

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

**EFETIVIDADE DE FORMULAÇÕES NANOESTRUTURADAS COM DILAPIOL
(*Piper aduncum* Linnaeus, 1753) E PIRETRÓIDES NO CONTROLE DE *Anopheles
darlingi* Root, 1926**

ERIKA DE OLIVEIRA GOMES

MANAUS - AMAZONAS
07/2012

ERIKA DE OLIVEIRA GOMES

**EFETIVIDADE DE FORMULAÇÕES NANOESTRUTURADAS COM DILAPIOL
(*Piper aduncum* Linnaeus, 1753) E PIRETRÓIDES NO CONTROLE DE *Anopheles
darlingi* Root, 1926**

ORIENTADOR: Wanderli Pedro Tadei – INPA

CO-ORIENTADOR: Antônio Claudio Tedesco – Ribeirão Preto/ USP

FONTE FINANCIADORA: CAPES, PRONEX - Rede Malária.

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Entomologia).

MANAUS - AMAZONAS
07/2012

BANCA EXAMINADORA

Dissertação Defendida em 30/07/2012

Maria das Graças Vale Barbosa

Fundação de Medicina Tropical Doutor Vieira Dourado – FMT-HVD

Ruth Leila Ferreira Keppler

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Eloy Guillermo C. Bermudéz

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Jansen Fernandes de Medeiros

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Beatriz Ronchi Teles

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

G633 Gomes, Erika de Oliveira
Efetividade de Formulações Nanoestruturadas com dilapiol (*Piper aduncum* Linnaeus, 1753) e piretróides no controle de *Anopheles darlingi* Root, 1926, principal vetor da Malária na Amazônia / Erika de Oliveira Gomes.---Manaus : [s.n.], 2012.
xvi, 105 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) --- INPA, Manaus, 2012
Orientador : Wanderli Pedro Tadei
Coorientador : Antônio Claudio Tedesco
Área de concentração : Entomologia

1. *Anopheles*. 2. Nanotecnologia. 3. Controle vetorial. 4. *Piper aduncum*.
5. Bioinseticida. Malária. I. Título.

CDD 19. ed. 595.77

SINOPSE:

Avaliaram-se sistemas nanoestruturados com o dilapiol em ações de controle da malária como repelente, na associação com piretróides o potencial sinérgico, e o efeito do contato tópico em mosquitos.

Palavras - chave: *Anopheles*, Nanotecnologia, Controle vetorial, *Piper aduncum*, Bioinseticida, Malária.

Aos meus pais, Maria José de Oliveira Gomes e Ivanildo Viana Gomes, que acreditaram em mim e me incentivaram ao estudo e aos meus eternos amores Augustto Lima e Ivan Augustto Silva pelo carinho, apoio, incentivo e confiança, sempre!

Dedico.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus por ser a força maior que rege o nosso planeta e que nos deu inteligência suficiente, para dar as respostas que a ciência precisa, para prosseguir e fazer da vida de cada um de nós um pouco melhor;
- A CAPES, pela concessão da bolsa, ao Projeto PRONEX - Rede Malária e a Fundação Amazônica de Defesa da Biosfera – FDB pelo apoio financeiro;
- Aos meus pais Ivanildo e Maria que sempre me deram força e conselhos valorosos, para que eu me tornasse uma pessoa responsável e honesta;
- Ao meu amor Aleksey, companheiro e amigo, que esteve ao meu lado em todos os momentos, com dupla tarefa, além de cuidar do nosso filho Ivan Augustto, com todo amor e carinho em dobro, quando eu não estive presente e ser o administrativo que atualmente apoia todos os alunos do L. M. D e comigo não foi diferente, foi perfeito;
- Aos meus irmãos Eduardo e Edvan, que sempre me apoiaram e respeitaram as minhas decisões;
- Ao Dr. Tadei, meu Orientador e amigo de todas as horas, que me aceita em seu laboratório desde 2001, quando eu ainda estava no 2º período da faculdade, com paciência me guiou e me confiou à realização deste projeto;
- Ao Dr. Tedesco, pela orientação e colaboração nanotecnológica e ao seu aluno Msc. André Miotello pela preparo das amostras nanoencapsuladas;
- Ao PPG - Entomologia do INPA e a Secretaria do Curso em especial a Lenir, Dra. Beatriz, Dra. Rosaly e Dra. Ruth pela dedicação e amizade;
- Ao Dr. Sérgio Nunomura e ao seu grupo de pesquisa, pela valiosa colaboração na parte química do trabalho, pela paciência de me ajudar a isolar o dilapiol e realizar cálculos de concentração de amostra;
- A Dra. Iléa, Dra. Mírian e Dra. Joselita, por sempre darem dicas;
- A Dra. Rosemary Pinto, pela amizade, por sempre me dar conselhos grandiosos e dicas para o trabalho;
- A Dra. Eleilza Littaif pelo apoio, amizade, aos conselhos valorosos e na ajuda ao aperfeiçoamento do trabalho;
- Ao L. E. M. do Instituto Renê Rachou de Minas, em especial ao Dr. Paulo Pimenta e a Dra. Nágila Secundino, que gentilmente me receberam em seu laboratório onde foi realizado todo o trabalho de microscopia eletrônica de varredura;

- As empresas Bayer e Rodagro por fornecerem os produtos químicos comerciais utilizados no trabalho;
- As minhas amigas Lorena Coelho, Rochelly Mesquita, Keillen Monick, Rafaela Bordalo e Rejane Simões, por me proporcionarem momentos especiais, convivência diária e apoio na hora da P-I-Z-Z-A depois das 18:00 e nos fins de semana, cada uma sabe o que representa pra mim;
- Em especial minha amiga Waléria Dasso, que sempre esteve ao meu lado nas horas boas e ruins, como almas gêmeas, agradeço de todo meu coração a sua amizade;
- Aos meus amigos do L. M. D, Carlão, Bosco, Acilino, Elias, Glaubio, Sr. Nonato, Sr. Henrique, Sr. Gilvan, Antônio (Katita), Juracy, Zilá, Adelina, Maria, Ricardo, Gervilane, Rosely, Edneuza, Marla, Muana, Rodrigo Fogaça, Silvano, Bastos, Márcio, Letícia Bridi, Ketlen, Pedro, Ana Cristina, Márcia e Rodrigo Amorim pela troca de experiências, coletas no campo, realização dos bioensaios, apoio no insetário, apoio administrativo, ombro amigo e incentivo que juntos transformaram-se em uma grande amizade;
- Ao Raimundo e ao Rubens que confeccionaram o painel para os bioensaios de prova de parede e contato tópico;
- A todos aqueles que de uma forma ou de outra, contribuíram para que esse trabalho fosse realizado, àqueles amigos que ficaram longe, mas sempre guardados no coração;
- E por fim, mas não menos importante, aos amigos do Curso de Mestrado em Entomologia 2010 do INPA, que sempre serão meus companheiros, em especial ao Claudio Neto, Val Linard, Gi Amora, Lucas e Gaucho, pelas palavras de incentivo, amizade e a ajuda na busca intensa de voluntários para os testes com repelente, ao Marcos Timóteo que conseguiu deixar a barata irreconhecível para eu poder dissecar, isso foi demais!

“Não é o mais forte, nem o mais inteligente que sobrevive, mas o que melhor se adapta às mudanças”

Charles Darwin

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitidos ao homem pela picada de mosquitos do gênero *Anopheles*. O objetivo deste trabalho foi analisar o dilapiol isolado de *Piper aduncum* e em formulações nanoestruturadas utilizado contra adultos de *Anopheles darlingi*, identificando-se o potencial de repelência, o efeito sinérgico quando associado aos inseticidas químicos Deltametrina, Cipermetrina e Alfacipermetrina, e o efeito do contato tóxico destes compostos. O óleo foi extraído das folhas através da técnica de araste à vapor pela aparelhagem de cleverger e o dilapiol isolado por cromatografia em coluna. O óleo de dilapiol e os inseticidas químicos foram nanoencapsulados com polímeros de PLA e PLGA. A morfologia das nanocápsulas foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV. Para os testes de repelência, utilizamos o óleo puro de dilapiol na quantidade de 0,762 g e o óleo puro de dilapiol nanoencapsulado quantificado em 0,865 g. Neste teste 25 casais voluntários colocaram os braços tratados e não tratados simultaneamente nas gaiolas de rede, contendo 50 fêmeas de *A. darlingi* em cada. Em relação à Prova Biológica de Parede, os testes foram realizados de acordo com o método padrão da OMS, sendo o material básico um kit de *cone chambers* modelo (VBC/81.5) utilizado em placas de madeira impregnadas com as amostras nanoencapsuladas e com amostras de inseticidas comerciais. Sobre a Aplicação Tópica, cada amostra nanoencapsulada foi borrifada em três gaiolas com 10 mosquitos cada, utilizando um revólver de pintura, acoplado ao compressor. Os resultados dos testes de repelência das amostras nanoencapsuladas com os veiculadores Sepigel e Carbopol 0,7% contendo o dilapiol evidenciaram eficácia em todos os intervalos de tempo analisados. O número de picadas no braço tratado foi significativamente menor que o não tratado, sendo igualmente significativo que o número de picadas depende da interação entre a substância e o tempo. A nanocápsula de dilapiol com o veiculador Carbopol 0,7% mostrou maior potencial de repelência entre amostras nanoencapsuladas analisadas, sem diferença significativa em relação ao óleo puro do dilapiol, sendo efetiva a repelência até uma hora e meia após a aplicação. A prova biológica de parede indicou efetividade das amostras nanoencapsuladas em relação às comerciais, evidenciando também um potencial sinérgico quando as nanocápsulas associadas foram analisadas. A avaliação do potencial sinérgico do dilapiol nanoencapsulado e as associações com os piretróides indicaram a eficácia deste composto como uma alternativa para redução da quantidade do produto químico utilizado em campo, especialmente nas borrifações intradomiciliares. A análise em microscopia eletrônica de varredura mostrou que as nanopartículas ficam aderidas às nervuras das escamas da asa do mosquito, sendo promissoras alternativas aos produtos químicos sintéticos, no que se diz respeito à borrifação intradomiciliar. Os resultados deste trabalho indicam o dilapiol puro e nanoencapsulado como alternativa viável para o uso como repelente contra mosquitos da malária e as formulações nanoestruturadas do dilapiol em associação com piretróides representam o potencial sinérgico que estes compostos possuem contra *Anopheles darlingi*, principal vetor da malária humana na Amazônia.

Palavras - chave: *Anopheles*, Nanotecnologia, Controle vetorial, *Piper aduncum*, Bioinseticida, Malária.

ABSTRACT

Malaria is an infectious disease caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium*, which are transmitted among humans by mosquitoes of the genus *Anopheles*. The aim of this study was to assess the repellent effects of dillapiol isolated from *Piper aduncum* and its nanostructured formulations against adult *Anopheles darlingi* mosquitoes. It was also assessed the synergistic effect when it was associated with the chemical insecticides deltamethrin, cypermethrin, and alfa-cipermetrin, as well as the effect of topical application of such compounds. The oil was extracted from leaves using the technique of steam distillation conducted in Clevenger apparatus; dillapiol was isolated by column chromatography. Dillapiol oil and chemical insecticides were nanocoated with PLA and PLGA polymers. Nanocapsule morphology was analyzed by Scanning Electron Microscopy – SEM. For repellency tests, dillapiol pure oil was used both in conventional form (an amount of 0.762 g) and nanocoated (an amount of 0.865 g). In this assay, 25 volunteer couples placed simultaneously their treated and untreated arms within net cages containing 50 *A. darlingi* female mosquitoes each. Regarding the wall bioassays, they were carried out according to the procedure standardized by the World Health Organization – WHO. The basic material was constituted of a kit of cone chambers model (VBC/ 81.5), which was attached to wooden boards impregnated with both nanocoated samples and commercial insecticides. Regarding the topical application, every nanocoated sample was sprayed into three cages containing ten mosquitoes each, by means of a paint gun attached to a compressor. The results from the repellency tests of nanocoated samples, containing the Sepigel and Carbopol 0.7 % carriers and dillapiol revealed effectiveness at every time interval analyzed. The number of bites observed at the treated arm was significantly lower than at the untreated one. It was also significant that the number of bites depended on the interaction between substance and time. Dillapiol nanocapsule containing 0.7 % Carbopol carrier showed a greater repellency potential amongst the nanocoated samples analyzed. The lack of significant difference was observed when using dillapiol pure oil, whose repellency was effective up half an hour after application. Wall bioassay showed the effectiveness of nanocoated samples in relation to commercial ones, also indicating a synergistic potential when associated nanocapsules were analyzed. The evaluation of synergistic potential of nanocoated dillapiol and its combinations with pyrethroids indicated the efficacy of this compound as an alternative to reduce the amount of chemicals used in the field, especially in intra-home spraying. Scanning electron microscopy analysis showed that the nanoparticles kept attached to the nervures of mosquito wing scales, and are promising alternatives to synthetic chemicals, when regarding intra-home spraying. The results of this study are an indicative that dillapiol – be nanocoated or pure oil – is a viable alternative to be used as a repellent against malaria mosquitoes. The use of dillapiol nanostructured formulations in combination with pyrethroids demonstrate the synergistic potential that these compounds have against *Anopheles darlingi*, the main vector of human malaria in the Amazon.

