government declared national health public emergency due to increase of cases of microcephaly on children born from pregnant infected by the virus (Dyer 2015). A total of 211,770 cases of zika fever and 10,867 of microcephaly was observed on this country in 2016 (BRASIL 2016). Dengue is caused by different serotypes of viruses (DENV – 1, 2, 3 and 4) (Maciel-de-Freitas et al. 2014). It is considered one of most important arbovirosis worldwide, being estimated the occurrence of more than 50 million cases per year. Moreover, more than 2.5 million people are in risk (WHO 2012). In Brazil, 1.487.924 of cases were registered in the year 2016 (BRASIL 2016). Thus, considering the role of *Ae. aegypti* on neglected and emerging diseases, integrative practices of control for this vectors are required.

Natural products are frequently considered an alternative to synthetic insecticides, including those for vector control. These secondary metabolites from plants are biodegradable

and also less toxic to non-target organism (Dias et al. 2015). Essential oils (EO) are complex mixtures of volatile substances, often terpenes (Isman 2006). They are produced by plants in response to external factors, including defense against herbivores and pathogens (Bakkali et al. 2008). EO are promising for *Ae. Aegypti* control with less impairment to environment and several plants that produce these natural products were reported as potent larvicidal or repellent agents against mosquitoes (Pavela 2015; Rehman et al. 2014; Soonwera 2015), including *Rosmarinus officinalis*, *Cymbopogon winterianus* (Amer and Mehlhorn 2006a; Amer and Mehlhorn 2006b), *Cymbopogon citratus*, *Alpinia speciosa* (Freitas et al. 2010), *Mentha spicata* (Govindarajan et al. 2012), *Zingiber nimmonii* (Govindarajan et al. 2016), *Anacardium occidentale*, *Ageratum conyzoides*, *Copaifera langsdorffii*, *Carapa guianensis* and *Cymbopogon winterianus* (Mendonça et al. 2005).

Nowadays, nanobiotechnology has application on several areas, including as promising novel insecticidal agents against disease vectors (Benelli 2016b). Nanoemulsions are one of the various nanoformulations that can be prepared for this purpose. They are kinetic stable systems constituted by small droplets (20 - 200 nm) disperse on an external phase, usually water (McClements 2012; Solans et al. 2005; Wang et al. 2007), being often stabilized with one or more surfactants (Bruxel et al. 2012). Aqueous nanoemulsions containing bioactive herbal oils are an economic viable alternative to classical chemical pesticides on practices of vector control (Anjali et al. 2012; Duarte et al. 2015; Ghosh et al. 2013; Oliveira et al. 2016; Rodrigues et al. 2014).

The genus *Hyptis* Jacq. (Lamiaceae) is cosmopolite and have around 400 species (Peerzada 1997). *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. is considered an invasive species, widely distributed on tropical and subtropical regions (Azevedo et al. 2001). Studies carried out with extract and essential oil from *H. suaveolens* have demonstrated antifungal (Moreira et al. 2010), bactericidal (Joy et al. 2008; Rios Tesch et al. 2015) and insecticidal activities, being this last

one mainly related to larvae from mosquitoes of genus *Aedes* (Amusan et al. 2006; Conti et al. 2012), *Culex* and *Anopheles* (Abagli et al. 2012). Despite the bioactive properties of *H. suaveolens* on insects are described for extracts and essential oil, to our knowledge, no study was carried out using a novel nanoemulsion based on this plant. Thus, the aim of the present study was to evaluate the larvicidal activity of an oil in water nanoemulsion prepared with essential oil from leaves of *H. suaveolens* and investigate its larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae.

Materials and Methods

Plant material

Leaves of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. were collected at Macapá, Amapá, Brazil (00°01'33.7" N e 51°08'56.6" W). Taxonomical identification was performed by the botanist Prof. Rosângela S. F. Rodrigues Sarquis. Voucher specimen was deposited at the herbarium of the Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (HAMAB) under the register number (18856).

Essential oil extraction

The extraction of the *H. suaveolens* essential oil was carried out by hydrodistillation of leaves (1204.0 g) using a Clevenger-type apparatus for three hours. After this period, the essential oil was collected, filtered over anhydrous sodium sulphate and stored at 4 °C until used.

Gas-chromatograph analysis

The *H. suaveolens* essential oil was analyzed using a GCMS-QP5000 (Shimadzu) gas chromatograph, equipped with a mass spectrometer. Gas chromatographic (GC) conditions (Tiethbohl et al. 2014) were as follows: injector temperature, 260°C; FID temperature, 290°C;

carrier gas, Helium; flow rate, 1 ml/ min and split injection with split ratio 1:40. Oven temperature was initially 60°C and then risen to 290°C at a rate of 3°C/min. One microliter of the sample was dissolved in dichloromethane (1:100 mg/μl) and injected into a DB-5 column (0.25 mm I.D, 30 m in length, 0.25 μm and film thickness). Mass spectrometry (MS) electron ionization was 70 eV and scan rate was 1 scan/s. Retention indices (RI) were calculated by interpolation to the retention times of a mixture of aliphatic hydrocarbons (C9- C30) analyzed under the same conditions (Van Den Dool and Kratz, 1963). Identification of substances was performed by comparing their retention indices and mass spectra with those reported in literature (Adams, 2007). MS fragmentation pattern of compounds was also compared with NIST mass spectra libraries. Relative abundance of the chemical constituents was performed by flame ionization gas chromatography (CG/FID), under the same conditions of GC/MS Analysis and percentages of these compounds were obtained by FID peak area normalization method.

Nanoemulsion preparation

The nanoemulsion was prepared by a titration low energy method (Ostertag et al. 2012), being constituted by 2500 ppm of *H. suaveolens* essential oil and 2500 ppm of polysorbate 80. The oily phase (essential oil and surfactant) was homogenized at 800 rpm for 30 minutes using a magnetic stirrer (Fisatom, Brazil). Then, deionized water was added under controlled flow rate (3.5 mL/min) and the system was stirred at 800 rpm during 60 minutes. Final mass of the nanoemulsion was 100 g and after preparation it was stored under room temperature (20±2°C).

Characterization of *H. suaveolens* nanoemulsion

Analysis of droplet size distribution of the nanoemulsion was carried out by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer ZS (Malvern, UK). Samples were diluted in deionized water (1:25) (Fernandes et al. 2013) and measurements were performed in triplicate.

Larvicidal Bioassay

Aedes aegypti larvae (Rockfeller strain) were obtained from the Arthropoda Laboratory (Universidade Federal do Amapá, Brazil). Biological assay was performed under controlled conditions, being larvae kept at 25 ± 2 °C, relative humidity of $75\pm 5\%$ and a 12h light:dark cycle. Experimental evaluation was performed according to World Health Organization protocol (WHO, 2005) with some modifications. All experiments were performed in triplicate with 10 third-instar larvae in each sample. Nanoemulsion was diluted in distilled water at 25, 50, 75, 100 and 250 ppm (concentration expressed as *H. suaveolens* essential oil content on aqueous media). Control group was constituted by deionized water.

Mortality levels were recorded after 24 and 48 hours of exposure.

Statistical analysis

Estimation of LC_{50} and LC_{90} values was carried out by Probit analysis using the software Statgraphics Plus software v.5.1 (Stat Easy Co., Minneapolis, USA). ANOVA (twoway) followed by Tukey's HSD was performed using the software R (R Development Core Team, 2015) and differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

Results

***Hyptis suaveolens* essential oil**

Hydrodistillation extraction of leaves of *H. suaveolens* yielded 0.117 % of a transparent slight yellowish essential oil. Total ion chromatogram (Fig. 1) shows that monoterpenes eluted with retention time lower than 20.0 min and that sesquiterpenes

compounds eluted with retention time higher than 20.0 min. Table 1 shows the calculated retention indices and relative percentage of the 27 identified compounds, which corresponded to 93.34% of the essential oil. The major substance was 1,8- cineole, which corresponded to 26.34% of the relative composition. β - pinene (14.18%), *exo*- fenchol (10.57%), fenchone (7.29%) were also representative on this essential oil, corresponding to more than 5% of its relative composition.

INSERT FIG 1 HERE

INSERT TABLE 1 HERE

***H. suaveolens* nanoemulsion**

The nanoemulsion prepared with *H. suaveolens* showed a translucent aspect with bluish reflect. Dilution of the nanoemulsion in water allowed obtainment of a homogeneous system without observation of any droplet, suggesting the formation of an oil in water nanoemulsions (aqueous nanoemulsion). Fig. 2 shows droplet size distribution of this nanoemulsion. Low mean droplet size after preparation (147.3 ± 1.069 nm) and no major alteration on droplet size after was observed after 7 days of storage, which remained below 200 nm.

INSERT FIG 2 HERE

Larvicidal activity of *H. suaveolens* nanoemulsion

Higher mortality was observed for group treated at 250 ppm ($p < 0.05$), which reached $46.67 \pm 15.27\%$ after 24 h and 63.33 ± 20.81 at the end of the experiment. After 48 h of treatment, the equation of fitted estimated regression model was $y = -1.89634 + 0.00935727x$, while p-value for the model and p-value for the residuals were, respectively, 0.0002 and 0.4197.

These results corroborate statistical significant differences between the variables and that the model is not significantly worse than the best possible model at the 95.0 % or higher confidence level. The estimated LC_{50} and LC_{90} values with the lower limit and upper limit are, respectively, 202.66 (152.508 – 321.745) ppm and 339.618 (253.747– 616.336) ppm. ANOVA test indicated significant difference on mortality observed after 48 h ($F [5] = 5.143$; $p = 0.0326$), when compared to mortality recorded after 24 h ($F [1] = 4.901$; $p = 0.0349$).

Discussion

Gas-chromatograph analysis of an essential oil extracted from leaves of *H. suaveolens* performed on another study indicated sabinene and β -caryophyllene as major compounds, while 1,8 cineole was not detected (Conti et al. 2012). Chemical variability on essential oils from *H. suaveolens* was previously observed and sabinene, limonene, bicyclogermacrene, β -phellandrene and 1,8-cineole were considered the principal compounds of distinguished groups (chemotypes) (Azevedo et al. 2001). However, influence of external factors also can influence the chemical composition of essential oils (Gobbo-Neto and Lopes, 2007).

Evaluation of larvicidal activity of essential oils from two species of the genus *Hyptis* against *Ae. aegypti* suggested LC_{50} values around 502 ppm (*H. fruticosa*) and 366 ppm (*H. pectinata*) (Silva et al. 2008). Literature data also indicates that the monoterpene 1,8-cineole, which was the major compound found in the essential oil that was used in the present study, has LC_{50} value against *Ae. aegypti*, around 1381 ppm. β -caryophyllene also has high LC_{50} value, which is around 1202 ppm (Silva et al. 2008). An essential oil from *H. suaveolens* with 1,8-cineole as major compound and also high content of β -pinene presented LC_{50} value around 261 ppm against third instar larvae of *Ae. aegypti* after 24 h of exposure (Cavalcanti et al. 2004). Evaluation of extracts of *H. suaveolens* against third-instar *Ae. aegypti* larvae showed low larvicidal activity. LC_{50} values after 24 h were 543.66, 1443.53, 1292.36, and 853.04,

respectively, for hexane, diethyl ether dichloromethane and ethyl acetate extracts (Tennyson et al. 2012).