Keywords: *Anopheles*, Nanotechnology, Vector Control, *Piper aduncum*, bioinsecticide, Malaria.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	xiii
Lista de Figuras.....	xv
1.0. INTRODUÇÃO	1
1.1. Contextualização da Malária.....	1
1.2. Ecologia do Vetor.....	1
1.3. História dos Inseticidas em relação à Resistência de Mosquitos.....	2
1.3.1. Organoclorados.....	4
1.3.2. Organofosforados.....	4
1.3.3. Carbamatos.....	5
1.3.4. Piretróides.....	5
1.3.5. Resistência aos inseticidas.....	6
1.4. Modalidades do Controle vetorial.....	9
1.5. Aplicação da Nanotecnologia no Controle de Mosquitos.....	13
1.5.1 Sistemas de veiculação coloidais.....	14
2.0. OBJETIVOS.....	20
2.1. GERAL.....	20
2.2. ESPECÍFICOS.....	20
3.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Local do desenvolvimento do trabalho.....	21
3.2. Coleta do material botânico.....	21
3.3. Extração do óleo essencial e isolamento do dilapiol.....	23
3.4. Inseticidas utilizados nos testes com sinergismo.....	21
3.5. Métodos de preparação de Nanocápsulas.....	25
3.5.1 Preparação dos sistemas nanoestruturados contendo os ativos e estudo de pré-formulação.....	25
3.5.1.1. Distribuição de tamanho, índice de polidispersão e carga de superfície (Potencial Zeta - ζ) das nanocápsulas.....	26
3.5.1.2. Análise morfológica.....	26
3.5.1.3. Contagem das nanocápsulas.....	27
3.5.1.4. Estabilidade das formulações.....	27
3.6. Obtenção dos Adultos de <i>Anopheles darlingi</i> Root, 1926.....	27
3.6.1. Manutenção dos adultos para os testes de repelência.....	27
3.7. Coleta dos mosquitos para os testes de mortalidade.....	31
3.7.1 Testes com a Prova Biológica de Parede.....	31
3.7.2 Testes de contato tópico.....	31
3.8. Avaliação do Potencial de Repelência.....	31
3.8.1. Voluntários Humanos.....	31
3.8.2. Testes de repelência efetuados no laboratório.....	32
3.9. Avaliação da Atividade Adulticida.....	33

3.9.1. Prova Biológica de Parede.....	33
3.9.2. Avaliação dos Compostos Nanoestruturados por meio de Contato Tópico.....	37
3.9.2.1. Análise dos mosquitos após Contato Tópico por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV.....	39
4.0. COMITÊ DE ÉTICA DO INPA – CEP/INPA.....	40
5.0. Análises Estatísticas.....	41
5.1. Testes de Repelência.....	41
5.2. Prova Biológica de Parede.....	41
5.3. Contato Tópico.....	41
6.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
6.1. Material Vegetal - Folhas e galhos finos de <i>P. aduncum</i>	42
6.2. Caracterização das nanocápsulas.....	42
6.2.1. Análise morfológica das nanocápsulas.....	42
6.2.2. Tamanho médio das nanopartículas, índice de polidispersão e potencial zeta.....	44
6.3. Análises de Repelência.....	45
6.4. Análises da Prova Biológica de Parede.....	54
6.4.1 Experimento 1.....	54
6.4.2 Experimento 2.....	60
6.4.3 Experimento 3.....	60
6.5. Testes de borrfiação direta do produto nanoestruturado sobre os mosquitos –Contato Tópico: Visualização por Microscópio Eletrônico de Varredura–MEV.....	73
7.0. CONCLUSÕES.....	80
8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
ANEXO A – Termo de Consentimento Livre Esclarecido: Repelência.....	97
ANEXO B - Formulário para realização do Teste de Repelência.....	100
ANEXO C – Formulário Prova de Parede.....	101
ANEXO D – Formulário Contato tópico.....	102
ANEXO E – Aprovação do Comitê de Ética – CEP/INPA.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Cálculos de concentração do ingrediente ativo (i.a.) do produto comercial x amostras nanoencapsuladas utilizadas na prova biológica de parede.....	31
Tabela 02. Cálculos de concentração do ingrediente ativo (i.a.) do produto comercial x amostras nanoencapsuladas utilizadas no contato tópico.....	35
Tabela 03. Tamanho da partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das diferentes formulações de nanocápsulas (n=3).....	43
Tabela 04. Resultados da análise de variância fatorial (ANOVA) para a repelência das diferentes substâncias nos diferentes tempos testados – braço não tratado....	46
Tabela 05. Resultados da análise de variância fatorial (ANOVA) para a repelência das diferentes substâncias nos diferentes tempos testados– braço tratado.....	46
Tabela 06. T-Tukey; Tempo 0, braço não tratado, probabilidades aproximadas para testes <i>post hoc</i> Erro: entre MS = 37.560, df = 45.000.....	47
Tabela 07. T-Tukey; Tempo 30, braço não tratado, probabilidades aproximadas para testes <i>post hoc</i> Erro: entre MS = 11.820, df = 45.000.....	47
Tabela 08. T-Tukey; Tempo 60, braço não tratado, probabilidades aproximadas para testes <i>post hoc</i> Erro: entre MS = 7.8689 df = 45.000.....	48
Tabela 09. T-Tukey; Tempo 90, braço não tratado, probabilidades aproximadas para testes <i>post hoc</i> Erro: entre MS = 6.1467 df = 45.000.....	48
Tabela 10. T-Tukey; Tempo 0, braço tratado, probabilidades aproximadas para testes <i>post hoc</i> Erro: entre MS = 9,9422 df = 45.000.....	49
Tabela 11. T-Tukey; Tempo 30, braço tratado, probabilidades aproximadas para testes <i>post hoc</i> Erro: entre MS = 5,1244 df = 45.000.....	49
Tabela 12. T-Tukey; Tempo 60, braço tratado, probabilidades aproximadas para testes <i>post hoc</i> Erro: entre MS = 5,1578 df = 45.000.....	50
Tabela 13. T-Tukey; Tempo 90, braço tratado, probabilidades aproximadas para testes <i>post hoc</i> Erro: entre MS = 2,4867 df = 45.000.....	51
Tabela 14. Resultados da análise de variância com fatores independentes, primeiro experimento da prova de parede.....	55
Tabela 15. Teste Tukey da variável - 1 dia, probabilidades aproximadas para testes <i>post hoc</i> Erro: entre MS =5.8182, df = 22.000.....	57

Tabela 16. Teste Tukey da variável - 3 dias, probabilidades aproximadas para testes post hoc Erro: entre MS =2.0909, df = 22.000.....	58
Tabela 17. Resultados da análise de variância com fatores independentes, terceiro experimento da prova de parede.....	61
Tabela 18. Teste Tukey da variável - 1 dia, probabilidades aproximadas para testes post hoc Erro: entre MS = 2.2424, df = 22.000.....	62
Tabela 19. Teste Tukey da variável - 3 dias, probabilidades aproximadas para testes post hoc Erro: entre MS = 3.9697, df = 22.000.....	63
Tabela 20. Teste Tukey da variável - 5 dias, probabilidades aproximadas para testes post hoc Erro: entre MS = 2.6364, df = 22.000.....	64
Tabela 21. Teste Tukey da variável - 6 dias, probabilidades aproximadas para testes post hoc Erro: entre MS = 2.0303, df = 22.000.....	66
Tabela 22. Teste Tukey da variável - 7 dias, probabilidades aproximadas para testes post hoc Erro: entre MS = 1.6061, df = 22.000.....	67
Tabela 23. Teste Tukey da variável - 10 dias, probabilidades aproximadas para testes post hoc Erro: entre MS = 3.3636, df = 22.000.....	69
Tabela 24. Teste Tukey da variável - 10 dias, probabilidades aproximadas para testes post hoc Erro: entre MS = 3.3030, df = 22.000.....	70
Tabela 25. Resultados da análise de variância (ANOVA Fatorial) com fatores mistos – prova de contato tópico.....	77

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Estágios do ciclo de vida do *A. darlingi* (ovo, estádios larvais I,II,III,IV, pupa e emergência do adulto).....02
- Figura 02.** Representação esquemática de nanoesferas sítio-específico do tipo núcleocoroa de dextrana-PCL (Rodrigues *et al.*, 2003).....16
- Figura 03.** Representação de uma nanoemulsão contendo ftalocianina no núcleo oleoso (Primo *et al.*, 2007).....16
- Figura 04.** Imagem landsat dos locais de coleta do material vegetal utilizado neste estudo. Em destaque os pontos georeferenciados: BR174-PL01 – Brejo do matão 1; BR174-PL02 – Colégio Ester; BR174-PL03 – Brejo do matão 2, menor infrator; BR174-PL04 – Colégio Interno Rainha dos Apóstolos; BR174-PL05 – Entrada do ramal Nova Esperança, km 26.....22
- Figura 05.** A - Extração do óleo essencial de *P. aduncum* por hidrodestilação; B – Identificação do óleo por CCD, Hexano/AcoEt 85:15; C – Isolamento do dialpiol por cromatografia em coluna; D- Identificação do dilapiol nas frações 27 a 34 por CCD, Hexano/AcoEt 96:4; E – Representação da estrutura química do dilapiol isolado.....24
- Figura 06.** Imagem landsat do local onde foram realizadas as coletas dos mosquitos. Em destaque os pontos georeferenciados ALADO - AL01 Ramal 9. Puraquequara; AL02 - Cristo Vive KM 11. Brasileirinho; AL03 - Raifram Ramal 7. Brasileirinho. IMATURO - IM01-Portela. Puraquequara; IM02 – Carlão. Puraquequara; IM03 - Ramal do Rufino. Puraquequara; IM04 - Ramal 13. Iranduba; IM05 – Robertão. Puraquequara; IM06 - Ramal 24 Cachoeira. Iranduba; IM07 – Prainha. Iranduba; IM08 - Ramal 9. Puraquequara.....29
- Figura 07.** Alimentação dos adultos coletados no campo, com sangue de pato.....30
- Figura 08.** A – Coleta das formas imaturas no criadouro; B – Manutenção das larvas coletadas para obtenção de fêmeas adultas utilizadas nos testes de repelência.....30
- Figura 09.** A - Gaiolas utilizadas nos testes; B – Realização dos testes de repelência com voluntários humanos.....33
- Figura 10.** A – Kit de testes da OMS (VBC/81.5); B – Impregnação das placas com a nanoformulação; C – Disposição das placas; D – Realização da prova biológica de parede.....36
- Figura 11.** A - Gaiolas utilizadas nos testes para contato tópico, medindo Ø=15 cm; 3 cm altura; B – Compressor utilizado para dispersão da formulação; C - Borrifação direta da amostra nanoencapsulada nos mosquitos.....39

Figura 12. A - Amostras (<i>stub</i>) do inseto adulto e da emulsão metalizadas com na fita de carbono; B - Metalizador de amostras com partículas de ouro; C - Microscópio Eletrônico de Varredura – MEV do Fiocruz -MG.....	40
Figura 13. A e B - Micrografias invertidas da análise morfológica das nanocápsulas, aplicadas diretamente na fita de carbono.....	43
Figura 14. A - Análise das nanocápsulas referente ao número de partículas; B – Percentual das nanocápsulas referente ao total por tipo de partículas; C - Avaliação do tamanho das nanocápsulas.....	44
Figura 15. Percentual de repelência com exposição de três minutos a cada 30 min durante 90 min.....	46
Figura 16. Média do número de picadas de cada amostra testada no braço tratado e não tratado.....	47
Figura 17. Percentual de mortalidade (24 h) e 72 (h) após a impregnação das amostras nas placas de madeira.....	55
Figura 18. Nanocápsulas de PLA contendo as amostras avaliadas por 21 dias após a borrifação.....	60
Figura 19. Percentual de mortalidade avaliado durante 12 dias após a aplicação das amostras nanoestruturadas.....	61
Figura 20. Micrografia do mosquito (escamas) após o tratamento com compostos nanoencapsulados no aumento de 1.300x.....	75
Figura 21. Micrografia do mosquito (escamas) após o tratamento com compostos nanoencapsulados com o aumento de 1.200x.....	76
Figura 22. Percentual de mortalidade avaliado durante 24 horas após a borrifação direta no mosquito.....	78

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. Contextualização da Malária

A malária humana é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, os quais são transmitidos através da picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles* Meigen, 1818 (WHO, 2008).

Esta doença ainda hoje representa um dos mais importantes problemas de Saúde Pública mundial, presente em cerca de 100 países e territórios. Estima-se que aproximadamente metade da população mundial encontra-se em áreas de risco de transmissão da doença, sendo o maior número de casos e mortes registrados na África subsaariana. Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2010 ocorreram cerca de 216 milhões de casos, com 655 mil mortes (WHO, 2011).

No Brasil, aproximadamente 5,4 milhões de pessoas vivem em áreas de alto risco de transmissão da malária, principalmente entre os nove estados que integram a Amazônia Legal. Em 2010 foram notificados 329.178 casos de malária, o que corresponde a 99,98% dos casos registrados em todo o país (Tadei *et al.*, 2007; SIVEP/Malária, 2010).

1.2. Ecologia do Vetor

Os subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* pertencentes ao gênero *Anopheles* (Diptera, Culicidae) incluem espécies predominantemente neotropicais, que constituem os mais importantes vetores da malária humana no Novo Mundo (Tadei e Santos, 1982).

O *Anopheles darlingi* Root, 1926, principal vetor da malária humana no Brasil, está amplamente distribuído no território sulamericano a leste dos Andes, Colômbia, Venezuela, Bolívia, Peru, Paraguai, Argentina, Brasil e nas Guianas (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Foratini, 2002).

O *A. darlingi* possui o ciclo de vida com desenvolvimento completo - holometábolo, com estágios de ovo, larva (I, II, III, IV estádios), pupa e adulto, com duração de aproximadamente 15 dias (Figura 1). Esta espécie de mosquito mostra acentuada antropofilia e endofagia. Após o repasto sanguíneo, as fêmeas ingurgitadas, do gênero *Anopheles*, procuram preferencialmente criadouros de águas profundas, limpas, ensolaradas ou parcialmente sombreadas, onde depositam seus ovos e as formas imaturas se desenvolvem entre a vegetação

emergente ou flutuante e detritos vegetais caídos na lâmina d'água (Deane *et al.*, 1948; Deane, 1986; Tadei *et al.*, 1988, Lourenço de Oliveira, *et al.*, 1989; Tadei, 1993).

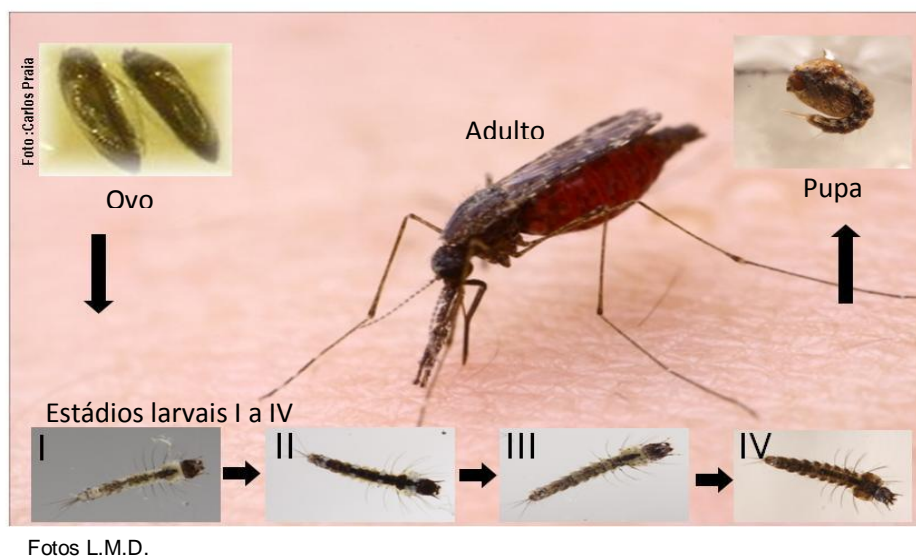


Figura 01. Estágios do ciclo de vida do *A. darlingi* (ovo, estádios larvais I,II,III,IV, pupa e emergência do mosquito adulto).

1.3. História dos Inseticidas em relação à Resistência de Mosquitos

De acordo com registros históricos, desde o século XIX, a aplicação de inseticidas continua sendo a principal ferramenta no controle de insetos vetores de doenças (Breman, 2001).

Há vários modelos de classificação dos inseticidas, dentre eles, iremos destacar: 1 – Os compostos inorgânicos que se definem por não apresentarem nenhum átomo de carbono em sua molécula, compreendendo os arsenicais - arsênico branco, arseniato de alumínio, cálcio e chumbo; fluorados - criolita, fluoreto de sódio; e miscelânea - calda sulfo cálcica, sulfatos, carbonatos, aceto arsenito de cobre, conhecido como verde de Paris, entre outros; e 2 – Os compostos orgânicos assim denominados devido à presença de átomos de carbono e hidrogênio apresentando-se como o grupo de maior importância dentre as classes inseticidas utilizadas atualmente, sendo divididos em inseticidas naturais – de origem vegetal; e inseticidas sintéticos – formulados a partir de compostos naturais (Faria, 2009; Braibante e Zappe, 2012).

Considerando que os compostos inorgânicos utilizados em larga escala eram muito tóxicos, como foi o caso do ácido cianídrico usado nos Estados Unidos no final

do século XIX, utilizado para eliminar insetos em moradias, mesmo que tenha sido inicialmente muito eficaz, após algum tempo, os insetos desenvolveram resistência a esse ácido (Braibante e Zappe, 2012).

Neste contexto, os compostos orgânicos naturais vieram a ser difundidos no século XIX, a fim de substituir os compostos inorgânicos. Dentre os mais conhecidos, podemos destacar o piretro ou pó da Pérsia, proveniente de flores secas de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e *Chrysanthemum coccineum*, planta da família Asteraceae, encontrada na Iugoslávia e no Cáucaso (Casida, 1990; Casida e Quistad, 1998).

A elucidação da estrutura química dos inseticidas naturais e a síntese do piretro foram relatadas em 1924 por Staudinger e Ruzicka, outras estruturas como as da rotenona (isolada de raízes de *Derris elliptica*), foram caracterizadas por Butenandt em 1932 e a veratridina (isolada de sementes de *Schoenocaulon officinale*, e de mudas de *Veratrum album*) foi relacionada por Barton, Prelog e Woodward, em 1954 (Casida e Quistad, 1998).

Estes pesquisadores e muitos outros modificaram as estruturas moleculares das plantas, substituindo sistematicamente a molécula para determinar o efeito da atividade inseticida, mas sem avanços práticos, apenas reconhecendo a eficácia de protótipos dos produtos naturais para os sintéticos com propriedades melhoradas. A descoberta de novos inseticidas orgânicos sintéticos tornou-se um dos grandes objetivos dos cientistas, a partir de 1930, possibilitando o surgimento de uma variedade de produtos orgânicos de diferentes classes químicas, com aplicabilidade para o controle de insetos e pragas (Casida e Quistad, 1998; Raghavendra *et al.*, 2011).

Em 1940, com o início da Segunda Guerra mundial, os inseticidas orgânicos sintéticos passaram a ser utilizados em grande escala, no sentido de proteger as tropas das regiões tropicais e subtropicais da África e da Ásia, contra insetos praga e vetores de doenças. Assim, as pesquisas em busca de compostos foram intensificadas e o resultado foi a formulação de novos produtos utilizados até hoje, dos quais destacam-se os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (Muller, 1959; Raghavendra *et al.*, 2011; Braibante e Zappe, 2012).

1.3.1. Organoclorados

Estes são derivados do clorobenzeno, ciclo-hexano ou ciclodieno e possuem uma relativa facilidade de síntese, conferindo maior persistência no meio, elevada toxicidade e estabilidade de grande parte dos compostos desta classe à ação da luz solar e temperatura ambiente (Nunes e Tajara, 1998).

Foram desenvolvidos vários modelos deste composto, destacando-se Aldrin, Endrin, BHC, DDT, Ensossulfan, Heptacloro, Lindane, Mirex e Toxafeno como os principais. O DDT (1,1,1-tricloro-2,2-di(p-clorofenil)etano) foi o primeiro inseticida orgânico sintético que apresentou sucesso na sua eficácia e descrito por Muller em 1939 na Suíça, mostrando suas propriedades inseticida. Entretanto, este produto foi originalmente sintetizado em 1874 na Alemanha, por Othmar Zeidler. Este inseticida foi o composto propulsor na origem dos organoclorados (Muller, 1959; Casida e Quistad, 1998).

O produto foi considerado a solução para o controle da maioria das pragas. Por exemplo, pela primeira vez na história uma epidemia de tifo (doença transmitida por piolhos) não só foi contida, mas quase imediatamente dizimada. O controle de malária, febre amarela e outras doenças também foram beneficiados com a composição do DDT. Zeidler recebeu a titulação de PhD da Universidade de Strassburg pela síntese de DDT e Paul Muller foi premiado em 1948, com o Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina por descobrir sua atividade inseticida (Raghavendra *et al.*, 2011; Braibante e Zappe, 2012).

1.3.2. Organofosforados

Constituídos a partir do ácido fosfórico e seus homólogos, esta classe surgiu posteriormente aos organoclorados, estes por sua vez, podem ser classificados em alifáticos, derivados de fenil ou heterocíclicos. Os principais inseticidas pertencentes ao grupo são: Malation, Metil Paration, Clorpirifos, Clorpirifos-metil, Fenitrotion, Metamidofos e Vidrin (Plapp e Casida, 1958; Ware, 2000).

São amplamente utilizados em saúde pública, embora estes possuam ação mais rápida, eles apresentam algumas desvantagens sobre os organoclorados, como por exemplo, a alta toxicidade aos vertebrados, como mamíferos e peixes. Em geral, estes compostos apresentam elevada instabilidade química e baixa

residualidade, necessitando maiores aplicações (Rozendaal, 1997; Rico *et al.*, 2010).

1.3.3. Carbamatos

Esta classe é constituída de ésteres ácidos derivados do ácido carbâmico que apresentam algumas semelhanças, quando comparados aos inseticidas organofosforados. Foram descobertos nos EUA em 1954, neste grupo destacam-se o Carbaril, Carbofuram, Aldicarb e o Propoxur, todos de uso intradomiciliar (Rozendaal, 1997; Casida e Quistad, 1998; Ferreira, 1999).

Com o modo de ação semelhante aos organofosforados, os carbamatos possuem as seguintes características: alta atividade inseticida; baixa ação residual, devido à instabilidade química das moléculas; baixa toxicidade em longo prazo, quando comparado com os derivados fosforados (Midio e Silva, 1995). De acordo com os estudos de Ware (2003), os carbamatos possuem toxicidade oral e dermal baixa para mamíferos, se comparados aos fosforados.

1.3.4. Piretróides

Com ênfase na busca de novos inseticidas sintéticos, a partir de compostos naturais, a modificação da estrutura química das piretrinas, desencadeou o primeiro registro da síntese de piretróides em 1949. Estas, normalmente não são usadas diretamente na agricultura devido ao seu alto custo e instabilidade química a luz solar (Ferreira, 1999; Midio e Silva, 1995; Ware, 2003).

A sua síntese era muito complexa - com 22 reações químicas para chegar até o produto final mas, em 1972, foram registradas algumas moléculas com atividade inseticida excepcional (Ware, 2003). Este grupo de inseticida foi introduzido no mercado em 1976 e, ainda que seja mais caro em relação aos outros praguicidas, têm sido bastante empregado na área da Saúde para o controle de malária, na agricultura, e também para controle de ectoparasitos de pequenos animais, através de produtos de uso doméstico (Ferreira, 1999).

Apesar da ampla eficácia dos piretróides, é importante ressaltar que estes pertencem ao grupo de ésteres contendo grupo CN com toxicidade tipo II, ou seja, com a presença de um grupo ciano na porção fenoxibenzil, agem no sistema nervoso central induzindo a Síndrome da Coreoatetose tipo II, cujos sintomas de intoxicação em ratos são hipersensibilidade, salivação abundante, agitação das

mãos ou patas anteriores, movimentos de escavar e tremores periódicos que podem evoluir à coreoatetose e, em alguns casos, a movimentos clônicos repetitivos (WHO, 1986; Dartigues, 1987; Santos *et al.*, 2007).

1.3.5. Resistência

Os inseticidas sintéticos estão à frente nas ações de controle de vetores. No entanto, estes produtos químicos representam uma ameaça ao meio ambiente, além dos efeitos negativos sobre insetos não alvos, e aos seres humanos, além da resistência dos mosquitos a estes inseticidas, que tem aumentado nas últimas cinco décadas (Rahuman *et al.*, 2009a; Kamaraj *et al.*, 2010).

Em geral, a formulação de produtos no combate aos insetos praga e aos vetores, sejam eles químicos sintéticos ou mesmo orgânicos de origem vegetal, apresenta uma demanda crescente por outros novos produtos, uma vez que os organismos desenvolvem resistência a tais compostos após certo tempo de contato (Castro Neto *et al.*, 2010).

Essa resistência foi registrada pela contínua e excessiva aplicação de inseticidas químicos, sobretudo após a descoberta do Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT), onde este apresentou baixa susceptibilidade sobre os anofelinos, em várias localidades do mundo.

O primeiro caso foi observado em 1951, com *A. sacharovi*, na Grécia. Em 1958, a OMS listou 18 espécies de anofelinos resistentes ao DDT. Em 1980, o *A. darlingi*, principal vetor na região amazônica, era considerado susceptível ao DDT pela OMS e, em 1986 já constava na lista de resistentes, com registros de casos na Colômbia (Oliveira Filho, 1992). O primeiro caso de resistência fisiológica de *A. darlingi* ao DDT foi registrado por Suarez *et al.* (1990), em populações do nordeste da Colômbia, em áreas da cidade Quibdo, em 1988.

Alguns estudos indicam que os padrões de resistência dos insetos são diferenciados dependendo do local, como por exemplo, na República de Camarões os mosquitos são resistentes ao DDT e dieldrin, diferente da África do Sul onde os insetos são resistentes aos piretróides e ao carbamato, mas são completamente susceptíveis ao DDT e ao dieldrin (Casimiro *et al.*, 2006; Wondji *et al.*, 2011).

Os trabalhos publicados por Dash *et al.* (2007) discutem várias questões relacionadas ao DDT, desde sua proibição até à importância no controle de vetores.

Em resumo, a Agência de Proteção Ambiental (APA) declarou em 1972 a proibição do DDT, devido às considerações de ordem ecológica, e abriu-se um debate entre as vantagens e desvantagem dos compostos proibidos (Rogan e Chen, 2005).

A preocupação com os impactos na saúde humana foi relevante devido à prevalência de resíduos, nos tecidos gordurosos e órgãos vitais. A Convenção de Estocolmo sobre poluentes orgânicos persistentes (POP) em 2001 identificou o DDT entre os 12 compostos inseridos no programa. Mas, a proibição do DDT teve algumas exceções, dentre as quais ainda permitiu-se a borrifação intradomiciliar, no controle da malária, desde que seguissem as especificações da OMS, de acordo com a produção, nas precauções de segurança para a sua utilização e no descarte, assegurando a eficiência da alternativa (Dash *et al.*, 2006; 2007).

No Brasil, a utilização do DDT foi proibida em 1985, na área da agricultura, sendo continuada sua utilização nas campanhas de saúde pública até 1998, quando uma portaria da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (SVS) cancelava a monografia deste pesticida organoclorado persistente, completando a Directiva 164, de 21 de março de 1997, do CCDTV/DEOPE da Fundação Nacional de Saúde (Ministério da Agricultura, 1985; FNS, 1997; Ministério da Saúde, 1998).

De acordo com a OMS, 31 países optaram pela isenção da proibição total de DDT até 2001, incluindo China, República da Rússia, Índia, África do Sul, Suazilândia, Moçambique e Equador seguiram o processo (Raghavendra e Subbarao, 2002). Isso reflete a confiabilidade destes países, sobre o uso do DDT, apesar dos relatos de resistência dos vetores. Mesmo com a insistência da sua utilização, por parte dos países citados, em 17 de maio de 2004, outra Conferência de Estocolmo solicitou a eliminação total da produção do DDT. No entanto, o debate sobre a utilização do DDT persistiu e em setembro de 2006 a OMS deu um atestado para o uso do DDT, com o objetivo de combater a malária na África e em outras áreas onde os vetores ainda apresentem susceptibilidade a este composto (WHO, 2006).

A recente decisão sobre a utilização do DDT, no Brasil, de acordo com Lei Nº 11.936, de 14 de Maio de 2009, relata a proibição da fabricação, importação, exportação, manutenção em estoque, comercialização e o uso de diclorodifeniltricloreto (DDT) no país (Diário oficial da União, 15 de Maio de 2009).

Diante de toda a manifestação negativa sobre a utilização do DDT, faz-se

necessário a busca de substâncias que possam substituir este composto, confiando à mesma atividade e/ou melhor, desempenho, e também a utilização de outras alternativas, como por exemplo, as barreiras físicas (mosquiteiros).

Em alguns países como a África, o controle da malária é fortemente baseado no uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas químicos e borrifação intradomiciliar. No entanto, o sucesso destes métodos é ameaçado pelos vetores da região que apresentam alta resistência aos principais inseticidas como piretróides e DDT (Corbel *et al.*, 2007; Djouaka *et al.*, 2011).

Estudos relatam mais de 500 espécies de insetos e ácaros com resistência a aproximadamente 300 compostos inseticidas. Dentre estas espécies resistentes: 56% são pragas na agricultura, 39% são artrópodes de importância médica ou veterinária e 5% são insetos não alvos (Georghiou, 1990; Moberg, 1990; Hargreaves *et al.*, 2000; Kazachkova, 2007).

Com o advento da biologia molecular, houve avanços na identificação da susceptibilidade dos mosquitos a diferentes classes de inseticidas químicos, permitindo identificar com maior precisão o nível de resistência a estes inseticidas, bem como os sítios de atuação em escalas moleculares. Por meio da técnica da PCR (reação em cadeia de polimerase), são conhecidos os alelos que conferem a resistência dos insetos (Martinez-Torres *et al.*, 1998; Djouaka *et al.*, 2011; Silva, 2011).

O monitoramento ao uso dos inseticidas químicos, o manejo da resistência, assim como o uso de novos princípios ativos com modo de atuação diferentes daqueles apresentados pelos produtos químicos convencionais, são atividades importantes, que podem ser empregadas em qualquer programa de controle de vetores (Ferrari, 1996; Pennetier *et al.*, 2005; Silvério *et al.*, 2009).

Estudos indicam que os insetos vetores estão entre os maiores causadores de doenças e mortes em muitos países tropicais e subtropicais. Tais doenças, como malária, dengue, filariose, schistosomose, tripanosoma e leishmaniose, representam um grande impacto no desenvolvimento econômico e social destes países (WHO, 1996).

Destacando a malária, propõe-se o vetor como a causa primária de transmissão da doença, sendo necessário considerar este fator, para a determinação das medidas de controle. Neste contexto, também são considerados

parâmetros entomológicos para a determinação de medidas integradas de controle (Tadei, 1991).

Os programas de controle da Organização Mundial de Saúde – OMS estão apoiados nas ações combinadas de métodos no combate ao vetor e aos parasitas, com um planejamento a cerca das alternativas adotadas à realidade local que permitam sua execução de forma íntegra e seletiva, destacando os inseticidas químicos (Foratini, 1962; Ministério da Saúde, 2006).

1.4. Modalidades do Controle vetorial

Considerando o controle vetorial da malária na Amazônia, um aspecto relevante tem sido à busca por substâncias biologicamente ativas, com propriedades inseticidas, de repelência e/ou sinérgicas. Estas substâncias possuem grande potencial para o controle de mosquito, especialmente aquelas com atividade larvicida e adulticida, pelo fato de substituir o uso de inseticidas químicos que, frequentemente, mostram efeitos colaterais nos seres humanos como os distúrbios sensoriais cutâneos, hipersensibilidade, neurite periférica e irritante de mucosas, sendo utilizados rotineiramente como pesticidas na agricultura e nas ações de controle de vetores (Lichtenstein *et al.*, 1974; Mohan *et al.*, 2006; Morais *et al.*, 2006; Bagavan *et al.*, 2009; Kamaraj *et al.*, 2010).