LC₅₀ value of *H. suaveolens* essential oil against the fourth-instar larvae of *Ae. albopictus* was around 240.3 ppm and approximately 65 % of mortality was reached at 250 ppm (Conti et al. 2012). Extracts from this species were also tested against *Ae. albopictus* third-instar larvae. LC₅₀ values after 24 h of exposure were around 689.69, 349.77, 310.47, 258.39 and 569.73 ppm, respectively, for hexane, isopropanol, methanol, acetone and dimethylsulphoxide extracts (Yadav et al. 2014). Extracts from *H. suaveolens* were assayed against *Cx. quinquefasciatus* third-instar larvae and LC₅₀ values of hexane and chloroform extracts were, respectively, 213.09 and 217.64 ppm (Kovendan et al. 2012). On another study, it was observed that hexane and diethyl ether extracts from *H. suaveolens*, showed LC₅₀ values around 367.12 and 284.56 ppm, when evaluated against *An. culicifacies* third-instar larvae (Kovendan et al. 2014).

The development of nanostructured systems using botanical insecticides, including essential oils is very promising (Oliveira et al. 2014). On this context, the nanoemulsions are in the spotlight of novelty due to its potential to deliver poor water-soluble constituents and even enhance this chemical stability (McClements 2012), including for pesticides (Wang et al. 2007). Preparation of nanoemulsions using spontaneous emulsification was recognized as a valuable technique for obtainment of fine droplets. However, a main concern is related to toxicity of the organic solvent which is required for their preparation (Bouchemal et al. 2004). On another hand, several approach regarding high energy methods (eg. involving intense disruptive forces) or low energy methods (eg. involving phase transitions) are available (Solans et al. 2005).

Some recent studies focused on metallic nanoparticles using herbal derivatives (Murugan et al. 2015; Muthukumaran et al. 2015; Sujitha et al. 2015; Suganya et al. 2014; Veerakumar et al. 2014). This approach allow obtainment of nanostructures with high effectiveness against vector larvae and suggest that these nanoparticles have a green-concept.

However, bioaccumulation of some metals used on the fabrication of the metallic nanoparticles may cause some problem if they bio accumulate on on-target organism and this may be a permanent concern.

A nanoemulsion was prepared with neem for evaluation of its activity against *Cx. quinquefasciatus* larvae. However, even using oil to surfactant ratio of 1:1 and ultrasonication (high energy method), a mean droplet size around 192.0 was achieved (Anjali et al. 2012). This approach was also used for preparation of a nanoemulsion with eucalyptus oil (1,8- cineole as major compound) against this same vector. The improved larvicidal activity observed by these authors may be attributed to extreme low droplet size which as achieved using the ultrasonication method, considering that reduced mean diameter may be associated to enhanced larvicidal activity (Sugumar et al. 2014).

Regarding development of nanoemulsions with herbal bioactives products using low energy method approach, some efforts have been observed. Nanoemulsions prepared with *Pterodon emarginatus* using a conventional magnetic stirrer were evaluated against *Ae. aegypti* and *Cx. Quinquefasciatus* larvae. However, a heating step was required in order to achieve droplet size below 150 nm and low polydispersity index (Oliveira et al. 2016; Oliveira et al. 2017). It is worth mentioning that heating may induce loss of volatile compounds, such essential oil components. On this context, methods that avoid this step with now impairment to fine droplets formation can be considered an advantage. The nanoemulsion prepared by a titration low energy method using *Rosmarinus officinalis* essential oil was considered a larvicidal product against *Ae. aegypti* (Duarte et al. 2015).

Despite nanoemulsions may be useful for true ecofriendly and biodegradable larvicidal agents using natural products, to our knowledge the efforts for this purpose are still scarce. Moreover, considering that high input equipment enhances the cost of the process, low energy

methods appear as good alternatives. As part of our ongoing efforts to develop new natural product-based nanoemulsions against larvae of disease vectors, we consider that the present study provide valuable data about this field. Absence of any heat process is a critical advantage of our nanoemulsion, considering that methods that involve heating (eg. PIT method) may induce loss of volatiles. Comparison to another studies carried out with pure essential oils from *H. suaveolens* and another *Hyptis* species shows the relevance of our results. Thus, we believe that this study will contribute to nanobiotechnology of natural products, especially regarding development of nanoemulsions by low energy methods as a viable alternative in integrative practices of vector control.

Acknowledgements

Authors would like to thank FAPEAP (Prodetec Araguari—Process No 250.203.035/2013) for the financial support and PROPESPG/UNIFAP (PROPUBLIC and PAPESQ).

References

- Abagli AZ, Alavo TBC, Avlessi F, Moudachirou M (2012) Potential of the Bush Mint, *Hyptis suaveolens* Essential Oil for Personal Protection Against Mosquito Biting. *J Am Mosq Control Assoc* 28(1):15-19 doi:10.2987/11-6181.1
- Adams RP, 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, fourth ed. ed. Allured Publishing, Carol Stream, Illinois
- Amer A, Mehlhorn H (2006a) Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitology Research* 99(4):466-472 doi:10.1007/s00436-006-0182-3
- Amer A, Mehlhorn H (2006b) Repellency effect of forty-one essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes. *Parasitology Research* 99(4):478-490 doi:10.1007/s00436-006-0184-1
- Amusan AAS, Idowu AB, Arowolo FS (2006) Comparative toxicity effect of bush tea leaves (*Hyptis suaveolens*) and orange peel (*Citrus sinensis*) oil extract on larvae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Tanzania Journal of Health Research* 7(3):174-178 doi:10.4314/thrb.v7i3.14256
- Anjali CH, Sharma Y, Mukherjee A, Chandrasekaran N (2012) Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsion - a potent larvicidal agent against *Culex quinquefasciatus*. *Pest Management Science* 68(2):158-163 doi:10.1002/ps.2233
- Azevedo NR, et al. (2001) Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry* 57(5):733-736 doi:10.1016/s0031-9422(01)00128-5

- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils-A review. *Food Chem Toxicol* 46(2):446-75 doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106
- Benelli G (2015) Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. *Parasitology Research* 114(8):2801-5 doi:10.1007/s00436-015-4586-9
- Benelli G (2016a) Spread of Zika virus: The key role of mosquito vector control. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6(6):468-471 doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.03.012>
- Benelli G (2016b) Plant-mediated biosynthesis of nanoparticles as an emerging tool against mosquitoes of medical and veterinary importance: a review. *Parasitology Research* 115(1):23-34 doi:10.1007/s00436-015-4800-9
- Bouchemal K, Briçon S, Perrier E, Fessi H (2004) Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *International Journal of Pharmaceutics* 280: 241-251.
- BRASIL (2016) Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49, 2016 vol 47. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, BRASIL, p 10.
- Bruxel F, Laux M, Wild LB, Fraga M, Koester LS, Teixeira HF (2012) Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Química Nova* 35(9):1827-1840
- Cavalcanti ESB, Morais SM, Lima MAA, Santana EWP (2004). Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99(5): 541-544.
- Conti B, et al. (2012) Larvicidal and repellent activity of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) essential oil against the mosquito *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research* 110(5):2013-21 doi:10.1007/s00436-011-2730-8
- Dias CN, et al. (2015) Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils Extracted from Brazilian Legal Amazon Plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* doi:10.1155/2015/490765
- Duarte JL, et al. (2015) Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 25(2):189-192 doi:10.1016/j.bjp.2015.02.010
- Dyer O (2015) Zika virus spreads across Americas as concerns mount over birth defects. *Bmj-British Medical Journal* 351:h6983 doi:10.1136/bmj.h6983
- Fernandes CP, et al. (2013) HLB value, an important parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23(1):108- 114 doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000127>
- Fischer M, Staples JE (2014) Chikungunya Virus Spreads in the Americas - Caribbean and South America, 2013-2014. *Mmwr-Morbidity and Mortality Weekly Report* 63(22):500-501
- Freitas FP, Freitas SP, Lemos GCS, Vieira IJC, Gravina GA, Lemos FJA (2010) Comparative Larvicidal Activity of Essential Oils from Three Medicinal Plants against *Aedes aegypti* L. *Chemistry & Biodiversity* 7(11):2801-2807 doi:10.1002/cbdv.200900260
- Ghosh V, Mukherjee A, Chandrasekaran N (2013) Formulation and Characterization of Plant Essential Oil Based Nanoemulsion: Evaluation of its Larvicidal Activity Against *Aedes aegypti*. *Asian Journal of Chemistry* 25:S321-S323
- Gobbo-Neto L, Lopes NP (2007) Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. *Química Nova* 30(2): 374-381
- Govindarajan M, Rajeswary M, Arivoli S, Tennyson S, Benelli G (2016) 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* 115(5):1807-1816 doi:10.1007/s00436-016-4920-x
- Govindarajan M, Sivakumar R, Rajeswari M, Yogalakshmi K (2012) Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. *Parasitology Research* 110(5):2023-32 doi:10.1007/s00436-011-2731-7
- Isman MB (2006) Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World Annual Review of Entomology. *Annual Review of Entomology*, vol 51, p 45-66
- Joy B, Omanakutty M, Mathew M (2008) Antibacterial Effects and Chemical Composition of the Essential Oil of *Hyptis suaveolens* Poit Leaves. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 11(4):384-390
- Kovendan K, Murugan K, Panneerselvam C, Kumar PM, Amerasan D, Subramaniam J, Vincent S, Barnard DR (2012) Laboratory and field evaluation of medicinal plant extracts against filarial vector, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) *Parasitology Research* 110: 2105-2115
- Kovendan K, Kumar PM, Subramaniam J, Murugan K, William SJ (2014) Larvicidal activity of indigenous plant extracts on the rural malarial vector, *Anopheles culicifacies* Giles. (Diptera: Culicidae)
- Maciel-de-Freitas R, et al. (2014) Undesirable Consequences of Insecticide Resistance following *Aedes aegypti* Control Activities Due to a Dengue Outbreak. *Plos One* 9(3) doi:10.1371/journal.pone.0092424
- Marcondes CB, Ximenes MdFFdM (2016) Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical* 49(1):410 doi:10.1590/0037-8682-0220-2015
- McClements DJ (2012) Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* 8(6):1719-1729 doi:10.1039/c2sm06903b
- Mendonça FA, da Silva KF, dos Santos KK, Ribeiro Junior KA, Sant'Ana AE (2005) Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia* 76(7-8):629-36 doi:10.1016/j.fitote.2005.06.013
- Moreira ACP, Lima EdO, Wanderley PA, Carmo ES, de Souza EL (2010) Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaves essential oil against *Aspergillus* species *Brazilian Journal of Microbiology* 41(1):28-33 doi:10.1590/s1517-83822010000100006
- Murugan K, Dinesh D, Paulpandi M, Althbyani ADM, Subramaniam J, Madhiyazhagan P, Wang L, Suresh U, Kumar PM, Mohan J, Rajaganesh R, Wei H, Kalimuthu K, Parajulee MN, Mehlhorn H, Benelli G (2015) Nanoparticles in the fight against mosquito-borne diseases: bioactivity of *Bruguiera cylindrica*-synthesized nanoparticles against dengue virus DEN-2 (in vitro) and its mosquito vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) *Parasitology Research* 114: 4349–4361.
- Muthukumar U, Govindarajan M, Rajeswary M (2015) Green synthesis of silver nanoparticles from *Cassia roxburghii* —a most potent power for mosquito control. *Parasitology Research* 114: 4385–4395.
- Naqqash MN, Gokce A, Bakhsh A, Salim M (2016) Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. *Parasitology Research* 115(4):1363-1373 doi:10.1007/s00436-015-4898-9
- Oliveira JL, Campos EVR, Bakshi M, Abhilash PC, fraceto LF (2014) Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: prospects and promises.

- Oliveira AEMFM, et al. (2016) Development of a Larvicidal Nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel Oil. PLoS ONE 11(1): e0145835 doi:10.1371/journal.pone.0145835
- Oliveira AEMFM, Duarte JL, Cruz RAS, Souto RNP, Ferreira RMA, Peniche T, da Conceição EC, de Oliveira LAR, Faustino SMM, Florentino AC, Carvalho JCT, Fernandes CP, 2017. *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion as a promising tool for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) control. Journal of Nanobiotechnology 15 (11): 1477-3155 doi: 10.1186/s12951-016-0234-5
- Ostertag F, Weiss J, McClements DJ (2012) Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. Journal of Colloid and Interface Science 388:95-102 doi:10.1016/j.jcis.2012.07.089
- Pavela R (2015) Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. Industrial Crops and Products 76:174-187 doi:10.1016/j.indcrop.2015.06.050
- Peerzada N (1997) Chemical Composition of the Essential Oil of *Hyptis suaveolens*. Molecules 2(11):165-168 doi:10.3390/21100165
- Rehman JU, Ali A, Khan IA (2014) Plant based products: Use and development as repellents against mosquitoes: A review. Fitoterapia 95:65-74 doi:10.1016/j.fitote.2014.03.002
- Rios Tesch N, et al. (2015) Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oil *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae) from the Venezuelan Plains. Revista Peruana de Biología 22(1):103-107
- Rodrigues EdCR, et al. (2014) Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (*Copaifera duckei*) oleoresin. Revista Brasileira de Farmacognosia 24(6):699-705 doi:10.1016/j.bjp.2014.10.013
- R Development Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing, 3.1.3 edn. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Seo SM, Park HM, Park IK (2012) Larvicidal activity of Ajowan (*Trachyspermum ammi*) and Peru balsam (*Myroxylon pereira*) Oils and Blends of Their Constituents against Mosquito, *Aedes aegypti*, Acute Toxicity on Water Flea, *Daphnia magna*, and Aqueous Residue. J Agric Food Chem 60(23):5909-14 doi:10.1021/jf301296d
- Silva WJ, Dória GAA, Maia RT, Nunes RS, Carvalho GA, Blank AF, Alves PB, Marçal RM, Cavalcanti SCH (2008) Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larva: alternatives to environmentally safe insecticides. Bioresource Technology 99:3251-3255.
- Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ (2005) Nano-emulsions. Current Opinion in Colloid & Interface Science 10(3-4):102-110 doi:10.1016/j.cocis.2005.06.004
- Soonwera M (2015) 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 114(12):4531-4543 doi:10.1007/s00436-015-4699-1
- Suganya G, Karthi S, Shivakumar MS (2014) Larvicidal potential of silver nanoparticles synthesized from *Leucas aspera* leaf extracts against dengue vector *Aedes aegypti* Parasitology Research 113: 1673–1679.
- Sujitha V, Murugan K, Paulpandi M, Panneerselvam C, Suresh U, Roni M, Nicoletti M, Higuchi A, Madhiyazhagan P, Subramaniam J, Dinesh D, Vadivalagan C, Chandramohan B, Alarfaj AA, Munusamy MA, Barnard DR, Benelli G (2015) Greensynthesized silver nanoparticles as a novel control tool against dengue virus (DEN-2) and its primary vector *Aedes aegypti* Parasitology Research 114 (2015) 3315–3325.

- Sugumar S, Clarke SK, Nirmala MJ, Tyagi BK, Mukherjee A, Chandrasekaran N (2014) Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus* Bulletin of Entomological Research 104: 393–402.
- Tennyson S, Ravindran KJ, Arivoli S (2012) Bioefficacy of botanical insecticides against the dengue and chikungunya vector *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine (2012) S1842 - S1844
- Tiethbohl LAC, Barbosa T, Fernandes CP, Santos MG, Machado FP, Santos KT, Mello CB, Araújo HP, Gonzalez MS, Feder D, Rocha L (2014) Laboratory evaluation of the effects of essential oil of *Myrciaria floribunda* leaves on the development of *Dysdercus peruvianus* and *Oncopeltus fasciatus*. Brazilian Journal of Pharmacognosy 24:316-321.
- Van den Dool H, Kratz PD (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. Journal of Chromatography A 11:463-471 doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X)
- Wang L, Li X, Zhang G, Dong J, Eastoe J (2007) Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations. Journal of Colloid and Interface Science 314(1): 230-235 doi:10.1016/j.jcis.2007.04.079
- WHO (2005) Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Communicable disease control, prevention and eradication, WHO pesticide evaluation scheme., Geneva, Switzerland
- WHO (2012) Handbook for Integrated Vector Management. In: World Health Organization WH (ed). Geneva, Switzerland, p 66
- WHO (2015) Neglected tropical diseases - Vector Ecology and Management (VEM). World Health Organization. http://www.who.int/neglected_diseases/vector_ecology/en/
- Veerakumar K, Govindarajan M, Rajeswary M, Muthukumar U (2014) Low-cost and ecofriendly green synthesis of silver nanoparticles using *Feronia elephantum* (Rutaceae) against *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi*, and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Parasitology Research 113: 1775–1785.
- Yadav R, Tyagi V, Tikar SN, Sharma Ak, Mendki MJ, Jain AK, Sukumaran D (2014) Differential larval toxicity and oviposition altering activity of some indigenous plant extracts against dengue and chikungunya vector *Aedes albopictus*. Journal of Arthropod-Borne Diseases 8(2): 174-185.

FIGURES AND TABLES

Fig. 1 Total ion chromatogram of *H. suaveolens* essential oil.

Fig. 2 Droplet size distribution graphs of nanoemulsion prepared with *H. suaveolens* essential oil. Day 0: droplet size = 147.3 ± 1.069 ; polydispersity index = 0.553 ± 0.009 .

Day 1: droplet size = 152.2 ± 1.358 ; polydispersity index = 0.526 ± 0.129 . Day 7: droplet size = 152.7 ± 5.154 ; polydispersity index = 0.497 ± 0.028 .

Table 1 Chemical constituents of *H. suaveolens* essential oil. RI is the retention índice calculated by interpolation to the retention time of n-alkanes (C9-C30) eluted under same experimental conditions.

Compound	RI	%
α -Pinene	932	4.39
Camphene	951	0.94
β -Pinene	972	14.18
α - Terpinene	1019	0.44
Limonene	1028	0.83
1,8- Cineole	1033	26.34
γ - Terpinene	1060	2.05
Fenchone	1093	7.29
Linalool	1103	0.69
<i>exo</i> - Fenchol	1121	10.57
1- Terpeneol	1126	0.48
Camphor	1147	0.86
Isoborneol	1169	1.64
Terpinen-4-ol	1180	1.75
α - Terpeneol	1193	1.26
<i>trans</i> -4-Caranone	1199	0.48
σ -Elemene	1338	3.14
β -Elemene	1392	1.35

E-Caryophyllene	1421	3.5
β -Copaene	1430	0.79
6,9-Guaiadiene	1445	0.4
α -Humulene	1454	0.83
Dauca-5,8-diene	1479	2.8
Bicyclgermacrene	1499	3.56
Allo-Hedycaryol	1586	1.04
Globulol	1594	0.55
α -Cardinol	1657	1.19
TOTAL		93.34

Fig. 1

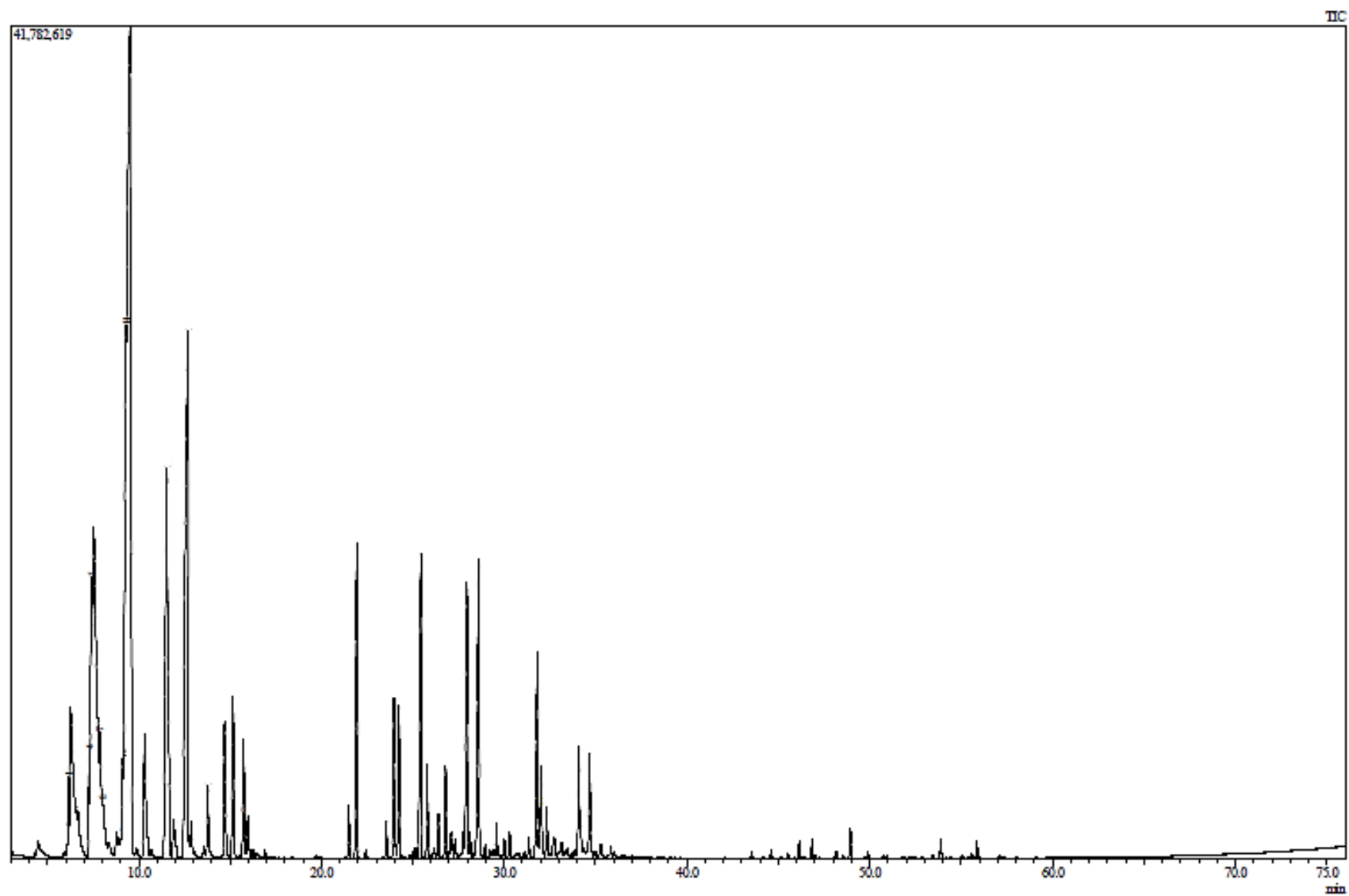
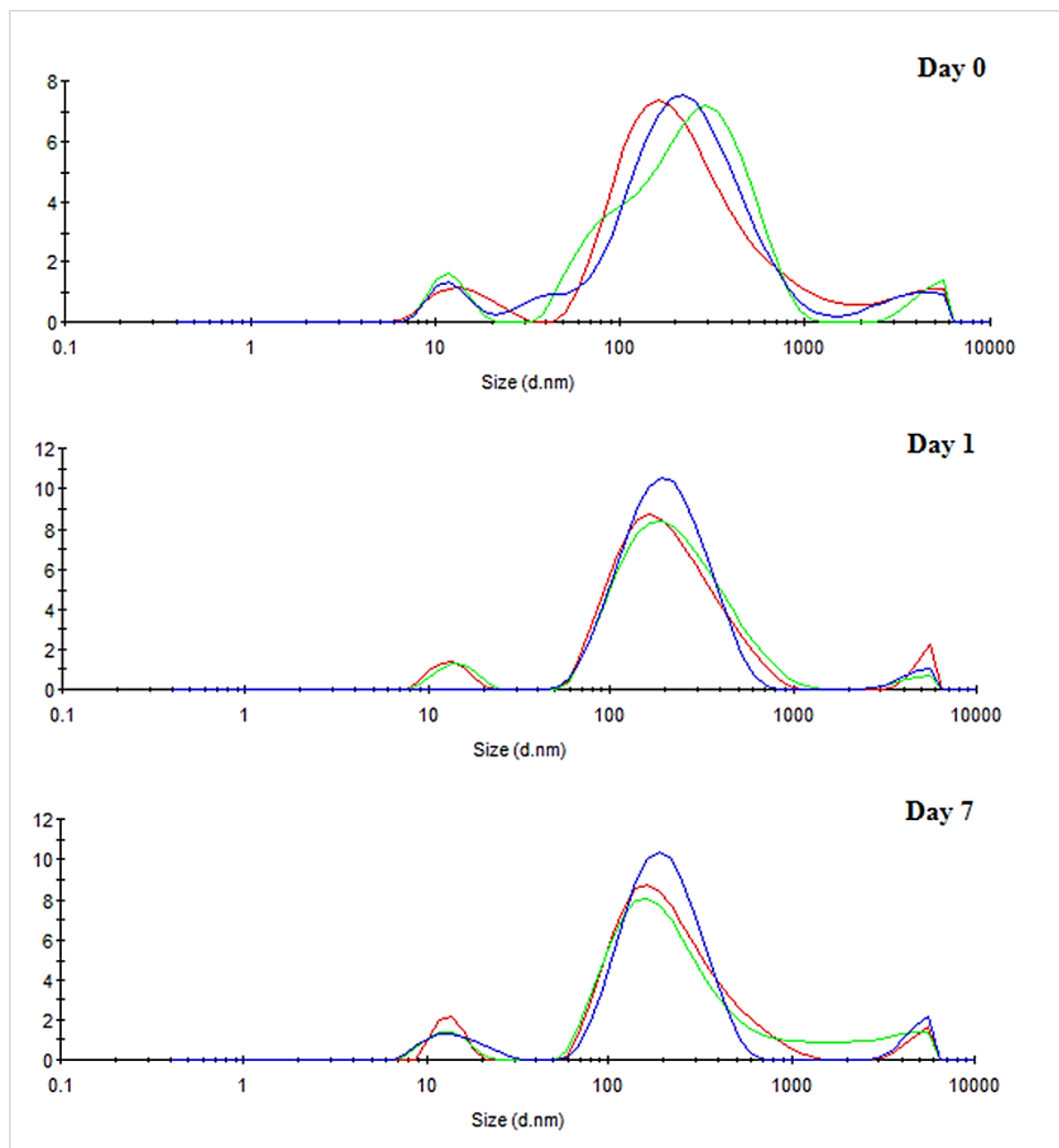