Os inseticidas sintéticos estão associados a uma série de problemas ambientais, tais como o desenvolvimento de insetos resistentes, desequilíbrio ecológico e danos aos seres vivos. Neste contexto, o desenvolvimento de produtos biologicamente ativos, a partir de plantas torna-se caráter estratégico de manejo, onde se espera a redução de riscos causados aos organismos em geral, minimizando o acúmulo de resíduos nocivos no meio ambiente, devido a sua própria biodegradabilidade. Esta ideia é corroborada em diversos estudos sobre a eficácia de extratos vegetais, óleos essenciais, bem como o princípio ativo destes (Mehlhorn *et al.*, 2005; Rahuman *et al.*, 2008; Rahuman *et al.*, 2009a,b; Pinto *et al.*, 2011).

A propriedade de repelência, como proteção individual, é uma forma de controle relevante contra picadas de mosquitos, além de ser um meio prático e econômico de prevenção de doenças veiculadas por estes insetos, ressaltando que uma única picada do mosquito infectado é suficiente para resultar em transmissão da doença (Fradin e Day, 2002).

Os repelentes disponíveis comercialmente podem ser divididos em duas categorias: os produtos químicos sintéticos e os óleos essenciais derivados de plantas. As formulações químicas sintéticas mais comuns disponíveis no mercado contêm N, N-diethyl-3-methylbenzamide (DEET), que tem se mostrado um excelente repelente contra mosquitos e outros insetos hematófagos (Yap, 1986; Coleman *et al.*, 1993; Walker *et al.*, 1996). No entanto, as reações de toxicidade humana após a aplicação do DEET, variam de leve a grave, com manifestações desde simples dermatite até uma toxicidade cardiovascular, devido sua alta absorção pela pele (Qiu *et al.*, 1998; Osimitz, *et al.*, 2010). Na tentativa de minimizar e/ou evitar esses efeitos adversos, há uma busca constante por repelentes derivados de extratos vegetais para substituir o DEET (Amer e Mehlhorn, 2006; Elango *et al.*, 2009).

Diversos extratos de plantas vêm se destacando como repelentes, dentre eles o Nim (*Azadirachta indica* A. Juss), espécies de Manjerição (*Ocimum basilicum* Linnaeus, *O. gratissimum* L, *O. americanum* L., *O. tenuiflorum* L.), Capim-citronela (*Cymbopogon nardus* Rendle), Cravo (*Syzygium aromaticum* L.), Tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e Pimenta de macaco (*Piper aduncum* L. 1753) (Sharma *et al.*, 1993; Chokechaijaroenporn *et al.*, 1994; Suwonkerd e Tantrarongroj, 1994; Boonyabanha *et al.*, 1997; Barnard, 1999; Misni *et al.*, 2009; Nerio *et al.*, 2010; Poliht, *et al.*, 2011).

Estes repelentes naturais demonstraram eficiência contra adultos de *Aedes aegypti* L., *Aedes albopictus* Skuse e *Anopheles arabiensis* Patton, sendo que algumas espécies foram avaliadas por olfatométria, ou seja, a resposta de atração das fêmeas aos inseticidas químicos (Posey *et al.*, 1998). Esses mesmos autores realizaram testes para análise de repelência, foram os de contato ou através de ratos em condições de laboratório.

No entanto, a Organização Mundial de Saúde preconiza que a avaliação quanto à repelência deve ser realizada utilizando seres humanos, pois animais de laboratório não transpiram como o homem, podendo assim, simular respostas inadequadas aos usuários finais do repelente (WHO, 1996).

Nos estudos de inseticidas, outro aspecto que merece destaque atualmente é a Sinergia, palavra que vem do grego *sinergos* (*sýn* cooperação, *érgon* trabalho), termo amplamente definido como um efeito combinado, produzido por compostos que podem operar juntos (Tedesco, 2008).

O desenvolvimento de mecanismos de resistência de insetos aos inseticidas

desencadeia a utilização de formulações contendo associações entre diferentes grupos químicos, que atuam de maneira sinérgica, o que permite potencializar a atividade dos inseticidas sintéticos.

Dentre os compostos sinérgicos mais importantes, o butóxido de piperonila (amida lipofílica insaturada 5-(2-propenyl)-1,3-benzodioxole), um composto sintético, é destacado por atuar na inibição de um complexo enzimático como oxidases e esterases envolvidas no metabolismo e detoxificação. Esta é uma via que o vetor apresenta como uma defesa contra praticamente todos os inseticidas químicos, desenvolvendo o mecanismo de resistência destes insetos (Beckel *et al.*, 2006; Bingham *et al.*, 2007; Bielza *et al.*, 2007).

A sinergia age potencializando a ação do inseticida químico sintético, permitindo a redução da quantidade de inseticida químico utilizada comumente. Deste modo, essa associação torna-se um substrato alternativo, poupando o inseticida da detoxificação, ao mesmo tempo em que pode reagir com outro sítio no sistema enzimático, reduzindo quase que totalmente a possibilidade de resistência dos insetos alvo (Casida, 1970).

Alguns trabalhos também relatam que, além do aumento da letalidade nas populações resistentes, os sinergistas, quando associados aos inseticidas químicos, podem minimizar a contaminação ambiental dos resíduos de inseticidas persistentes e preservar insetos benéficos que compõem a fauna local (Brindley & Selim, 1984; Raffa e Priester, 1985).

Estudos realizados com algumas espécies de plantas da Amazônia mostraram que a Pimenta de Macaco – *Piper aduncum* Linnaeus 1753, é uma excelente produtora de óleo essencial, apresentando como componente majoritário o fenilpropanóide – dilapiol (Maia *et al.*, 1998).

Os experimentos realizados por Lichtenstein *et al.* (1974), com o dilapiol obtido a partir de Dill (*Anethum graveolus* L., Umbelliferae), demonstraram que esta substância é um agente sinérgico de inseticidas sintéticos Carbaryl, Carbofuran, Parathion e DDT, extrato aquoso de folhas e raízes nos testes para atividade larvicida com *A. aegypti* Linnaeus 1762, e com resíduos secos de extrato hexânico, para os testes com adultos de *Drosophila melanogaster* Meig, 1830.

Os estudos de Quignard *et al.* (2002), também com *P. aduncum*, mostraram que o extrato metanólico de folhas desta espécie causou 100% de mortalidade em

larvas de *A. aegypti*, após 24 horas de exposição. Além da ação inseticida, diferentes espécies do gênero *Piper* mostram propriedades antimicrobianas, as quais são amplamente utilizadas na medicina popular. Segundo Pimentel *et al.* (1998), *Piper hispidinervum* C. DC., vulgarmente conhecida como pimenta longa, é rica em safrol, componente químico aromático e empregado como matéria prima na manufatura de heliotropina, fixador de perfumes, e butóxido de piperonila, agente sinérgico de inseticidas naturais.

A *P. aduncum* Linnaeus, 1753 pertence à família Piperaceae. Está presente em toda região de clima tropical, com cerca de oito gêneros, ausentes em regiões secas. Em especial, o gênero *Piper* Linnaeus, 1753 é predominantemente arbustivo, encontrado em áreas alteradas. São ervas pequenas, ou mesmo árvores ou lianas, terrestres ou epífitas, com caule provido de nós, utilizadas na medicina popular e como condimento. Algumas espécies de *Piper* são usadas na produção de óleos essenciais voláteis, extraídos das folhas e dos talos finos (Ciccio e Ballesterro, 1997; Ribeiro *et al.*, 1999; Nerio *et al.*, 2010).

A avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em camundongos, com óleo essencial de *P. aduncum* realizada por Sousa *et al.* (2008), mostrou que não houve alteração significativa nos parâmetros hematológicos e bioquímicos em relação ao controle no tratamento subagudo, exceto a redução da creatinina. Os resultados observados na determinação da DL₅₀, os indivíduos que receberam por via oral doses de 1000, 2000, 2350, 2500, 2700 e 3000 mg/kg do óleo essencial, apresentaram um percentual de mortalidade variando de 0, 30, 40, 60, 80 e 100%, respectivamente. Estes resultados indicam que o óleo essencial de *P. aduncum* apresenta uma baixa toxicidade, estando dentro da margem de precauções à saúde humana.

A revisão fitoquímica realizada por Scott *et al.* (2008), mostra que as espécies de *Piper* são excelentes produtoras de compostos secundários, tais como amidas, ácidos benzóicos, cromenos, flavonóides e fenilpropanóides.

Os óleos essenciais são extraídos de plantas aromáticas e possuem grande importância para indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias. Essas substâncias orgânicas são consideradas a *alma* da planta, de onde são isolados princípios ativos responsáveis pela ação terapêutica das plantas medicinais (Reichling *et al.*, 2009).

Estudos realizados por Gottlieb e Salatino (1987), com óleos essenciais em relação à função e à evolução, mostraram que o efeito destes óleos está relacionado com a sua volatilidade.

Rozendaal (1997), descreveu a duração e a eficácia de alguns inseticidas usados para borrifação de paredes, dentre eles cita-se que a alfacipermetrina (0.03 g/m²) que tem um desempenho de 2 a 3 meses por ação de contato. A cipermetrina (0.5 g/m²) que tem a durabilidade de quatro meses ou mais, também por ação de contato. Estudos preliminares utilizando Prova Biológica de Parede realizados por Gomes *et al.* (2010), mostraram que o efeito residual do dilapiol desapareceu em 15 dias, perdendo seu efeito após esse período. Estes bioensaios permitiram identificar a rápida evaporação do composto, minimizando sua ação sinérgica.

1.5. Aplicação da Nanotecnologia no Controle de Mosquitos

Considerando as substâncias que mostram efeitos sinérgicos importantes que implica em questões ambientais e economia de recursos públicos, a sua utilização nas ações de combate é de extrema importância no processo de controle da malária. Uma solução para a diminuição da evaporação do dilapiol após sua aplicação direta sobre o alvo seria o emprego de ferramentas alternativas na veiculação de fármacos e ativos, como a nanoencapsulação do princípio ativo associado ao inseticida, de forma a sustentar a liberação lenta desse composto.

O pesquisador Norio Taniguchi, em 1974, foi o primeiro a apresentar o termo “nanotecnologia” para conceituar o estudo da ciência em nanoescala. Em trabalhos apresentados na Conferência Internacional em Engenharia de Produção, ele fez a distinção entre engenharia de escala micrométrica e o novo campo da engenharia, em escala submicrométrica, na época as menores estruturas fabricadas apresentavam dimensões em média de 20 micrometros (µm) e esta era uma ciência que estava despontando (Enderlein, 1994; Duran *et al.*, 2006; Hirata *et al.*, 2012).

A nanotecnologia é representada por partículas muito pequenas, que variam de 1 a 1000 nm (nanômetro), esta escala equivale desde dimensões atômicas até aproximadamente o comprimento de onda da luz visível, neste nível as propriedades dos materiais são determinadas e ainda podem ser controladas (Duran *et al.*, 2006).

Esta técnica é um processo alternativo que permite também obter a liberação lenta de produtos voláteis ou instáveis. Na literatura são descritos três métodos para

obtenção de nanocápsulas: Polimerização *in situ* de monômeros dispersos (Al Khouri *et al.*, 1986), Deposição interfacial de polímero pré-formado (Fessi *et al.*, 1989) e Emulsificação-difusão (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998).

Entre todos os métodos citados acima, a Deposição interfacial do polímero pré-formado é o mais simples, apresentando a vantagem de resultar em dispersões coloidais homogêneas, nas quais o tamanho médio das nanocápsulas varia entre 20 e 500 nm. Essa técnica está fundamentada no deslocamento de um solvente miscível em água com formação espontânea da suspensão coloidal. A deposição do polímero acontece no momento em que o solvente rapidamente se difunde para a fase aquosa. Considerando que a cavidade central é formada por um óleo (não tóxico), altas taxas de encapsulação de fármacos hidrofóbicos (insolúveis em água) em nanocápsulas têm sido relatadas, como também, não ser esse o método adequado para encapsular substâncias hidrofílicas que são aquelas solúveis em água (Pinto Reis *et al.*, 2006).

As principais etapas utilizadas para a caracterização físicoquímica de nanocápsulas poliméricas são: avaliação morfológica, distribuição de tamanho e potencial de superfície de partículas, pH das suspensões coloidais, doseamento e determinação da taxa de encapsulação do fármaco, cinética de liberação *in vitro* do fármaco a partir da formulação e estudo de estabilidade das nanocápsulas (Schaffazick *et al.*, 2003).

1.5.1. Sistemas de veiculação coloidais

Os sistemas de liberação do princípio ativo em escala nanométrica são empregados a fim de controlar a cinética de liberação do composto, sua biodistribuição e minimizar os efeitos colaterais, aumentando assim, o índice terapêutico (Kayser *et al.*, 2005). Esses sistemas nanoestruturados possuem várias vantagens como proteção à degradação prematura da substância e maior interação com o meio biológico, aumenta a absorção em tecidos específicos, e da biodisponibilidade, do tempo de retenção e aumenta a penetração intracelular das nanopartículas (Alexis *et al.*, 2008). Essa capacidade de liberação será influenciada pelo tamanho de partícula, carga superficial, modificação na superfície da nanopartícula e hidrofobicidade (Brannon-Peppas e Blanchette, 2004).

Nanopartículas poliméricas é uma expressão coletiva usada para designar tanto nanoesferas quanto nanoemulsões as quais diferem entre si segundo a composição e a organização estrutural (Guterres *et al.*, 2006).

As nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica compacta (figura 01), enquanto que, as nanoemulsões são constituídas por um núcleo líquido (geralmente oleoso) envolvido por uma membrana polimérica caracterizando um sistema nanovesicular do tipo reservatório como representado na figura 02. (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998; Schaffazick *et al.*, 2003). Os fármacos veiculados através de nanocápsulas podem estar localizados no núcleo oleoso e/ou adsorvido à parede polimérica externa. A nanocápsula é uma forma farmacêutica de grande interesse devido a sua cavidade central oleosa, a qual permite altas taxas de encapsulação de substâncias hidrofóbicas. As vantagens das nanocápsulas com relação às nanoesferas é seu baixo conteúdo de polímero e maior capacidade de carregamento de fármacos lipofílicos (Blouza *et al.*, 2006). A veiculação do princípio ativo no interior de nanocápsulas permite mudar o perfil farmacocinético (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e farmacodinâmico (ação terapêutica) destes compostos encapsulados com conseqüente melhoria de sua ação, biodisponibilidade e/ou redução da toxicidade (Mosqueira *et al.*, 2000).

Atualmente, é possível distinguir dois tipos principais de nanopartículas poliméricas: as convencionais e as de longa-circulação (chamados de furtivos ou Stealth). As nanopartículas convencionais são caracterizadas por uma superfície hidrofóbica e, quando introduzidas no organismo são rapidamente capturadas pelo sistema fagocitário mononuclear (macrófagos) o que reduz sua permanência na corrente sanguínea, aumentando a presença desses nanocarreadores em órgãos como fígado, baço, pulmão. Já os furtivos têm sua superfície modificada pela introdução de moléculas hidrofílicas (polietilenoglicol - PEG, polissorbatos) as quais diminuem a hidrofobicidade das partículas, o que aumenta sua permanência no sangue favorecendo a biodistribuição para tecidos, além do sistema retículo endotelial (Redhead *et al.*, 2001; Avgoustakis *et al.*, 2003; Olivier, 2005).