Fig. 2



CAPÍTULO 2 – Efeito larvívica da nanoemulsão do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. contra *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)

Este artigo será submetido ao periódico “Colloids and Surfaces B: Biointerfaces”.

**Efeito larvicida da nanoemulsão do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.)
Poit. contra *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)**

**Taires Peniche¹, Jonatas L. Duarte², Ricardo M. A. Ferreira¹, Igor A. P. Sidônio², Frankli
A. S. Amaral², Rosângela S. F. R. Sarquis⁵, Jéssica Alves², Ícaro R. Sarquis², Anna E. M.
F. M. Oliveira², Rodrigo A. S. Cruz², Irlon M. Ferreira³ Alexandro C. Florentino⁴, José
C. T. Carvalho⁵, Raimundo N. P. Souto¹, Caio P. Fernandes^{2*}**

^a *Laboratório de Artrópodes, Universidade Federal do Amapá, Colegiado de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek Km 02, Jardim Marco Zero, CEP: 68903-419, Macapá, AP, Brazil*

^b *Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica, Colegiado de Farmácia, Universidade Federal do Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek Km 02, Jardim Marco Zero, CEP: 68903-419, Macapá, AP, Brazil*

^c *Universidade Federal do Amapá Grupo de Biocatálise e Biotransformação em Química Orgânica, Universidade Federal do Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek Km 02, Jardim Marco Zero, CEP: 68903-419, Macapá, AP, Brazil*

^d *Laboratório de Absorção Atômica e Bioprospecção, Colegiado de Farmácia, Universidade Federal do Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek Km 02, Jardim Marco Zero, CEP: 68903-419, Macapá, AP, Brazil*

^e *Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Colegiado de Farmácia, Universidade Federal do Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek Km 02, Jardim Marco Zero, CEP: 68903-419, Macapá, AP, Brazil*

**** autor correspondente: caiofernandes@unifap.br**

Resumo

Mosquitos são considerados vetores de patógenos, causando doenças em animais e seres humanos. *Culex quinquefasciatus* é antropofílico e vetor da filariose linfática. Produtos naturais podem ser considerados uma alternativa aos inseticidas sintéticos para o controle de vetores. Neste estudo, o objetivo foi investigar a ação larvicida da nanoemulsão do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* contra *Cx. quinquefasciatus*. O óleo essencial mostrou predominância de monoterpenos com TR inferior a 15 minutos. A média de gotículas das nanoemulsões preparadas com monoleato sorbitano/polisorbato 20 foi ≤ 200 nm. A nanoemulsão avaliada demonstrou alta ação larvicida nas concentrações de 250 e 125 ppm. Valores de CL_{50} foram 102.41 (77.5253 – 149.14) ppm e 70.8105 (44.5282 – 109.811) ppm, para 24 e após 48 horas, respectivamente. A mortalidade no controle com tensoativo ficou abaixo de 9%. As imagens de micrografia de varredura mostraram alterações no tegumento das larvas. O presente trabalho permitiu a obtenção de uma nanoemulsão ativa frente a *Cx. quinquefasciatus*, utilizando-se técnica de baixo aporte energético e sem o uso de solventes orgânicos potencialmente tóxicos. Portanto, abre perspectivas para a utilização do óleo essencial de *H. suaveolens* para a produção de nanosistemas de alto valor agregado para práticas integradas de controle de vetores de doenças tropicais.

Palavras-chave: Culicidae; filariose; hidrodestilação; miniemulsão; sistema nanoestruturado.

1. Introdução

Culex quinquefasciatus Say 1983 é sinantrópico, bem adaptado a ambientes antropizados e peridomiciliares [1]. É um importante vetor da filariose nos trópicos [2] e essa doença pode provocar impactos sócio-econômicos alarmantes às regiões afetadas [3]. A filariose é uma doença tropical negligenciada, estimando-se que cerca de 1 bilhão de pessoas em 54 países vivem em áreas de risco de infecção por microfilárias [4]. No Brasil, é vetor da filariose linfática, também conhecida como elefantíase [5-7] e do vírus Oropouche (OROV), que causa a febre Oropouche. Essa é uma arbovirose presente principalmente na região amazônica [8], recentemente encontrada também em Mato Grosso [9]. A filariose linfática tem distribuição exclusivamente urbana no Brasil [10, 11] e já foi notificada em cidades do Pará, Amazonas, Alagoas, Bahia e Rio Grande do Sul. Hoje, se restringe à região Nordeste, no estado de Pernambuco, com grandes números de casos notificados. O governo criou um plano para erradicação da doença, que visa o tratamento dos pacientes crônicos e o controle do vetor das microfilárias [12]. O controle de *Cx. quinquefasciatus* pode ser difícil, pois em um mesmo país encontram-se populações geneticamente diferentes desses culicídeos [13]. Para diminuir a proliferação dessa espécie, utiliza-se controle biológico ou o controle químico, no qual inseticidas sintéticos à base de piretroides, carbamatos ou organofosforados são diluídos e aplicados nos criadouros [14]. Entretanto, produtos químicos à base dessas substâncias podem resultar em insetos vetores resistentes, toxicidade para indivíduos não-alvo e a emergência de células carcinogênicas em mamíferos [15, 16].

Substâncias naturais provenientes do metabolismo secundário de plantas, produzidas em resposta ao ambiente, surgem como uma alternativa para o desenvolvimento de inseticidas naturais eficientes e amigáveis à natureza [17]. Os óleos essenciais são produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste a vapor d' água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. Geralmente, o grupo químico de

metabólitos secundários que constituem os óleos essenciais são os terpenoides, como monoterpenos e sesquiterpenos [18]. Essas substâncias voláteis que constituem os óleos essenciais possuem diversas atividades biológicas contra insetos, a exemplos de efeitos tóxicos, repelentes, anti-oviposição, inibição da alimentação e mudanças comportamentais [19-22]. Diversos mecanismos de ação podem estar envolvidos, entre eles alterações no sistema colinérgico dos insetos [23]. Estudos envolvendo os efeitos biológicos dos óleos essenciais contra insetos vetores de doenças tem sido desenvolvidos, mostrando-se potencialmente úteis para o manejo integrado de vetores [19, 24].

Hyptis suaveolens (L.) Poit. pertence à família Lamiaceae, que compreende várias espécies de plantas com óleos essenciais bioativos contra insetos [25]. O óleo essencial de *H. suaveolens* tem como seus constituintes majoritários o Sabineno, β -caryophylleno, 4- Terpineol e Terpinoleno, todos terpenoides [26]. Entretanto, a composição e a quantidade desses constituintes podem variar, visto que uma mesma espécie pode apresentar diferentes quimiotipos [27, 28]. O óleo essencial de *H. suaveolens* mostrou ação larvicida e repelente contra insetos da família Culicidae, mostrando o seu potencial para o controle de insetos vetores de doenças [29, 30].

Nanotecnologia é o desenvolvimento de materiais em escala nanométrica, a qual possui aplicações multidisciplinares que contribuem para o avanço tecnológico [31]. Nanoemulsões são sistemas nanoestruturados com tamanho médio das gotículas da fase interna abaixo de 200 nm [32]. Esse sistema é normalmente estabilizado com tensoativos, reduzindo a tensão interfacial e permitindo a dispersão de um líquido imiscível em outro. As nanoemulsões tem como principal característica a estabilidade cinética, sendo mais resistente a processos de perda de estabilidade, como cremagem, sedimentação e separação de fases [33]. Estudos revelam que os efeitos biológicos dos óleos essenciais são potencializados quando nanoencapsulados [34]. Outra vantagem é permitir a dispersão de constituintes lipofílicos em água [35], o que poderia

permitir a aplicação de óleos essenciais em criadouros de Culicidae de forma mais eficiente. As propriedades bioativas de *H. suaveolens* em insetos são restritas a estudos com seus extratos e óleo essencial, não havendo registros de estudos relacionados à obtenção e avaliação de nanoemulsões obtidas a base de produtos dessa espécie. Portanto, no presente estudo, nós avaliamos a atividade larvicida da nanoemulsão do óleo essencial de *H. suaveolens* contra larvas de *Cx. quinquefasciatus*.

2. Material e métodos

2.1. Reagentes

Trioleato de sorbitano, Monoleato de sorbitano e Polisorbato 20 foram adquiridos de Praid Produtos Químicos Ltda (SP, Brasil).