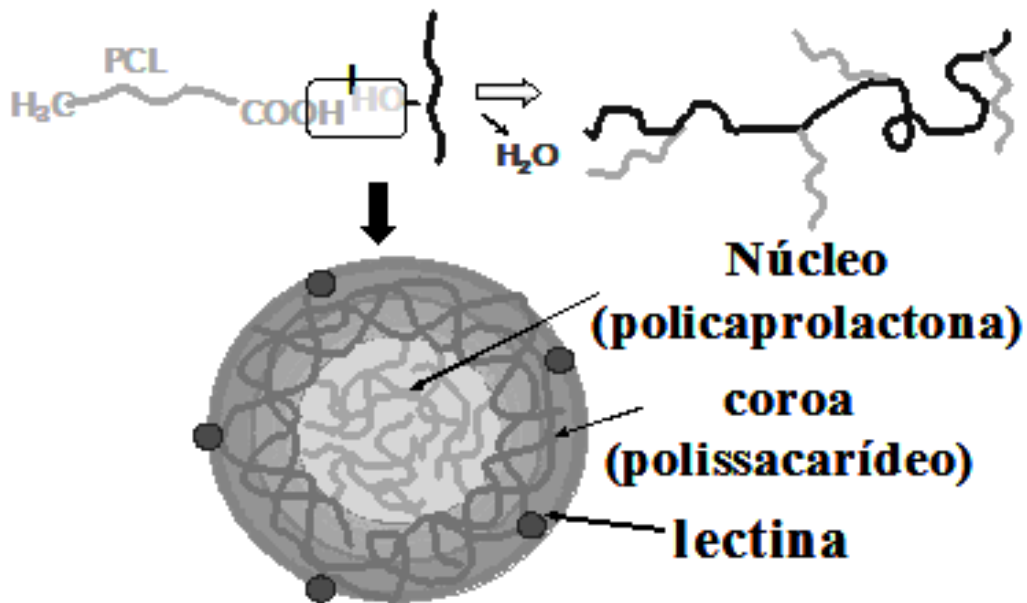


Figura 02. Representação esquemática de nanoesferas sítio-específico do tipo núcleo-coroa de dextrana-PCL (Rodrigues *et al.*, 2003).

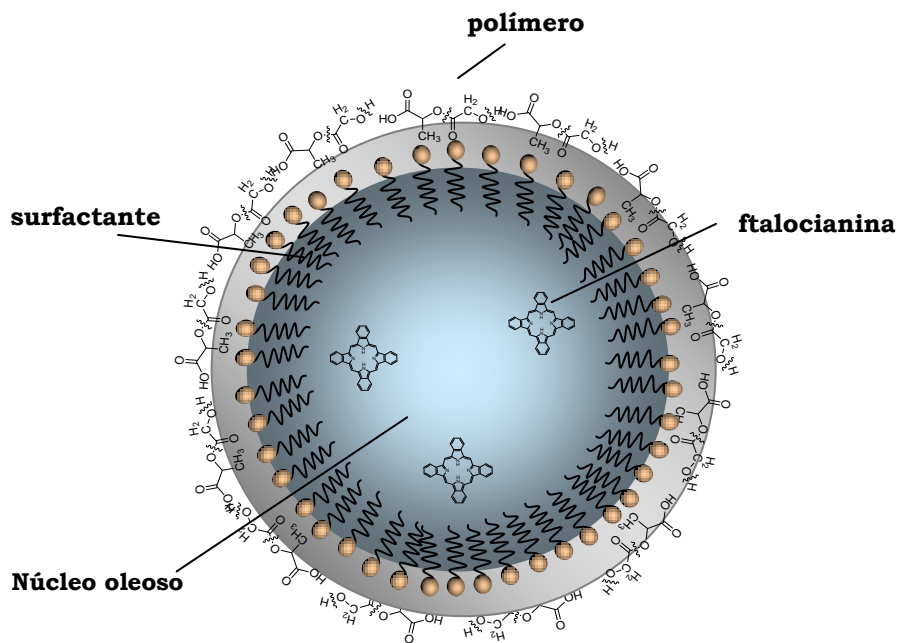


Figura 03. Representação de uma nanoemulsão contendo ftalocianina no núcleo oleoso (Primo *et al.*, 2007).

As nanopartículas têm recebido considerável atenção como adequados sistemas de administração de fármacos devido aos seguintes benefícios e vantagens (Teixeira *et al.*, 2005), a saber:

- Veiculação de princípio ativo lipofílico (insolúvel nos fluidos orgânicos);
- Proteção do conteúdo encapsulado da degradação (seja enzimática, hidrólise);
- Liberação controlada e/ou sustentada de fármacos;
- Otimização da dose administrada com conseqüente diminuição da toxicidade e reação adversa inerente à substância;
- Direcionamento a sítios específicos (tecidos, células, microorganismos).

Os principais polímeros utilizados para produzirem nanopartículas são policaprolactona (PCL), poli-ácido láctico (PLA), poli-ácido glicólico (PGA) e seu copolímero poli-láctico-co-glicólico (PLGA). Tais polímeros são conhecidos pela sua biocompatibilidade e biodegradabilidade através de vias metabólicas clássicas (Pillai e Panchagnula, 2001; Hans e Lowman, 2002; Santos *et al.*, 2005).

No País, já se tratam doenças graves como o câncer, tuberculose, epilepsia e outras patologias, utilizando-se fármacos desenvolvidos e veiculados com nanotecnologia e ação luminosa visível dentro o conceito de fotoprocesso. A malária, e outras doenças como Chagas e Leishmaniose podem também se beneficiar dos avanços já conseguidos, com o tratamento direto da Terapia Fotodinâmica no tecido lesionado, nas infecções em cavidades do corpo, tais como a boca, orelha, a cavidade nasal, bexiga e do estômago, e infecções de superfície da córnea e da pele (Hamblin e Hasan, 2004; O'Neill *et al.*, 2006; Wainwright e Amaral, 2005; Grellier *et al.*, 2008; Dutta *et al.*, 2005).

As pesquisas com a nanotecnologia também apresentam novos empreendimentos, como a inserção de nanopartículas de permetrina em tecidos que repelem e matam insetos vetores de doenças. As roupas antivetores foram desenvolvidas por uma empresa alemã, testadas em laboratórios na Suíça, aprovadas pela OMS e já estão sendo usadas por tropas do Leste Europeu e exércitos dos Estados Unidos e Colômbia. No Brasil, segunda a empresa, as roupas serão usadas inicialmente pelas tropas do Exército na região de Foz do Iguaçu. De acordo com a química responsável será uma proteção muito importante para o

Exército Brasileiro em operações nas áreas endêmicas (<http://www.abqct.com.br/vnoticia.aspx?id=100>).

Os materiais nanocompostos estão sendo estudados sob todos os aspectos, inclusive no que diz respeito à biossegurança. A partir de 2005, o Comitê Científico da Comissão Europeia em Riscos Emergentes e Recentemente Identificados à Saúde (*European Commission Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks- SCENIHR*) publicou estudos que dizem a respeito do impacto das nanopartículas à saúde humana (Hirata *et al.*, 2012).

Em geral, os estudos que tratam da biossegurança destes materiais são enfáticos sobre a capacidade de dispersão das nanopartículas. A toxicidade, previsão e prevenção de riscos e a quantificação do tempo de exposição a estes materiais são fatos que precisam ser definidos (Maynard *et al.*, 2011).

De acordo com os estudos realizados por Oberdorster (2012), a avaliação do comportamento biológico dos nanomateriais não é suficiente pela quantidade em massa, o tamanho e a quantidade de partículas também são importantes para estimar a relação de dose - efeito toxicológico. Este autor comparou as características, parâmetros biocinéticos e efeitos de nanopartículas e macropartículas inaladas, e concluiu que nanocápsulas menores que 100 nm translocam-se para órgãos-alvos secundários, como por exemplos a mitocôndria e o núcleo, enquanto nanopartículas maiores que 500 nm, não apresentam essa translocação para estes alvos.

No entanto, ainda não temos ferramentas completas para a avaliação das propriedades de materiais nanoencapsulados, quanto ao risco sobre os indivíduos. Os cientistas, as organizações internacionais e as agências regulatórias estão trabalhando fielmente em busca do desenvolvimento de uma metodologia segura para este tipo de avaliação (Hirata *et al.*, 2012) .

Enquanto este método de segurança não se define, Grieger *et al.*, (2010), sugere que uma força tarefa, na prevenção e vigilância em saúde, seja prioridade para cercar e alertar qualquer efeito das nanopartículas sob à saúde e ao meio ambiente.

Neste contexto, o trabalho ora apresentado, está voltado para o estudo de estratégias com eficiência e segurança para o controle da malária, por meio de inovações biotecnológicas, incluindo a nanotecnologia, hoje presente em vários

procedimentos modernos de tratamento à saúde humana, no desenvolvimento de compostos inseticidas a partir de princípios ativos naturais (Tedesco, 2006; 2007). No seu escopo, são apresentados três modelos de estudo, com material nanoestruturado, para avaliar o Dilapiol quanto ao potencial de repelência, efeito sinérgico e mortalidade de mosquito pelo contato tóxico, constituindo-se em ferramentas eficazes para a proteção do homem, quando em contato com a mata e exposto ao vetor da malária.

2.0 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Inserir sistemas nanoestruturados para avaliar o Dilapiol em ações de controle do mosquito *Anopheles darlingi*, vetor da malária.

2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar as nanocápsulas de dilapiol/piretróides de acordo com a morfologia, n° de partículas e estabilidade da formulação;
- Avaliar o potencial de repelência do Dilapiol em relação ao comportamento hematofágico de *A. darlingi* sobre o homem;
- Quantificar o efeito sinérgico do composto nanoestruturado na associação dilapiol/piretróides pelo método da prova biológica de parede;
- Avaliar a eficácia da aplicação tópica do composto nanoestruturado através da taxa de mortalidade.

3.0. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local do desenvolvimento do trabalho

A extração e o isolamento do dilapiol foram realizados, em colaboração, no laboratório do Grupo de Prospecção e Aplicação de Micromoléculas Naturais da Amazônia da Coordenação de Pesquisa de Produtos Naturais (CPPN- INPA).

A preparação da nanoencapsulação do dilapiol/piretróides foi realizada também em colaboração com o Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual, da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo.

A prova biológica de parede, o potencial de repelência e o contato tópico, usados para testar os produtos nanoestruturados (dilapiol/piretróides), foram realizados no Laboratório de Malária e Dengue da Coordenação de Sociedade Ambiente e Saúde (CSAS-INPA).

3.2. Coleta do material botânico

As folhas e partes aéreas de *P. aduncum* foram coletadas ao longo do acostamento da Rodovia BR-174 entre os quilômetros 05 e 21, Manaus/Boa Vista (figura 04). Após a coleta, o material foi acondicionado em sacos plásticos escuros devidamente etiquetados com georeferenciamento do local e data da coleta (13/12/2010). O material vegetal coletado foi mantido em estufa por 24 h na temperatura de 50 °C, após estarem completamente secas, as folhas foram separadas dos galhos finos, moídas manualmente e pesadas.

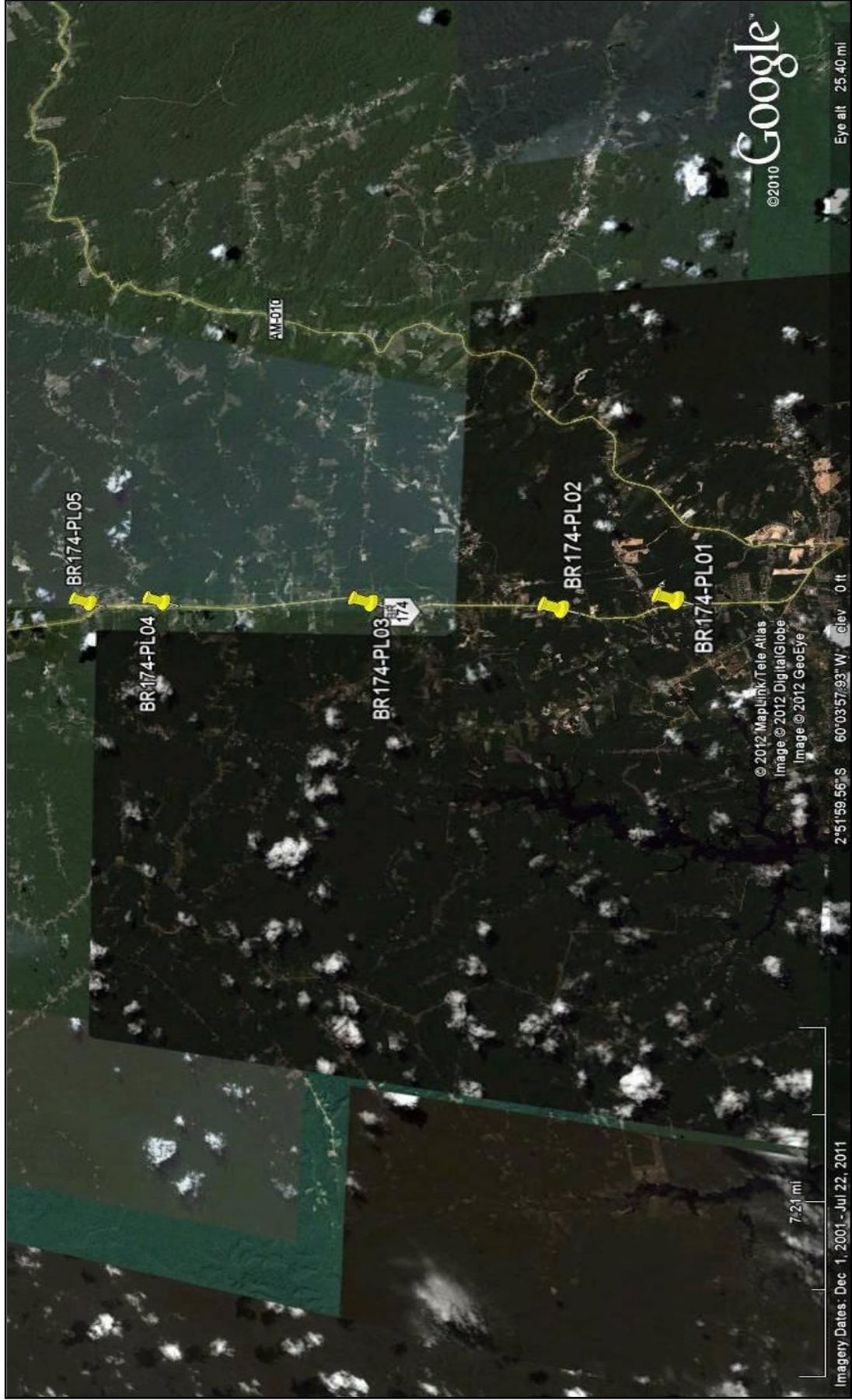


Figura 04. Imagem *landsat* dos locais de coleta de material vegetal utilizado neste estudo. Em destaque os pontos georeferenciados: BR174-PL01 – Brejo do matão 1; BR174-PL02 – Colégio Ester; BR174-PL03 – Brejo do matão 2, menor infrator; BR174-PL04 – Colégio Interno Rainha dos Apóstolos; BR174-PL05 – Entrada do ramal Nova Esperança, km 26.

3.3. Extração do óleo essencial e isolamento do dilapiol

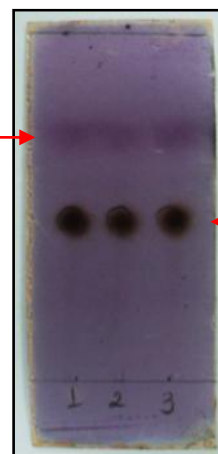
O material foi moído e transferido para um balão de fundo redondo de 6L utilizando a manta de aquecimento de acordo com o tamanho do balão, em seguida, foi acoplada a aparelhagem de Clevenger, iniciando a extração do óleo volátil pelo método de hidrodestilação, por 4 horas. Esta etapa do trabalho foi realizada por três vezes, pois o maior balão de extração não comportava o material coletado. Na primeira extração foi utilizada 877,71 g do material moído, na segunda 303,86 g e a última 687,94 g. Após o óleo estar livre de solvente, foi acrescentado sulfato de sódio anidro comercial para retirar a água residual presente no óleo. Em seguida, o óleo foi analisado por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando cromatoplasmas de sílica gel 60, em diferentes sistemas de eluição. O isolamento do dilapiol, a partir do óleo, foi realizado com o emprego de técnicas cromatográficas- cromatografia em coluna e em camada delgada (figura 05).

O princípio ativo isolado foi identificado através da comparação com amostras autênticas (padrões), utilizando: cromatografia gasosa de alta resolução (CG) e cromatografia gasosa acoplada com espectrômetro de massas (CG-EM).



A

Resíduo do Solvente e outros compostos

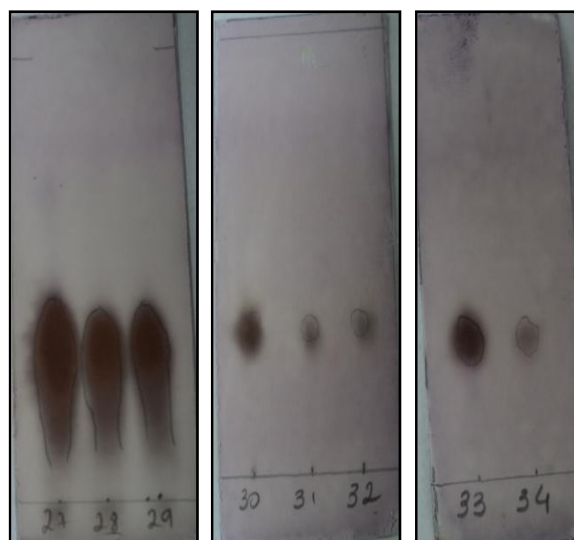


Óleo essencial

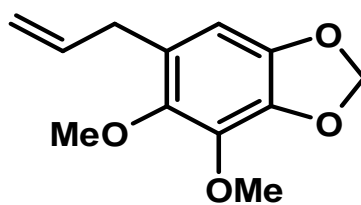
B



C



D



dilapiol

E

Figura 05. A - Extração do óleo essencial de *P. aduncum* por hidrodestilação; B - Identificação do óleo por CCD, Hexano/AcoEt 85:15; C - Isolamento do dilapiol por cromatografia em coluna; D- Identificação do dilapiol nas frações 27 a 34 por CCD, Hexano/AcoEt 96:4; E - Representação da estrutura química do dilapiol isolado.

3.4. Inseticidas utilizados nos testes com sinergismo

Os inseticidas utilizados, neste trabalho, foram os piretróides usados atualmente nas ações de controle de vetores – **Alfacipermetrina** marca comercial: FENDONA SC 6, registrada pela BASF Ltda, composta por Alpha-cipermetrin 6%; **Cipermetrina** marca comercial: CYPEREX 250 CE, registrada por ROGAMA INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA, composta por RS) alfa-ciano-3-fenoxibenzil (1RS) –cis, trans-3-(2,2-diclorovinil)-2-2 dimetil ciclopropana carboxilato e **Deltametrina** marca comercial: DELTAGARD WG 250, registrada por Bayer CropScience - Environmental Science, composta por deltametrina, ácido cítrico, polímero de formaldeído, sal de sódio sulfonato de alquilato de naftaleno e mono di e tri isopropil naftaleno sulfonato de sódio.

3.5. Métodos de preparação de Nanocápsulas

3.5.1. Preparação dos sistemas nanoestruturados contendo os ativos e estudo de pré-formulação

A otimização da preparação de sistemas nanoestruturados contendo dilapiol associado aos piretróides comerciais foi produzida segundo o método de deposição de polímeros biocompatíveis e desenvolvidos para liberação sustentada (copoli ácido láctico glicólico – PLGA; poli ácido láctico - PLA) descrito por Fessi *et al.* (1989). Inicialmente foi realizado um estudo de pré-formulação para escolha da dispersão coloidal mais estável e concentração dos ativos, sendo esta utilizada na realização dos demais experimentos, para avaliação das formulações.

Para a preparação da fase orgânica primeiramente o polímero, a fosfatidilcolina (lipídeo), o óleo mineral e o princípio ativo (Dilapiol) foram solubilizados em acetona. Para preparação da fase aquosa foi adicionado o Poloxamer em água ultrapura sob agitação. Após, a fase orgânica foi gotejada na fase aquosa sob agitação constante por 10 minutos para melhor homogeneização. A seguir, o solvente orgânico e parte da água foram eliminados em rotaevaporador a 50 °C e 120 rpm. As nanocápsulas vazias foram preparadas do mesmo modo, mas sem a adição do princípio ativo. As formulações foram liofilizadas mediante uso de um crioprotetor adequado avaliando a melhor concentração do mesmo. Todas as formulações foram produzidas em triplicata e caracterizadas de acordo com os parâmetros físico-químicos citados adiante.

Uma vez desenvolvidos novos sistemas nanoestruturados contendo óleos essenciais como ativos associados ou não a outros princípios, um conjunto de experimentos foi realizado para caracterização destes sistemas, destacando-se entre eles:

- Distribuição de tamanho, Índice de polidispersão e Carga de superfície (Potencial Zeta - ζ) das nanocápsulas
- Análise morfológica
- Estudo de estabilidade das formulações

O método escolhido para preparação das nanocápsulas, deposição interfacial do polímero (nanoprecipitação), é um processo simples e reproduzível, amplamente utilizado para obtenção de suspensões de nanopartículas (Fessi *et al.*, 1989).

Os testes para verificar qual o melhor veiculador (base de nanocápsulas) foram realizados inicialmente com óleo de eugenol que é disponibilizado comercialmente, e este serviu como espelho para verificarmos a estabilidade do óleo nas nanocápsulas. Após os testes identificamos que as bases Sepigel e Carbopol 0,7%, foram os melhores para veiculação neste tipo de teste com creme nanoestruturado.

3.5.1.1. Distribuição de tamanho, índice de polidispersão e carga de superfície (Potencial Zeta - ζ) das nanocápsulas

O tamanho médio das nanopartículas, a distribuição de tamanho da suspensão coloidal e o índice de polidispersão foram determinados pela espectroscopia de correlação de fóton usando um Zetasizer[®] (Nano ZS90, Malvern, UK). A técnica empregada (espalhamento de luz) tem como objetivo auxiliar na caracterização dos sistemas de veiculação preparados, garantindo que os mesmos apresentem dimensões nanométricas. As medições foram feitas a temperatura ambiente, em um ângulo de detecção de 173° e a posição da medição na cubeta foi automaticamente determinada pelo software do equipamento.

3.5.1.2. Análise morfológica

As nanocápsulas foram submetidas à secagem física pelo método de Souza (2007), e adicionada diretamente na fita de carbono (a ser observada no MEV) e o excesso de amostra foi retirado com papel de filtro. Após a suspensão estar totalmente desidratada foi montada no suporte porta-amostras do microscópio

("stub"), e então revestida com partículas de ouro pelo aparelho metalizador. Em seguida foram realizadas as observações e as documentações no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) JSM 5600 JEOL do Fiocruz de Belo Horizonte.

3.5.1.3. Contagem das nanocápsulas

Após a visualização das nanocápsulas foram escolhidas duas micrografias representativas dos tipos e tamanhos encontrados. Para tanto, as imagens sofreram inversão (passadas para negativo). Uma folha do tipo "transparencia" foi colocada sobre as imagens para permitir a contagem das partículas; o mesmo foi realizado para a medição.

3.5.1.4. Estudos da Estabilidade das Formulações

As formulações foram acondicionadas em ambiente refrigerado a 4°C e suas propriedades físico-químicas foram avaliadas em intervalos de tempo regular durante três meses ou até constatar a instabilidade das mesmas. Para cada formulação foram analisados o tamanho das partículas e a carga de superfície (Potencial Zeta) (Calvo *et al.*, 1996; Santos-Magalhães *et al.*, 2000).

3.6. Obtenção dos adultos de *Anopheles darlingi* Root, 1926

Uma vez desenvolvidas as formulações nanoestruturadas, as nanocápsulas foram testadas por meio de provas biológicas que identificam o tipo de eficácia destas formulações.

3.6.1. Manutenção dos adultos para os testes de repelência

Os exemplares adultos de *A. darlingi* utilizados neste trabalho foram coletados em pontos de ocorrência na área periurbana de Manaus, nas Zonas Leste – Puraquequara, Brasileirinho e ao Sul da capital do Amazonas na estrada Manoel Urbano município de Iranduba – Km 24, ramal da cachoeira (figura 06). As capturas foram desenvolvidas entre 18 e 22 horas, realizadas na modalidade de atração humana com proteção (Foratini, 2002). Os espécimes capturados foram acondicionados em copos de papel parafinados em lotes com cerca de 30 indivíduos e guardados em uma caixa térmica de poliestireno (isopor), com papel toalha molhado, para a manutenção da umidade.

Em seguida foram transportados para o laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, onde permaneceram em repouso, até o dia seguinte, sendo identificados de acordo com as chaves taxonômicas de Gorhan *et al.* (1967) e Consoli e Lourenço de Oliveira (1994). Após a identificação, foram alimentados com sangue de pato doméstico (*Cairina moschata*), para maturação dos ovos e colocados individualmente em copos revestidos com papel filtro e umedecidos para ovoposição forçada que acontece em resposta ao intenso manuseio com a fêmea – estresse (figura 07).

O ciclo das formas imaturas foi mantido até o estágio adulto, estas fêmeas da F1 foram utilizadas nos bioensaios com o repelente nanoestruturado. Para completar todos os testes de repelência, também foram realizadas coletas diárias das formas imaturas, nos mesmos locais de coleta das fêmeas adultas utilizadas na ovoposição realizada no laboratório, ou em locais onde identificamos uma alta densidade de larvas da espécie *A. darlingi*, estas eram identificadas quando os adultos emergiam (figura 08).



Figura 06. Imagem *landsat* do local onde foram realizadas as coletas dos mosquitos. Em destaque os pontos georeferenciados ALADO - AL01 Ramal 9. Puraqueara; AL02 - Cristó Vive KM 11. Brasileirinho; AL03 - Raifram Ramal 7. Brasileirinho. IMATURO - IM01-Portela. Puraqueara; IM02 – Carlião. Puraqueara; IM03 - Ramal do Rufino. Puraqueara; IM04 - Ramal 13. Iranduba; IM05 – Robertão. Puraqueara; IM06 - Ramal 24 Cachoeira. Iranduba; IM07 – Prainha. Iranduba; IM08 - Ramal 9. Puraqueara.

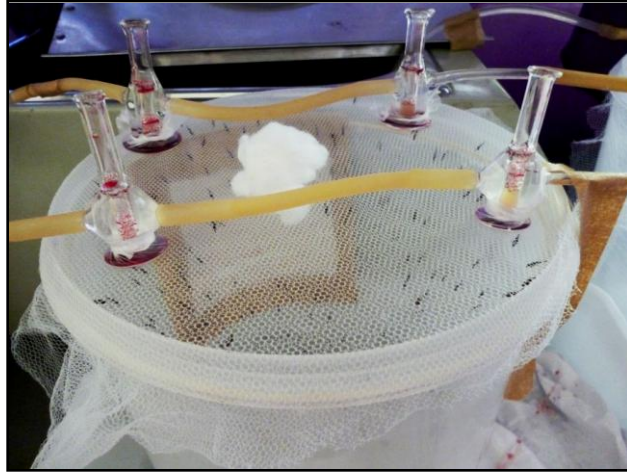
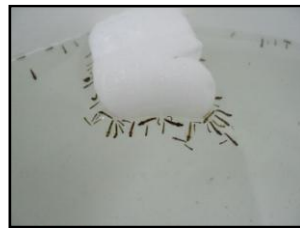


Figura 07. Alimentação dos adultos coletados no campo, com sangue de pato.



A



B

Figura 08. A – Coleta das formas imaturas no criadouro; B – Manutenção das larvas coletadas para obtenção de fêmeas adultas utilizadas nos testes de repelência.

3.7. Coleta dos mosquitos para os testes de mortalidade

3.7.1. Testes com a Prova Biológica de Parede

A coleta dos adultos utilizados na prova biológica de parede também ocorre na noite anterior ao teste, sendo os mosquitos capturados pela técnica de atração humana com proteção. Após a coleta os mosquitos foram transportados ao laboratório, identificados, armazenados, alimentados com solução de água e mel, na preparação de (2:1) e utilizados nos testes logo nos primeiros horários da manhã, por volta de 7:00 horas, que ainda é um período de temperatura baixa e as fêmeas não são afetadas por fatores climáticos.

3.7.2. Testes de contato tópico

Os mosquitos utilizados nos bioensaios para contato tópico (borrifação direta no mosquito) foram coletados na noite anterior ao teste, pelo método de atração humana com proteção, transportados ao laboratório, identificados e armazenados em caixas de isopor em câmara fria para manter a umidade.

Os mosquitos foram alimentados com algodão embebido na solução de mel, e utilizados ao entardecer, por volta das 18:00 horas que é o período em que as fêmeas adultas saem em busca do repasto sanguíneo.

3.8. Avaliação do Potencial de Repelência

3.8.1. Voluntários Humanos

Voluntários adultos, saudáveis, de ambos os sexos foram recrutados do Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Foram utilizados dois indivíduos (um homem e uma mulher) diferentes em cada bioensaio, para anular qualquer efeito do produto aos diferentes tipos de pele. Após serem entrevistados, os voluntários que não apresentaram história de doenças dermatológicas, reações alérgicas a picadas de mosquitos ou a repelentes foram informados sobre a metodologia do estudo, prováveis desconfortos que podiam surgir, o apoio e a reparação destes prováveis inconvenientes (WHO, 1996). Após estas informações se o voluntário estivesse de acordo com a sua participação no estudo, o mesmo preencheu o Termo de Consentimento Livre Esclarecido, fornecido pelo projeto de acordo com Comitê de Ética do INPA (anexo A).

3.8.2. Testes de repelência efetuados no laboratório

A análise de repelência foi realizada conforme protocolo descrito pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1996) com pequenas modificações. Este protocolo indica como avaliar os braços tratados, e não tratados com o dilapiol contra anofelinos em relação ao homem (Tawatsin *et al.*, 2001; Barnard e Rui-De Xue, 2004; Benjawan, *et al.*, 2005).

O material nanoencapsulado foi testado contra fêmeas de *A. darlingi* criadas em laboratório, observando o comportamento do mosquito em relação à área tratada do voluntário. A concentração do dilapiol isolado para a preparação do creme nanocomposto foi 0,865 g (750 µL) em cinco mL de formulação. Os testes realizados com o dilapiol isolado, não nanoencapsulado, foram realizados aplicando o óleo puro diretamente no antebraço do voluntário, na quantidade de 0,762 g (662 µL). Todas as amostras foram testadas da mesma forma independente da composição se era nanoencapsulado ou não nanoencapsulado.