2.2. Material vegetal

Folhas de *Hyptis suaveolens* foram coletadas em Macapá, Amapá, Brasil (00°01'33.7" N e 51°08'56.6" W) durante a estação mais chuvosa. A identificação foi realizada pela botânica Prof. Rosângela S. F. R. Sarquis. O voucher da espécie foi registrado (18856) e depositado no herbário do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (HAMAB).

2.3. Extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* foi realizada por hidrodestilação das folhas (1102.118 g), utilizando-se um aparato do tipo-Clevenger por três horas. Posteriormente o óleo essencial foi coletado e filtrado com sulfato sódico anidro e armazenado a 4°C.

2.4. Análises de Cromatografia gasosa

O óleo essencial de *H. suaveolens* foi analisado utilizando-se um cromatógrafo gasoso GCMS-QP5000 (Shimadzu) equipado com um espectrometro de massas. As condições da análise foram

[36]: temperatura do injetor, 260°C; temperatura do detector, 290°C; gás de arraste, Hélio; taxa de fluxo, 1 ml/min e taxa de injeção 1:40. A temperatura foi inicialmente de 60°C e depois foi incrementada até 290°C, a uma taxa de 3°C/min. Um microlitro da amostra foi dissolvida em diclorometano (1:100 mg/μl) e injetada numa coluna DB-5 (0,25 mm de diâmetro interno, 30 m de comprimento, 0,25 μm e espessura de película). As condições do espectrometro de massas foram: ionização por impacto de eletrons (70 eV), taxa de scan (1 scan/s). Os índices de retenção (IR) foram calculados através da interpolação aos tempos de retenção de uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos (C9-C30) analisados nas mesmas condições [37]. A identificação das substâncias foi realizada comparando os índices de retenção e espectros de massa com dados da literatura [38]. O padrão de fragmentação das substâncias foi também comparado com bibliotecas de espectro de massa NIST. A abundância relativa dos constituintes químicos foi realizada utilizando-se um cromatógrafo gasoso acoplado a detector de ionização de chama (CG/FID), nas mesmas condições anteriores. As percentagens das substâncias foram obtidas pelo método de normalização da área do pico.

2.5. Nano-emulsões

2.5.1. Determinação do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo requerido (EHLr) do óleo de *Hyptis suaveolens*

O Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo requerido (EHLr) foi determinado através da mistura de dois pares de tensoativos não-iônicos: monoleato de sorbitano (EHL 4.3)/polisorbato 20 (EHL 16.7) e polisorbato 20/trioleato de sorbitano (EHL 1.8), obtendo emulsões com EHL igual a 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16,7. O EHLr foi determinado com base no EHL do tensoativo ou mistura de tensoativo capaz de gerar o sistema mais estável.

2.5.2. Método de nanoemulsificação

Foi utilizado um método de baixo aporte de energia [39]. A constituição de cada nanoemulsão foi: 98 % (w/w) de água, 1% de tensoativo (s) (monoleato de sorbitano ou trioleato de sorbitano / polisorbato 20) e 1% de óleo essencial de *H. suaveolens* (massa final = 10g). A fase oleosa (tensoativo (s) + óleo) foi homogeneizada e em seguida foi adicionado água destilada gota a gota sob agitação vigorosa, utilizando-se um agitador do tipo vortex. A caracterização foi realizada imediatamente após a preparação e após 1 e 7 dias de armazenamento sob temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

2.5.3. Caracterização da nano-emulsão de *Hyptis suaveolens*

A distribuição do tamanho de partículas foi determinada pela técnica de espalhamento dinâmico da luz utilizando-se um equipamento Zetasizer ZS (Malvern, Reino Unido). A nano-emulsão foi diluída com água deionizada (1:25 v/v) [40]. As medições foram feitas em triplicata e o tamanho das gotículas e o índice de polidispersão foi expresso pela média e desvio padrão.

2.6. Bioensaio larvicida

Larvas de *Culex quinquefasciatus* foram obtidas do Laboratório de Arthropoda (Universidade Federal do Amapá, Brasil). O ensaio biológico foi realizado sob condições controladas, com manutenção das larvas a 25 ± 2 °C, umidade relativa de 75 ± 5 % e a um ciclo de 12h claro:escuro. A avaliação experimental foi realizada de acordo com o protocolo da Organização Mundial da Saúde (OMS) [41] com algumas modificações. O desenho experimental foi totalmente randomizado em cinco réplicas, com 10 larvas de quarto instar em cada amostra. Nano-emulsões foram diluídas em água destilada a 15.625, 31.25, 62. 25, 125, and 250 ppm (as concentrações expressam o óleo essencial de *H. suaveolens* em meio aquoso). Soluções dos tensoativos utilizados na nanoemulsão avaliada foram diluídas em água destilada nas mesmas concentrações para controle. O grupo controle negativo foi constituído de água destilada. Os níveis de mortalidade foram registrados após 24 e 48 horas de exposição.

2.7. Estudo morfológico das larvas de *Culex quinquefasciatus*

As larvas provenientes do tratamento e do grupo controle foram fixadas em formaldeído (10%) e a morfologia externa foi verificada sob baixo vácuo utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (Tabletop Microscope TM3030Plus - Hitachi, Japan).

2.8. Análises estatísticas

Antes das análises, a mortalidade nos tratamentos foi corrigida para a dos controles, utilizando a fórmula de Abbott [42]. Dados de mortalidade foram submetidos a análise Probit para estimar os valores de CL₅₀ e CL₉₀, utilizando o software Statgraphics Plus software v.5.1 (Stat Easy Co., Minneapolis, USA). O teste ANOVA (two-way), seguido pelo teste Tukey's HSD foi realizado usando o software R [43] e diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0.05$.

3. Resultados

3.1. Óleo essencial de *Hyptis suaveolens*

O rendimento do óleo essencial obtido das folhas de *H. suaveolens* foi 3.455g. O perfil cromatográfico obtido por CG-MS permitiu a verificação de uma predominância de monoterpenos com tempo de retenção (Tr) inferior a 15 min, sendo observados picos cromatográficos referentes a sesquiterpenos com tempo de retenção entre 20 e 30 min (Fig. 1).

3.2. Nano-emulsão de *Hyptis suaveolens*

As nano-emulsões EHL 10, 11, 12 e 13, preparadas com o par de tensoativos trioleato sorbitano/polisorbato 20, apresentaram formação de cremagem após a preparação. Apenas as emulsões EHLr 14, 15 e 16,7 apresentaram reflexo azulado, típico de nanoemulsões (Fig. 2). Os sistemas preparados com o par monoleato sorbitano e polisorbato 20 apresentaram aspecto

mais fino e homogêneo, evidenciado pelo reflexo azulado (EHLr 11, 12, 13, 14, e 15), sendo que a nanoemulsão preparada apenas com polisorbato 20 (EHL = 16,7) apresentou nítida transparência. Após 24h de armazenamento, sinais de instabilidade como sedimentação e separação de fases foram observados nas emulsões EHLr 10 e 16,7. Após sete dias de armazenamento, poucas alterações e baixa formação de cremagem foram observadas nas emulsões EHLr de 11 – 14 (Fig. 3). A nanoemulsão utilizada no ensaio larvicida foi EHL 15 (monoleato sorbitano/polisorbato 20), pois não apresentou sinais de instabilidade e manteve as características iniciais após o período avaliado.

3.2.1. Caracterização das nanoemulsões

As medidas de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações preparadas com o óleo essencial de *H. suaveolens* e o par de tensoativos trioleato sorbitano/polisorbato 20 são mostradas na Tabela 1. Emulsões EHLr 10, 11, 12 e 13 apresentaram média de tamanho de micela acima de 200nm com 793.0 ± 536.9 , 664.5 ± 122.2 , 263.9 ± 15.36 e 255.1 ± 33.26 , respectivamente. Tamanhos de gotícula abaixo de 200 nm, índice de polidispersão abaixo de 0,300 e potencial zeta inferior a -20 mV foram observados para as nanoemulsões preparadas com EHL 14, 15 e 16,7 durante todo o armazenamento.

A Tabela 2 mostra as medidas para o conjunto de nanoformulações feitas com o par de tensoativos monoleato sorbitano/polisorbato 20. Todas foram caracterizadas como nanoemulsões e tiveram medidas ≤ 200 nm. EHLr 16,7 apresentou o maior tamanho (dia 0 = 184.7 ± 8.697 , dia 1 = 185.6 ± 4.046 , dia 2 = 198.7 ± 6.200 e dia 7 = 171.3 ± 4.932). O menor diâmetro foi observado na emulsão EHLr 15 (dia 0 = 69.47 ± 0.6717 , dia 1 = 70.42 ± 0.2055 , dia 2 = 69.31 ± 0.1212 e dia 7 = 67.79 ± 1.040) e pouca variação para o índice de polidispersão (dia 0 = 0.179 ± 0.009 , dia 1 = 0.173 ± 0.004 , dia 2 = 0.177 ± 0.009 e dia 7 = 0.206 ± 0.017), corroborando a análise macroscópica de que essa foi a nanoemulsão com menor tamanho de

gotícula e a mais estável dentre todas obtidas. Portanto, ela foi escolhida para a realização do ensaio larvicida.

3.3. Atividade larvicida da nanoemulsão

A Tabela 3 mostra os resultados da influência da nanoemulsão aquosa de *H. suaveolens* na mortalidade de larvas de *C. quinquefasciatus* em 24 e 48 horas. Baixa mortalidade foi observada no controle com água destilada (2 ± 0.45 %). A percentagem de mortalidade foi 100% para a concentração de 200ppm ($p=0.000000$), nas primeiras 24 horas de experimento. A nanoemulsão de *H. suaveolens* exibiu significativa atividade larvicida. As taxas de mortalidade aumentaram em função do tempo de exposição. A concentração 125ppm ($p=0.000000$), mostrou 78% de mortalidade após 48 horas. O teste ANOVA indicou diferença significativa entre os períodos de exposição ($F_{[1]} = 36.31$ $p \leq 0.001$) e entre os tratamentos ($F_{[20]} = 99.35$ $p \leq 0.001$), com valor de R-quadrado ($R^2 = 0.9583$) e (R^2 ajustado = 0.9484). A estimativa de valores para CL_{50} e CL_{90} com limite abaixo e limite acima, foram 102.41 (77.5253 – 149.14) ppm e 168.033 (129.738 – 281.681) ppm, respectivamente para 24 horas e 70.8105 (44.5282 – 109.811) ppm e 144.947 (107.148 – 275.553) ppm após 48 horas. Os valores de Chi-quadrado para 24 e 48 horas foram $X^2(1) = 34.1769$ ($p=0.0000$) e $X^2(1) = 25.4694$ ($p=0.0000$), respectivamente.

A mortalidade induzida pelas concentrações do surfactante ficou abaixo de 9%, dados mostrados na Tabela 4. Os valores do Chi-quadrado para 24 e 48 horas foram ($X^2(1) = 0.137867$ $p=0.7104$) e ($X^2(1) = 0.347238$ $p=0.5557$), respectivamente, indicando que não é possível estimar a CL_{50} . Além disso, não houve diferença significativa entre as mortalidades nos grupos tratados com tensoativos sob diferentes concentrações ($p > 0.05$).

3.4. Estudo morfológico das larvas de *Culex quinquefasciatus*

As imagens de micrografia eletrônica em larvas de *Cx. quinquefasciatus* mortas no tratamento com a nanoemulsão do óleo de *H. suaveolens* (Fig. 3 D-F), demonstraram alterações na

estrutura da cutícula, encurtamento das cerdas, achatamento da cápsula cefálica (H) e desintegração dos segmentos do abdômen (AB). O sifão (S) não sofreu alterações evidentes. Os resultados sugerem um efeito tóxico da nanoemulsão de *H. suaveolens*. As larvas do controle permaneceram com aparência normal (Fig. 3 A-C).

4. Discussão

A nano-emulsão de *H. suaveolens* demonstrou neste estudo potencial larvicida contra *Cx. quinquefasciatus*. Estudos que suportam estes resultados foram realizados com algumas espécies do gênero *Hyptis*, testadas em larvas de mosquitos vetores. Tennyson, Ravindran and Arivoli [44] avaliaram extratos de *H. suaveolens* com diferentes solventes contra larvas de *Ae. aegypti*, e os menores valores de CL₅₀ e CL₉₀ foram 543.66 e 3546.69ppm, respectivamente em 24 horas para o hexano. Extratos de *H. suaveolens* (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) mostraram resultados semelhantes aos encontrados neste estudo, quando foram testados contra o terceiro instar larval de *Cx. quinquefasciatus*, com os valores de CL₅₀ respectivamente, 213.09, 217.64, 167.59 e 86.93ppm [45]. Os óleos essenciais de *Hyptis pectinata* e *H. fruticosa* apresentaram valores de CL₅₀ 366 e 502, respectivamente contra *A. aegypti* [46].

Efeito larvicida do óleo essencial de *H. suaveolens* foi observado em *Aedes albopictus*, com um percentual de mortalidade de 65% na concentração de 250ppm e CL₅₀ = 240.3ppm [29]. Adicionalmente, outros produtos de origem vegetal são mostrados como promissores larvicidas. Nanoformulações com óleos naturais têm sido estudadas para atividade larvicida em mosquitos vetores [47]. Duarte et al. [48] relataram 90% de mortalidade em larvas de *A. aegypti*, quando tratadas com a nano-emulsão, contendo polisorbato 20 e óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*. Resultados em larvas de *A. aegypti* (CL₅₀ = 34.75) e *Cx. quinquefasciatus* (CL₅₀ =

56.70ppm) foram observados, com nano-emulsões de *Pterodon emaerginatus* produzidas também pelo método de baixo aporte de energia [49, 50].

Nanoformulações de *Azadirachta indica* (neem) em diferentes proporções de óleo e tensoativo (polisorbato 20) (1:0.30, 1:1.5 e 1:3) e média de tamanhos 31.03 para 251.43 nm, foram testadas contra *Cx. quinquefasciatus* e demonstraram valores baixos para $CL_{50} = 11.75 \text{mgL}^{-1}$ [51]. Sugumar et al. [52] observaram alterações histológicas no intestino de larvas de *Cx. quinquefasciatus* expostas a nano-emulsão de *Eucalyptus*. Entretanto foram utilizados métodos de alta energia.

Imagens de micrografia de varredura podem ser utilizadas para estudo morfológico de insetos [53, 54]. Os resultados encontrados neste estudo corroboram o estudo morfológico em larvas de *Cx. quinquefasciatus* encontrados por Oliveira et al. [50], onde as larvas apresentaram achatamento das regiões do tórax e abdômen. Algumas alterações semelhantes foram encontradas por Chaithong et al. [55], provocadas nas papilas anais em larvas do mosquito *Ae. aegypti* expostas ao extrato etanólico de três espécies do gênero *Pipper*. Alterações no tegumento podem inferir em danos nos órgãos internos das larvas. Entretanto, não é possível afirmar como causa da mortalidade. São poucos os estudos com imagens de varredura para mostrar os efeitos dos produtos de origem vegetal, em larvas de mosquitos vetores. As alterações comumente são evidenciadas por histologia. O extrato de *Magonia pubescens* induziu alterações em células epiteliais do tubo digestivo de larvas de *A. aegypti* [56]. De acordo com Kasai et al. [57] a penetração através da cutícula é um dos mecanismos de ação de inseticidas. Existem outros fatores que podem ser relacionados à atividade larvicida em mosquitos, como por exemplo, inibição de enzimas [58] e efeitos deterrentes [59, 60].

5. Conclusão

Produtos naturais podem ser considerados uma alternativa aos inseticidas sintéticos para o controle de vetores. Devido à baixa solubilidade em água de muitas dessas substâncias provenientes do metabolismo secundário de plantas, como os constituintes de óleos essenciais, a preparação de nano-emulsões do tipo óleo em água é extremamente promissora. O presente trabalho permitiu a obtenção de uma nanoemulsão ativa frente a *Culex quinquefasciatus*, utilizando uma técnica de baixo aporte energético e sem o uso de solventes orgânicos potencialmente tóxicos. Portanto, abre perspectivas para a utilização do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* para a produção de nanosistemas de alto valor agregado para práticas integradas de controle de vetores de doenças tropicais.

Referências

- [1] L.B. Amorim, E. Helvecio, C.M. Fontes de Oliveira, C.F. Junqueira Ayres, Susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) populations to the chemical insecticide temephos in Pernambuco, Brazil, *Pest Management Science*, 69 (2013) 1307-1314.
- [2] R.E. Harbach, Classification within the cosmopolitan genus *Culex* (Diptera: Culicidae): The foundation for molecular systematics and phylogenetic research, *Acta Tropica*, 120 (2011) 1-14.
- [3] BRASIL, Boletim Epidemiológico - Situação epidemiológica da filariose linfática no Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Brasília, DF, Brasil, 2016, pp. 5.
- [4] W.H.O. WHO, Lymphatic Filariasis, 2017.
- [5] E. Brandao, C. Bonfim, A. Alves, C. Oliveira, C.E. Montenegro, T. Costa, A. Maciel, Z. Medeiros, Lymphatic filariasis among children and adolescents: spatial identification via socio-environmental indicators to define priority areas for elimination, *International Health*, 7 (2015) 324-331.
- [6] R.L. Korte, G. Fontes, J.d.S. Almeida Aranha Camargo, E.M. Mauricio da Rocha, E.A. Cavalcante de Araujo, M.Z. de Oliveira, R.V. dos Santos, L.M. Aranha Camargo, Survey of *Bancroftian filariasis* infection in humans and *Culex* mosquitoes in the western Brazilian Amazon region: implications for transmission and control, *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 46 (2013) 214-220.

- [7] G. Fontes, A.B. Leite, A.R. Vasconcelos de Lima, H. Freitas, J.P. Ehrenberg, E.M. Mauricio da Rocha, Lymphatic filariasis in Brazil: epidemiological situation and outlook for elimination, *Parasites & Vectors*, 5 (2012).
- [8] L.T.M. Figueiredo, Emergent arboviruses in Brazil, *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 40 (2007) 224-229.
- [9] B.F. Cardoso, O.P. Serra, L.B. da Silva Heinen, N. Zuchi, V.C. de Souza, F.G. Naveca, M.A. Mendes dos Santos, R.D. Shessarenko, Detection of Oropouche virus segment S in patients and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil, *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110 (2015) 745-754.
- [10] E.M.M. Rocha, G. Fontes, *Bancroftian filariasis* in Brazil, *Revista De Saude Publica*, 32 (1998) 98-105.
- [11] P.E. Simonsen, M.E. Mwakitalu, Urban lymphatic filariasis, *Parasitology Research*, 112 (2013) 35-44.
- [12] OPAS/OMS, O Brasil avança para a eliminação da transmissão da Filariose Linfática, Brasília, DF, Brasil, 2014.
- [13] A.B.B. Wilke, P.O. Vidal, L. Suesdek, M.T. Marrelli, Population genetics of neotropical *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), *Parasites & Vectors*, 7 (2014).
- [14] BRASIL, Guia de vigilância do *Culex quinquefasciatus*, in: D.d.V. Epidemiológica (Ed.), Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde, Brasília, DF, Brasil, 2011, pp. 76.
- [15] H. van den Berg, M. Zaim, R.S. Yadav, A. Soares, B. Ameneshewa, A. Mnzava, J. Hii, A.P. Dash, M. Ejov, Global Trends in the Use of Insecticides to Control Vector-Borne Diseases, *Environmental Health Perspectives*, 120 (2012) 577-582.
- [16] S. Selmi, S. El-Fazaa, N. Gharbi, Oxidative stress and alteration of biochemical markers in liver and kidney by malathion in rat pups, *Toxicology and Industrial Health*, 31 (2015) 783-788.
- [17] S. Miresmailli, M.B. Isman, Botanical insecticides inspired by plant-herbivore chemical interactions, *Trends in Plant Science*, 19 (2014) 29-35.
- [18] C.O. Simões, V. Spitzer, Óleos Voláteis, in: E.P.S. C. O. Simões, G. Gosmann, J. P. Mello, L. A. Mentz, and P. R. Petrovick (Ed.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. , 2010.
- [19] A. Amer, H. Mehlhorn, Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae), *Parasitology Research*, 99 (2006) 466-472.
- [20] J.U. Rehman, A. Ali, I.A. Khan, Plant based products: Use and development as repellents against mosquitoes: A review, *Fitoterapia*, 95 (2014) 65-74.

- [21] L. Bacci, J.K.A. Lima, A.P.A. Araujo, A.F. Blank, I.M.A. Silva, A.A. Santos, A.C.C. Santos, P.B. Alves, M.C. Picanco, Toxicity, behavior impairment, and repellence of essential oils from pepper-rosmarin and patchouli to termites, *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 156 (2015) 66-76.
- [22] K. Sukumar, M.J. Perich, L.R. Boobar, BOTANICAL DERIVATIVES IN MOSQUITO CONTROL A REVIEW, *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7 (1991) 210-237.
- [23] R.S. Rattan, Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin, *Crop Protection*, 29 (2010) 913-920.
- [24] C.N. Dias, L.P. Lima Alves, K.A. da Franca Rodrigues, B.M.C. Aranha, C.S. Rosa, F.M. Mendonca do Amaral, O.S. Monteiro, E.H. de Aguiar Andrade, J.G. Soares Maia, D.F. Coutinho Moraes, Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils Extracted from Brazilian Legal Amazon Plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae), *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (2015).
- [25] G. Benelli, G. Flamini, A. Canale, P.L. Cioni, B. Conti, Toxicity of some essential oil formulations against the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae), *Crop Protection*, 42 (2012) 223-229.
- [26] A. Canale, G. Benelli, B. Conti, G. Lenzi, G. Flamini, A. Francini, P.L. Cioni, Ingestion toxicity of three Lamiaceae essential oils incorporated in protein baits against the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera Tephritidae), *Natural Product Research*, 27 (2013) 2091-2099.
- [27] N.R. Azevedo, I.F.P. Campos, H.D. Ferreira, T.A. Portes, J.C. Seraphin, J.R. de Paula, S.C. Santos, P.H. Ferri, Essential oil chemotypes in *Hyptis suaveolens* from Brazilian Cerrado, *Biochemical Systematics and Ecology*, 30 (2002) 205-216.
- [28] N.R. Azevedo, I.F.P. Campos, H.D. Ferreira, T.A. Portes, S.C. Santos, J.C. Seraphin, J.R. Paula, P.H. Ferri, Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*, *Phytochemistry*, 57 (2001) 733-736.
- [29] B. Conti, G. Benelli, G. Flamini, P.L. Cioni, R. Profeti, L. Ceccarini, M. Macchia, A. Canale, Larvicidal and repellent activity of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) essential oil against the mosquito *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae), *Parasitol Research*, 110 (2012) 2013-2021.
- [30] A.Z. Abagli, T.B.C. Alavo, F. Avlessi, M. Moudachirou, Potential of the Bush Mint, *Hyptis suaveolens* Essential Oil for Personal Protection Against Mosquito Biting, *J Am Mosq Control Assoc*, 28 (2012) 15-19.