As gaiolas de rede utilizadas nos testes de repelência medem 30x30x30 cm. Reunimos duas gaiolas, uma para cada voluntário, com 50 fêmeas de *A. darlingi*, não alimentadas, criadas em laboratório, com idade entre 5-7 dias. O teste foi realizado na temperatura de 27-30°, Umidade Relativa entre 60-80% e os mosquitos permaneciam na gaiola em repouso por 1h para aclimatação. Antes da aplicação da amostra no antebraço do voluntário, este foi cuidadosamente lavado com detergente neutro, sem cheiro, bem enxaguado e seco por 10 minutos.

As mãos dos voluntários foram vestidas com luvas de procedimento cirúrgico e recobertas com luvas de pano, somente os antebraços dos voluntários ficaram descobertos. A amostra foi aplicada uniformemente sobre um antebraço em cada voluntário, permitindo secar por 1 minuto, no outro antebraço nada foi aplicado representando o braço controle. Os braços tratados e controle dos voluntários foram inseridos simultaneamente, mas cada um permanecia em lados opostos dentro da gaiola (figura 09).

Os experimentos foram replicados por cinco vezes para cada amostra, usando voluntários diferentes, e dias diferentes para anular qualquer efeito do repelente sobre os resultados em condições adversas de cada dia. Entre cada período do teste os voluntários ficaram em uma sala reservada para evitar que a

área tratada fosse afetada, encostando ou esfregando os locais onde o produto foi aplicado em seus antebraços.



Figura 09. A - Gaiolas utilizadas nos testes; B – Realização dos testes de repelência com voluntários humanos.

O período do teste depende do hábito do mosquito, se ele pica de dia ou de noite, como *A.darlingi* tem o hábito crepuscular, o teste foi realizado entre 18:00 e 21:00 h. O número de picadas foi contado durante 3 minutos a cada 30 minutos, até 90 minutos (anexo B). A porcentagem de proteção foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Proteção: } \frac{\text{n}^\circ \text{ de picadas recebidas pelo braço controle} - \text{n}^\circ \text{ de picadas recebidas pelo braço tratado.}}{\text{n}^\circ \text{ de picadas recebidas pelo braço controle}} \times 100$$

3.9. Avaliação da Atividade Adulticida

3.9.1. Prova Biológica de Parede

A avaliação do poder residual foi realizada pelo método padrão de Provas Biológicas de Parede da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1975). Esta técnica permite quantificar o efeito sinérgico das amostras nanoencapsuladas associadas dilapiol/piretróides.

O material básico para esta prova foi adquirido pela OMS, *cone chambers* modelo (VBC/81.5) é um kit composto por 12 cones plásticos transparentes de 60

mm de comprimento, 90 mm no maior diâmetro interno e 25 mm no menor, com a abertura localizada na base menor, com 10 mm de diâmetro, fita gomada, pregos de aço, fitas de espuma de borracha de 10 m de comprimento, 15 mm de largura e 4 mm de espessura. Para veiculação dos insetos foi utilizado o aspirador tipo Castro, ajustado para o tamanho do cone (figura 10A).

As nanocápsulas foram impregnadas em placas de madeira medindo 36x14 cm da espécie *Hymenaea courbaril* L. 1753, conhecida como jatobá. Esta espécie não apresenta cheiro e foi retirada diretamente da mata, sem tratamento, compradas em serraria legalizada (figura 10B).

As placas foram impregnadas com Deltametrina, Cipermetrina, Alfacipermetrina, Dilapiol, Delta+dilapiol, Ciper+dilapiol, Alfa+dilapiol, placa sem borrifação (controle da madeira), Cipermetrina comercial, Alfacipermetrina comercial e Deltametrina comercial representados em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,8, 9, 10 e 11, respectivamente (figura 10C).

O material foi borrifado na concentração 50% menor que a indicada pelo fabricante dos produtos comerciais, conforme tabela abaixo:

Tabela 01. Cálculos de concentração do ingrediente ativo (i.a.) do produto comercial x amostras nanoencapsuladas utilizadas na prova biológica de parede.

Amostras	i.a. no Produto Comercial	i.a. no Produto Comercial 50% menor	i.a. na amostra testada 50% menor que a do fabricante	i.a. (50%) na área a ser borrifada indicada pelo fabricante	i.a. na área da placa
Deltametrina	1,25 g/10 L de água	0,625 g/10 L de água	0,0003125 g (0,00125 mg do produto)/5 mL de formulação	0,0625 g (1 L do produto diluído) /20.0000 cm ²	0,0001575 g (2,52 mL da amostra testada)/504 cm ²
Cipermetrina	12,5 g/10 L de água	6,25 g/10 L de água	0,003125 g (12,50 µL do produto)/5 mL de formulação	0,625 g (1 L do produto diluído) /20.0000 cm ²	0,001575 g (2,52 mL da amostra testada)/504 cm ²
Alfacipermetrina	1,5 g/5 L de água	0,75 g/5 L de água	0,00075 g (12,50 µL do produto)/5 mL de formulação	0,15 g (1 L do produto diluído) /20.0000 cm ²	0,000378 g (2,52 mL da amostra testada)/504 cm ²
Dilapiol	-	-	0,05 g / 5 mL de formulação	-	0,0252 g(2,52 mL da amostra testada)/504 cm ²
Sinergismo					
Delta+Dilapiol	-	-	0,0003125 g do i.a. do inseticida + 0,05 g do Dilapiol em 5 mL de formulação	-	0,0001575 g + 0,0252 g de Dilapiol(2,52 mL da amostra testada)/504 cm ²
Ciper+Dilapiol	-	-	0,003125 g do i.a. do inseticida +0,05 g do Dilapiol em 5 mL de formulação	-	0,001575 g + 0,0252 g de Dilapiol (2,52 mL da amostra testada)/504 cm ²
Alfa+Dilapiol	-	-	0,00075 g do i.a. do inseticida +0,05 g d Dilapiol em 5 mL de formulação	-	0,000378 g + 0,0252 g de Dilapiol (2,52 mL da amostra testada)/504 cm ²

As amostras utilizadas nos testes foram enviadas em três momentos diferentes: O primeiro conjunto de amostras foi testado com as placas lixadas e não pintadas; a segunda remessa foi testada com placas lixadas e pintadas com tinta da marca *Iquine* tipo acrílica fosco-aveludado, cor branco neve. Esta tinta foi escolhida por ser uma marca de baixo custo, popular, utilizada nos bairros da zona periurbana de Manaus, locais endêmicos dos mosquitos transmissores da malária; e a terceira e

última remessa foi testada com as placas lixadas e não pintadas. Os testes com as placas pintadas e não pintadas teve a intenção de verificar se há algum tipo de interferência na impregnação das nanopartículas, em diferentes superfícies.

Os insetos foram colocados em grupos de 15 exemplares nos cones e mantidos em contato forçado nas superfícies tratadas com as substâncias nanoestruturadas. As placas foram cobertas com um plástico preto, para melhorar o contato do mosquito com a parede. Em cada placa foram aplicados cones na vertical, em triplicata, conforme a figura 10D.

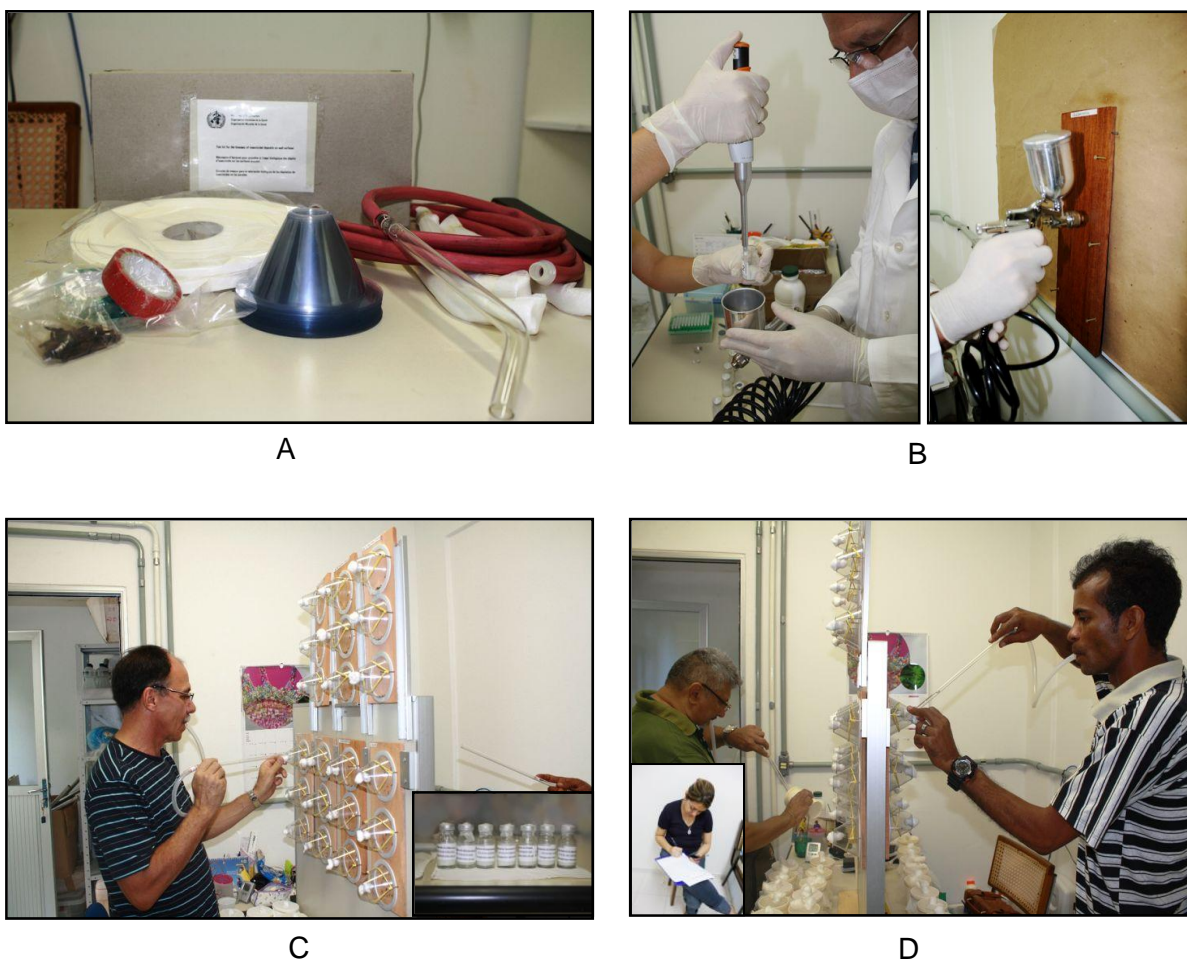


Figura 10. A – Kit de testes da OMS (VBC/81.5); B – Impregnação das placas com a nanoformulação; C – Disposição das placas; D – Realização da prova biológica de parede.

O tempo de exposição foi 30 minutos, onde foi registrada a mortalidade desde o primeiro contato até a mortalidade dos indivíduos (anexo C). Os sobreviventes foram acondicionados em copos parafinados, correspondendo um copo para cada cone, por um período de repouso de 24 horas, quando a mortalidade foi novamente

anotada. Os mosquitos mortos foram embalados em papel alumínio, identificando-se o cone e o horário da leitura. Os espécimes que sobreviveram após 24 horas de repouso, foram mortos com clorofórmio, embalados e identificados como sobreviventes.

3.9.2. Avaliação dos Compostos Nanoestruturados por meio de Contato Tópico

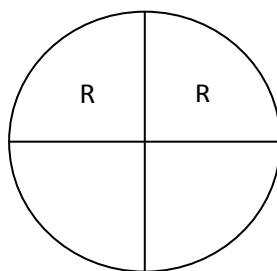
O material nanoestruturado também foi avaliado quanto a sua eficácia, por meio do contato tópico que consistiu na aplicação direta do produto sobre os exemplares de *Anopheles darlingi*. As gaiolas para este teste tinham a dimensão de 15 cm de diâmetro por 3 cm de altura e foram confeccionadas com canos de Poli Cloreto de Vinila – PVC, utilizado na rede de distribuição de água da prefeitura de Manaus. As duas extremidades foram fechadas com telas de arame galvanizado deixando um pequeno orifício no aro, para a entrada do capturador com os exemplares de mosquitos (figura 11A). Estas gaiolas foram elaboradas pelo Laboratório de Malária e Dengue do INPA.

As aplicações das amostras foram feitas com um revólver de pintura modelo 5 Plus tipo Aerógrafo da marca ARPRES[®] acoplado a um compressor de ar de diafragma, isento de óleo, com filtro e válvula de pressão constante, modelo Jetfácil, marca Schulz S.A. As borrifações foram feitas com a distância de 30 cm das gaiolas de PVC. Os testes foram realizados com três repetições, sendo os mosquitos distribuídos em três gaiolas com 10 indivíduos em cada uma, totalizando 240 mosquitos no teste completo.

As leituras de mortalidade foram realizadas logo após a aplicação às 18h00, e a cada duas horas até meia noite. As leituras subsequentes aconteceram a partir das 06h00 da manhã, 10h00, 13h00, e a última às 24h00. Após a borrifação os mosquitos foram transferidos para copos parafinados telados, identificados de acordo com a amostra aspergida, alimentados com solução de mel e registrada a mortalidade inicial (figuras 11B; 11C).

A concentração borrifada sobre os mosquitos foi calculada de acordo com a área da gaiola de PVC, segue a sequência abaixo:

D= 15 cm



R= Raio

D=Diâmetro

Área= $\pi \cdot R^2$

A= $3,14 \cdot 7,5^2$

A= 177 cm²

A placa da prova biológica de parede foi borrifada com 2,52 mL do produto, a área impregnada era de 504 cm², utilizamos a mesma proporção para área da gaiola de PVC que foi 177 cm², então utilizamos 0,89 mL para borrifar em cada gaiola, como realizamos o ensaio em triplicata, borrifamos um total de 2,66 mL por amostra testada. A concentração do ingrediente ativo aplicado em cada gaiola, para cada amostra segue na tabela 02.

Tabela 02. Cálculos de concentração do ingrediente ativo (i.a.) do produto comercial x Amostras nanoencapsuladas utilizadas no contato tópico.

Amostras	Produto Comercial	i.a. na amostra testada 50% menor que a do fabricante	i.a. (50%) na área a ser borrifada indicada pelo fabricante	i.a. na área da Gaiola utilizada no teste
Deltametrina	1 sachê de 5g/10 L de água	0,0003 g (0,00125 mg do produto)/5 mL de formulação	0,0625 g (1 L do produto diluído) /20.0000 cm ²	0,0002 g (2,66 mL da amostra testada)/177 cm ²
Cipermetrina	50 mL do produto/10 L de água	0,0031 g (12,50 µL do produto)/5 mL de formulação	0,625 g (1 L do produto diluído) /20.0000 cm ²	0,0017 g (2,66 mL da amostra testada)/177 cm ²
Alfacipermetrina	25 mL/5 L de água	0,0008 g (12,50 µL do produto)/5 mL de formulação	0,15 g (1 L do produto diluído) /20.0000 cm ²	0,0004 g (2,66 mL da amostra testada)/177 cm ²
Dilapiol	-	0,05 g / 5 mL de formulação	-	0,0266 g(2,66 mL da amostra testada)/504 cm ²
Sinergismo				
Delta+Dilapiol	-	0,0003 g do i.a. do inseticida + 0,05 g do Dilapiol em 5 mL de formulação	-	0,0002 g + 0,0266 g de Dilapiol(2,66 mL da amostra testada)/177 cm ²
Ciper+Dilapiol	-	0,0031 g do i.a. do inseticida +0,05 g d Dilapiol em 5 mL de formulação	-	0,0017 g + 0,0266 g de Dilapiol (2,66 mL da amostra testada)/177 cm ²
Alfa+Dilapiol	-	0,0008 g do i.a. do inseticida +0,05 g d Dilapiol em 5 mL de formulação	-	0,0004 g + 0,0266 g de Dilapiol (2,66 mL da amostra testada)/177 cm ²

A mortalidade foi avaliada desde o primeiro momento da aplicação, e a cada duas horas aumentando o intervalo de leitura conforme o comportamento do inseto até 24 horas após a aplicação (anexo D).