- [31] P. Satalkar, B.S. Elger, D.M. Shaw, Defining Nano, Nanotechnology and Nanomedicine: Why Should It Matter?, *Science and Engineering Ethics*, 22 (2016) 1255-1276.
- [32] F. Ostertag, J. Weiss, D.J. McClements, Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion, *Journal of Colloid and Interface Science*, 388 (2012) 95-102.
- [33] D.J. McClements, Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities, *Soft Matter*, 8 (2012) 1719-1729.
- [34] G.E. Nenaah, S.I.A. Ibrahim, B.A. Al-Assiuty, Chemical composition, insecticidal activity and persistence of three Asteraceae essential oils and their nanoemulsions against *Callosobruchus maculatus* (F.), *Journal of Stored Products Research*, 61 (2015) 9-16.
- [35] C. Solans, P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar, M.J. Garcia-Celma, Nano-emulsions, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10 (2005) 102-110.
- [36] L.A.C. Tietbohl, T. Barbosa, C.P. Fernandes, M.G. Santos, F.P. Machado, K.T. Santos, C.B. Mello, H.P. Araújo, M.S. Gonzalez, D. Feder, L. Rocha, Laboratory evaluation of the effects of essential oil of *Myrciaria floribunda* leaves on the development of *Dysdercus peruvianus* and *Oncopeltus fasciatus*, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24 (2014) 316-321.
- [37] H. Van den Dool, P.D. Kratz, A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography, *Journal of Chromatography A*, 11 (1963) 463-471.
- [38] R.P. Adams, Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, fourth ed. ed., Allured Publishing, Carol Stream, Illinois, 2007.
- [39] A.E.M.F.M. Oliveira, J.L. Duarte, R.A.S. Cruz, E.C.d. Conceição, J.C.T. Carvalho, C.P. Fernandes, Utilization of dynamic light scattering to evaluate *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion formation by non-heating and solvent-free method, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, (2017).
- [40] C.P. Fernandes, M.P. Mascarenhas, F.M. Zibetti, B.G. Lima, R.P.R.F. Oliveira, L. Rocha, D.Q. Falcão, HLB value, an important parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23 (2013) 108-114.
- [41] WHO, Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides, Geneva, Switzerland, 2005.
- [42] W.S. Abbott, A method of computing the effectiveness of an insecticide, *Journal of Economic Entomology*, 18 (1925) 265–267.
- [43] R Core Team, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016.

- [44] S. Tennyson, K.J. Ravindran, S. Arivoli, Bioefficacy of botanical insecticides against the dengue and chikungunya vector *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (2012) S1842-S1844.
- [45] K. Kovendan, K. Murugan, C. Panneerselvam, P. Mahesh Kumar, D. Amerasan, J. Subramaniam, S. Vincent, D.R. Barnard, Laboratory and field evaluation of medicinal plant extracts against filarial vector, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae), *Parasitol Res*, 110 (2012) 2105-2115.
- [46] W.J. Silva, G.A.A. Dória, R.T. Maia, R.S. Nunes, G.A. Carvalho, A.F. Blank, P.B. Alves, R.M. Marçal, S.C.H. Cavalcanti, Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides, *Bioresource Technology*, 99 (2008) 3251-3255.
- [47] G.A. Islan, M. Durán, M.L. Cacicedo, G. Nakazato, R.K.T. Kobayashi, D.S.T. Martinez, G.R. Castro, N. Durán, Nanopharmaceuticals as a solution to neglected diseases: Is it possible?, *Acta Tropica*, 170 (2017) 16-42.
- [48] J.L. Duarte, J.R.R. Amado, A.E.M.F.M. Oliveira, R.A.S. Cruz, A.M. Ferreira, R.N.P. Souto, D.Q. Falcão, J.C.T. Carvalho, C.P. Fernandes, Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25 (2015) 189-192.
- [49] A.E.M.F.M. Oliveira, J.L. Duarte, J.R.R. Amado, R.A.S. Cruz, C.F. Rocha, R.N.P. Souto, R.M.A. Ferreira, K. Santos, E.C. da Conceição, L.A.R. de Oliveira, A. Kelecom, C.P. Fernandes, J.C.T. Carvalho, Development of a Larvicidal Nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel Oil, *PLoS ONE*, 11 (2016) e0145835.
- [50] A.E.M.F.M. Oliveira, J.L. Duarte, R.A.S. Cruz, R.N.P. Souto, R.M.A. Ferreira, T. Peniche, E.C. da Conceição, L.A.R. de Oliveira, S.M.M. Faustino, A.C. Florentino, J.C.T. Carvalho, C.P. Fernandes, *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion as a promising tool for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) control, *Journal of Nanobiotechnology*, 15 (2017) 11.
- [51] C.H. Anjali, Y. Sharma, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran, Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsion - a potent larvicidal agent against *Culex quinquefasciatus*, *Pest Management Science*, 68 (2012) 158-163.
- [52] S. Sugumar, S.K. Clarke, M.J. Nirmala, B.K. Tyagi, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran, Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*, *Bulletin of Entomological Research*, 104 (2014) 393-402.

- [53] L.B. Cortinhas, P.M. Mendonça, R.R. Barbosa, M.M.d.C. Queiroz, Ultrastructure of immature stages of the black dump fly: *Ophyra aenescens* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Muscidae: Azeliinae), *Acta Tropica*, 158 (2016) 125-129.
- [54] A. da-Silva-Xavier, M.M. de Carvalho Queiroz, Ultrastructure analysis of the immature stages of *Ravinia belforti* (Diptera: Sarcophagidae), a species of medical-veterinary and forensic importance, by scanning electron microscopy, *Acta Tropica*, 159 (2016) 192-199.
- [55] U. Chaithong, W. Choochote, K. Kamsuk, A. Jitpakdi, P. Tippawangkosol, D. Chaiyasit, D. Champakaew, B. Tuetun, B. Pitasawat, Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), *J Vector Ecol*, 31 (2006).
- [56] W. Arruda, G.M.C. Oliveira, I.G.d. Silva, Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36 (2003) 17-25.
- [57] S. Kasai, O. Komagata, K. Itokawa, T. Shono, L.C. Ng, M. Kobayashi, T. Tomita, Mechanisms of Pyrethroid Resistance in the Dengue Mosquito Vector, *Aedes aegypti*: Target Site Insensitivity, Penetration, and Metabolism, *Plos Neglected Tropical Diseases*, 8 (2014) e2948.
- [58] M.S. Oliveira, S.M. Morais, D.V. Magalhaes, W.P. Batista, I.G. Vieira, A.A. Craveiro, J.E. Manezes, A.F. Carvalho, G.P. Lima, Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents, *Acta Trop*, 117 (2011).
- [59] R. Yadav, V. Tyagi, S.N. Tikar, A.K. Sharma, M.J. Mendki, A.K. Jain, S. Devanathan, Differential Larval Toxicity and Oviposition Altering Activity of Some Indigenous Plant Extracts against Dengue and Chikungunya Vector *Aedes albopictus*, *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 8 (2014) 174-185.
- [60] K. Veerakumar, M. Govindarajan, Adulticidal properties of synthesized silver nanoparticles using leaf extracts of *Feronia elephantum* (Rutaceae) against filariasis, malaria, and dengue vector mosquitoes, *Parasitol Res*, 113 (2014).

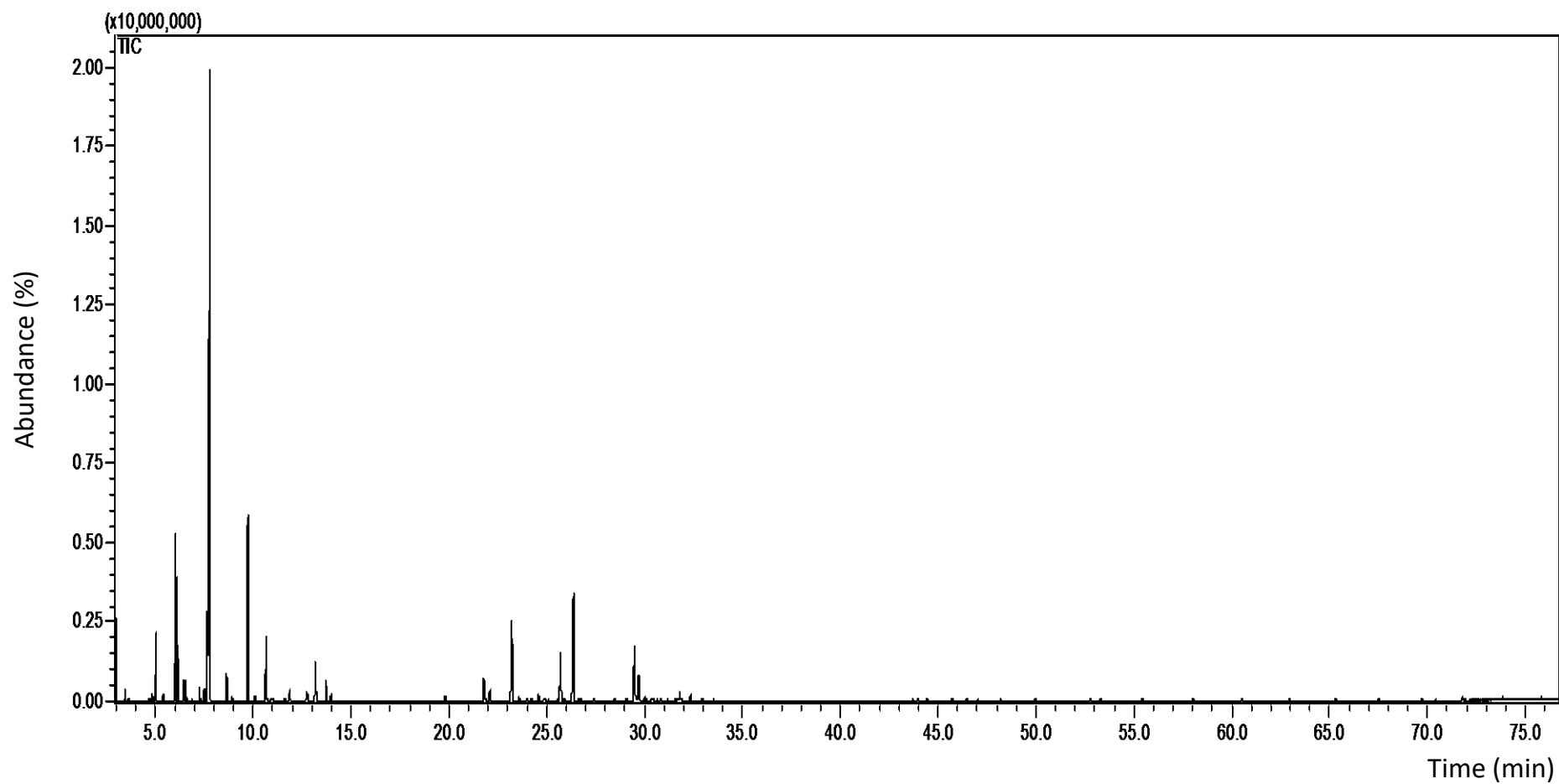


Fig.1. Cromatograma do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* obtido através de análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.



Fig.2. Conjunto de emulsões preparadas com óleo essencial de *H. suaveolens* e os surfactantes trioleato sorbitano/polisorbato 20 a diferentes taxas (da direita para esquerda: EHLr 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16.7). A: dia 0 de preparação e B: após o dia 7 de armazenamento das nano-emulsões.



Fig. 3. Conjunto de emulsões preparadas com óleo essencial de *H. suaveolens* e os surfactantes monoleato sorbitano e polisorbato 20 a diferentes taxas (da direita para esquerda: EHLr 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16.7), em destaque o EHL 15, nanoformulação utilizada no bioensaio. A: dia 0 de preparação e B: após o dia 7 de armazenamento das nano-emulsões.

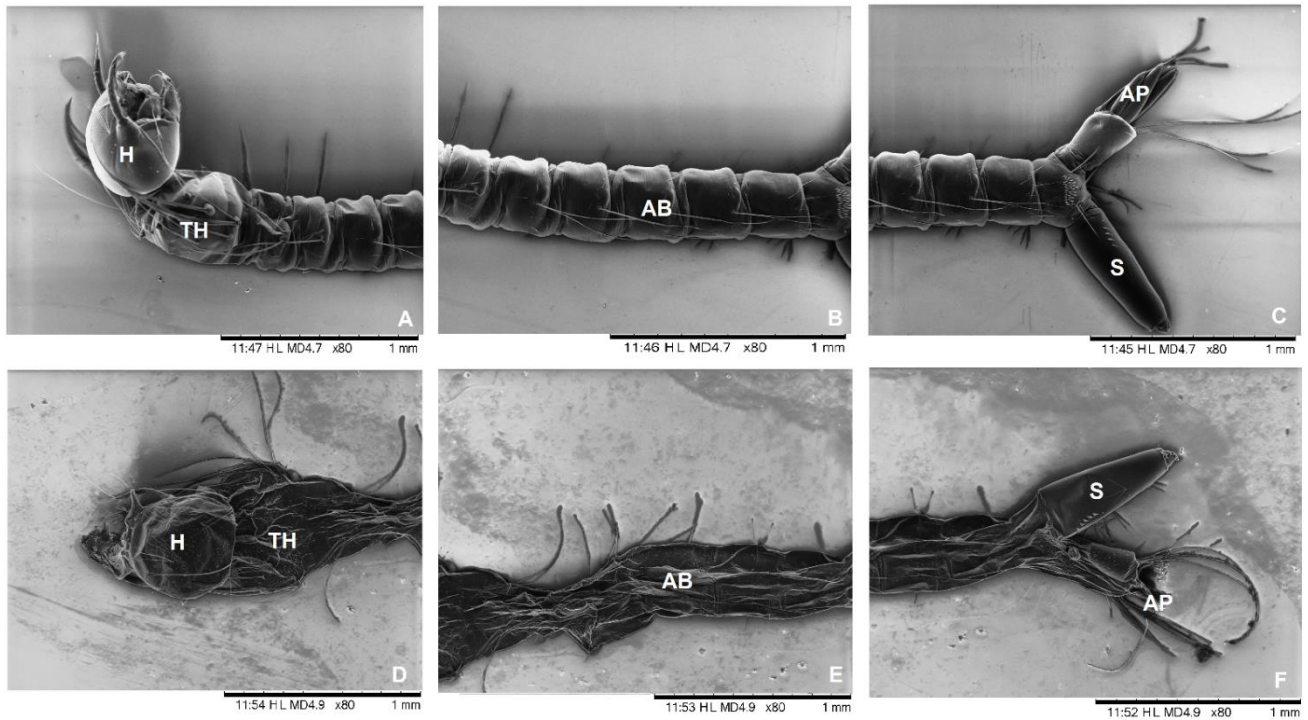


Fig. 4. Micrografia eletrônica de varredura de larvas de *Culex quinquefasciatus*. Larvas com aparência normal no controle (A-C). Alterações mostradas nas larvas tratadas com a nanoemulsão de *H. suaveolens* (250ppm) (D-F). Danos em toda a extensão da cutícula, exceto sifão e cabeça. Cabeça (H), tórax (TH), abdômen (AB), sifão (S) e papilas anais (AP).

Tabela 1 Média do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta (mV) das emulsões preparadas para determinar o EHLr do óleo de *H. suaveolens* com o par de tensoativos trioleato sorbitano e polisorbato 20 (EHLr 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16.7).

	DIA 0				DIA 1			DIA 2			DIA 7		
	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Size (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	
EHL 10	793.0±536.9	0.961±0.068	-37.6±0.814	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
EHL 11	664.5±122.2	0.866±0.167	-33.9±0.306	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
EHL 12	263.9±15.36	0.638±0.070	-31.0±1.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
EHL 13	255.1±33.26	0.472±0.052	-32.7±0.458	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
EHL 14	144.0±1.358	0.258±0.003	-32.2±0.252	143.0±0.5859	0.251±0.002	-28.9±1.31	140.5±0.2517	0.249±0.017	-30.7±0.404	142.9±1.967	0.256±0.010	-36.2±0.04899	
EHL 15	114.2±1.069	0.222±0.008	-23.8±0.757	114.0±1.206	0.221±0.010	-19.5±0.346	115.7±0.05774	0.212±0.008	-25.9±1.10	112.2±0.1528	0.220±0.007	-27.8±0.889	
EHL 16.7	146.3±0.6506	0.144±0.012	-23.9±1.95	160.8±1.229	0.161±0.013	-21.2±1.81	169.3±0.8660	0.164±0.006	-21.5±0.436	146.7±0.05774	0.149±0.007	-21.8±0.850	

PDI – Índice de Polidispersão.

Dados são expressos pela média e desvio padrão (n=3, média±DP)

Tabela 2 Tamanho médio das micelas, índice de polidispersão e potencial zeta (mV) das emulsões com óleo essencial de *H. suaveolens* com o par de tensoativos monoleato sorbitano e polisorbato 20 (EHLr 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16.7).

	DIA 0			DIA 1			DIA 2			DIA 7		
	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Size (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
EHL 10	184.7±8.697	0.402±0.005	-50.5±1.08	185.6±4.046	0.441±0.043	-50.5±0.656	198.7±6.200	0.433±0.074	-47.5±1.36	171.3±4.932	0.442±0.021	-43.3±0.624
EHL 11	75.97±0.2203	0.130±0.005	-37.3±2.91	76.30±0.5577	0.142±0.011	-48.1±3.50	76.59±0.4508	0.145±0.015	-45.8±2.44	77.43±0.09539	0.144±0.011	-41.0±2.41
EHL 12	77.70±0.2570	0.194±0.013	-34.8±1.46	78.04±0.6915	0.198±0.002	-43.6±4.16	79.14±0.7842	0.207±0.011	-40.7±1.55	78.26±0.2750	0.188±0.003	-45.4±0.985
EHL 13	81.95±0.2793	0.166±0.009	-19.4±0.764	82.73±0.2581	0.169±0.007	-23.8±1.42	81.78±0.5977	0.175±0.004	-26.5±0.702	83.02±0.8981	0.172±0.005	-29.9±1.36
EHL 14	78.14±0.2346	0.244±0.006	-25.0±1.06	76.87±0.4140	0.232±0.006	-30.1±3.38	76.29±0.1970	0.230±0.005	-29.2±4.08	74.96±0.3057	0.236±0.008	-34.4±3.52
EHL 15	69.47±0.6717	0.179±0.009	-19.4±1.14	70.42±0.2055	0.173±0.004	-22.7±3.78	69.31±0.1212	0.177±0.009	-25.6±3.77	67.79±1.040	0.206±0.017	-28.4±1.06
EHL 16.7	134.4±1.300	0.163±0.017	-25.2±1.23	173.4±1.436	0.191±0.015	-28.7±1.27	173.5±1.234	0.175±0.019	-23.7±0.153	162.6±0.8505	0.182±0.013	-24.4±0.306

PDI – Índice de Polidispersão.

Dados são expressos pela média e desvio padrão (n=3, média±DP)

Tabela 3 Mortalidade (%) de larvas de *Culex quinquefasciatus* após o tratamento com a nano-emulsão (EHL 15) do óleo essencial de *Hyptis suaveolens*.

Tempo de exposição (h)	Controle (água destilada)	CONCENTRAÇÕES				
		15.625 ppm	31.25 ppm	62.5 ppm	125 ppm	250 ppm
24	0 ^a	2 ± 0.45 ^a	6 ± 0.55 ^b	32 ± 0.84 ^c	62 ± 0.84 ^d	100±0 ^e
48	2 ± 0.45 ^a	12 ± 0.45 ^b	20 ± 0.71 ^b	62 ± 0.84 ^c	78 ± 0.84 ^{cd}	100±0 ^{de}

Valores são a média das cinco réplicas e desvio padrão (média±DP)

Média na mesma linha com diferentes sobrescritos indicam diferença significativa ($p < 0.05$)

Tabela 4 Níveis de mortalidade (%) de larvas de *Culex quinquefasciatus* expostas a diferentes concentrações dos surfactantes monoleato sorbitano e polisorbato 20.

Valores são a média das cinco réplicas e desvio padrão (média±DP)




Tempo de exposição (h)	Controle (água destilada)	TENSOATIVO					
		15.625ppm	31.25ppm	62.5ppm	125ppm	250ppm	
24	0	0	2±0.45	0	4±0.55	2±0.45	ns
48	2±0.45	0	4±0.55	4±0.89	8±0.84	6±0.89	ns


^{ns} Sem diferença significativa ($p>0.05$)


5. CONCLUSÕES

- O óleo essencial de *Hyptis suaveolens* é constituído por monoterpenos e sesquiterpenos. 1,8- cineol é a substância marjoritária.
- A nanoemulsão do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* possui ação larvicida em *Aedes aegypti*.
- O valor do equilíbrio hidrófilo lipófilo requerido (EHLr) do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* foi 15.
- A nanoemulsão otimizada foi capaz de induzir a mortalidade em larvas de *Culex quinquefasciatus*.
- Este trabalho permitiu a obtenção de uma nanoemulsão ativa frente a larvas de mosquitos, utilizando uma técnica de baixo aporte energético e sem o uso de solventes orgânicos potencialmente tóxicos. Portanto, abre perspectivas para a utilização do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* para a produção de nanosistemas de alto valor agregado para práticas integradas de controle de vetores de arboviroses e doenças tropicais.

ANEXO 1. CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO

 Parasitology Research <em@editorialmanager.com> 29 de jan ☆  

 para mim ▾

 inglês ▾ > português ▾ [Traduzir mensagem](#) [Desativar para: inglês x](#)

Re: "Novel aqueous nanoemulsion prepared with Hyptis suaveolens (L.) Poit. essential oil: a promising larvicidal agent in integrated control practices against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)"
Full author list: Taires Peniche; Jonatas Lobato Duarte; Igor Andrey Pinheiro Sidônio; Frankli Alan Souza Amaral; Ícaro Rodrigues Sarquis; Rosângela Socorro Ferreira Rodrigues Sarquis; Rodrigo Alves Soares Cruz; Anna Eliza Maciel de Faria Mota Oliveira; Ricardo Marcelo dos Anjos Ferreira; Leandro Rocha; Luis Armando Candido Tietbohl; Alexandre Cezar Florentino; José Carlos Tavares Carvalho; Caio Fernandes; Raimundo Nonato Picanço Souto

Dear Ms Taires Peniche,

We have received the submission entitled: "Novel aqueous nanoemulsion prepared with Hyptis suaveolens (L.) Poit. essential oil: a promising larvicidal agent in integrated control practices against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)" for possible publication in Parasitology Research, and you are listed as one of the co-authors.


The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Caio Fernandes who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office



Parasitology Research