A



B



C

Figura 11. A - Gaiolas utilizadas nos testes para contato tópico, medindo $\varnothing=15$ cm; 3 cm altura; B – Compressor utilizado para dispersão da formulação; C - Borrifação direta da amostra nanoencapsulada nos mosquitos.

3.9.2.1. Análise dos mosquitos após Contato Tópico por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

Após a borrifação direta das amostras nanoencapsuladas nos mosquitos, estes foram submetidos à secagem física (Souza, 2007). Este método consiste na completa desidratação da amostra, desta forma, as fêmeas foram deixadas em placa de Petri contendo sílica, por aproximadamente uma semana, após este período foram adicionadas diretamente na fita de carbono (a ser observada no MEV), montadas no suporte porta-amostras do microscópio ("*stub*"), e então

revestidas com partículas de ouro pelo aparelho metalizador. Em seguida foram realizadas as observações e as documentações no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) JSM 5600 JEOL do Fiocruz de Belo Horizonte (figuras 12A; 12B; 12C).



A



B



C

Figura 12. A - Amostras (*stub*) do inseto adulto e da emulsão metalizadas com na fita de carbono; B - Metalizador de amostras com partículas de ouro; C - Microscópio Eletrônico de Varredura – MEV do Fiocruz -MG.

4.0. COMITÊ DE ÉTICA DO INPA – CEP/INPA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do INPA (66ª Reunião Ordinária) e as atividades de coleta de mosquitos e a avaliação do potencial de repelência das substâncias nanoestruturadas estão descritos no Processo Nº 033/10 (anexo E).

5.0. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

5.1. Testes de Repelência

As amostras de repelente foram testadas em duplo cego, para evitar procedimentos tendenciosos, assim como, à padronização dos experimentos, no qual uma única pessoa aplicou o material no antebraço de todos os voluntários.

A análise dos dados brutos foi realizada por gráficos apresentando o percentual de repelência e pela média de picadas no braço tratado e não tratado, de acordo com o tempo de exposição (0,30,60 e 90 min) de cada amostra testada. A análise estatística foi realizada com os resultados de dez voluntários por amostra (cinco homens e cinco mulheres), no total foram testadas cinco amostras representadas por 50 voluntários.

Os testes para análise dos dados foram realizados por Análise de variância (ANOVA Fatorial) com fatores mistos, sendo independente a variável (substância) e dependente a variável (tempo) tendo em vista uma quantidade inicial de mosquitos que não foram repostos ou substituídos até o final do experimento (foram utilizados os mesmos 50 mosquitos durante todas as etapas do experimento), seguida do teste Tukey para identificar onde está a diferença significativa.

5.2. Prova Biológica de Parede

Os três momentos diferentes dos testes de prova de parede foram analisados com Análise de variância (ANOVA Fatorial) com fatores independentes, pois as substâncias são diferentes e em cada período de tempo avaliado foi utilizado o mesmo número de mosquitos (45) para todos os dias em que os testes foram realizados, seguida do teste Tukey para identificar onde está a diferença significativa.

5.3. Contato Tópico

A avaliação do contato tópico deu-se pelo método de Análise de variância (ANOVA Fatorial) com fatores mistos, sendo independente a variável (substância) e dependente a variável (tempo) tendo em vista um total de 30 mosquitos analisados por amostra, sendo distribuídos 10 indivíduos por gaiolas, que não foram repostos ou substituídos até o final do experimento, seguida do teste Tukey para identificar onde está a diferença significativa.

6.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Material Vegetal - Folhas e galhos finos de *P. aduncum*

O total do material coletado, seco e macerado manualmente foi 2,081 kg. O óleo essencial foi extraído em três etapas e obteve-se o total de 42,7392 g, equivalente a um rendimento da extração de óleo essencial de 2,05%.

Durante o processo de isolamento do dilapiol neste trabalho foi possível obter o óleo em níveis de pureza de 96% e 100%, sendo o rendimento de 36,9% (15,783 g) e 30,1% (12,8527 g), respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Maia *et al.* (1998), que analisou a quantidade de dilapiol presente em espécimes de *P. aduncum* coletadas em várias localidades da região amazônica. Outros autores como Ciccio e Ballester (1997), também avaliaram os constituintes voláteis das folhas e frutos de *P. aduncum* coletadas em duas localidades na Costa Rica. Os resultados mostraram que, após o fracionamento do óleo essencial bruto, 37,1% era dilapiol, valor aproximado ao obtido neste trabalho quando dilapiol estava no nível de pureza de 100%.

Os testes para padronizar o procedimento de nanoencapsulação foram realizados inicialmente com o dilapiol 96%, em virtude de não se conhecer a estabilidade do princípio ativo com deltametrina, alfacipermetrina e cipermetrina no momento da nanoencapsulação. Após este período de padronização e o conhecimento da estabilidade das amostras nanoestruturadas, foi utilizada a amostra do dilapiol 100% puro.

6.2. Caracterização das nanocápsulas

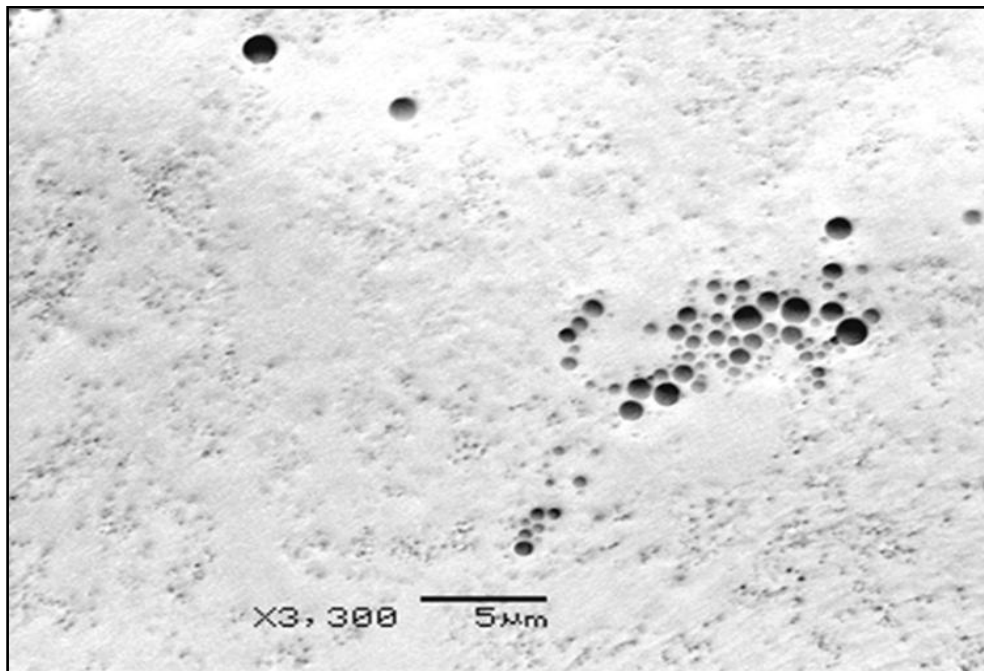
6.2.1. Análise morfológica das nanocápsulas

As nanocápsulas foram avaliadas em MEV, 28 dias após o recebimento da amostra procedente do Laboratório de Nanotecnologia de Ribeirão Preto, para a realização dos bioensaios em Manaus.

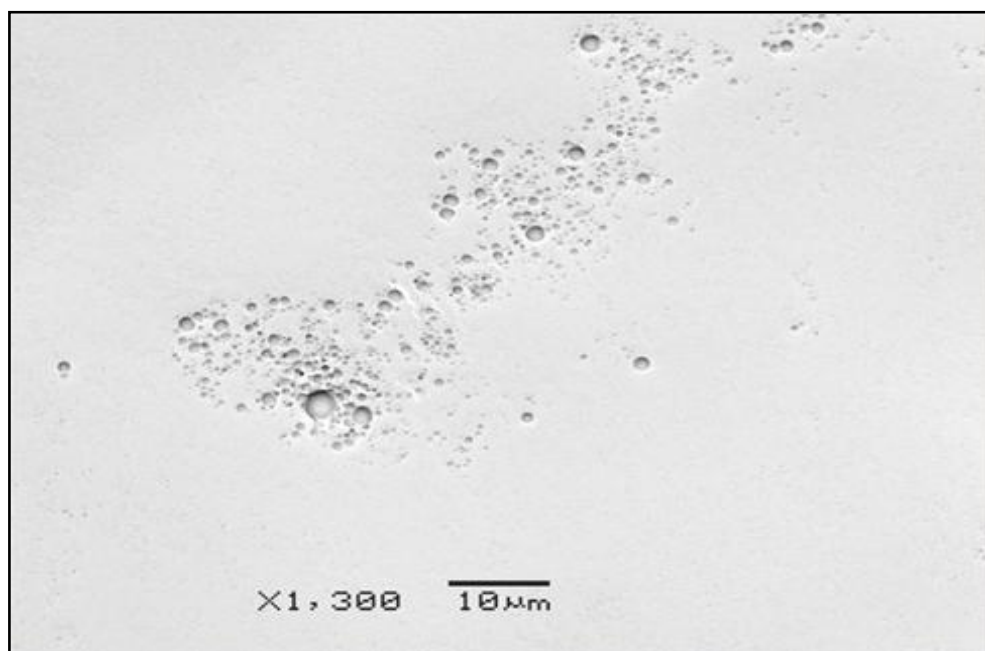
A secagem física das nanopartículas permitiu a observação de dois aspectos:

a) quanto à forma: foram observadas partículas arredondadas elétrons lucentes (figuras 13A; 13B);

b) quanto ao tamanho: foi constatada uma variação em relação ao tamanho, com partículas variando, em média, de 102 nm a 1064 nm.



A



B

Figura 13. A e B - Micrografias invertidas da análise morfológica das nanocápsulas, aplicadas diretamente na fita de carbono.

No total foram analisadas 4.696 nanopartículas, agrupadas em cinco tipos por tamanho aproximado: extra grande (≥ 1000 nm), grande (750 a 600 nm), média (500 nm), pequena (250 a 200 nm) e extra pequena (< 200 nm) (figuras 14A; 14B; 14C).

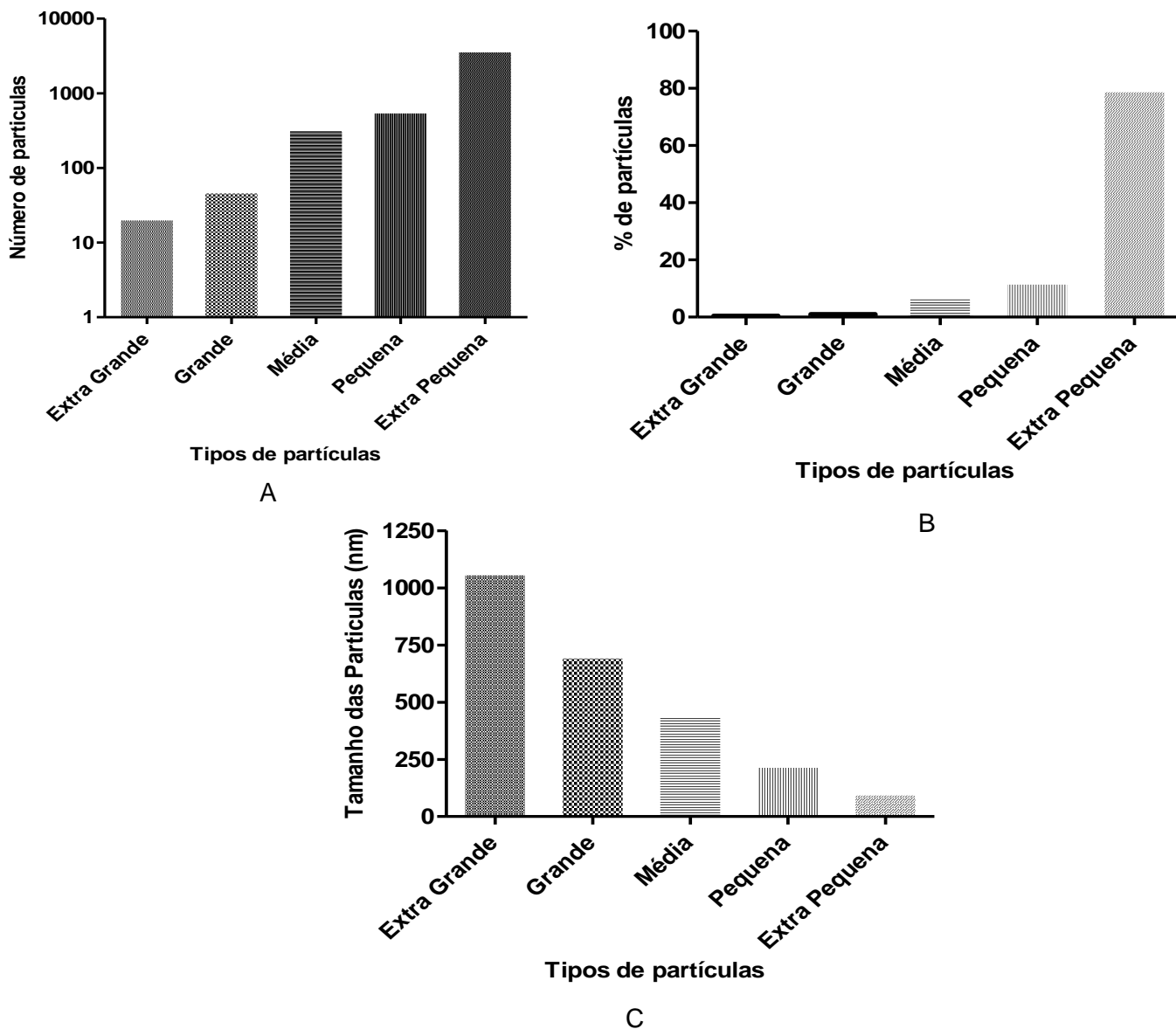


Figura 14. A - Análise das nanocápsulas referente ao número de partículas; B - Percentual das nanocápsulas referente ao total por tipo de partículas; C - Avaliação do tamanho das nanocápsulas.

6.2.2 Tamanho médio das nanopartículas, índice de polidispersão e potencial zeta

Para caracterização do sistema, primeiramente foi realizada a análise do tamanho de partícula das formulações. O equipamento realizou em média 12 determinações para cada análise (tabela 03).

Tabela 03. Tamanho da partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das diferentes formulações de nanocápsulas (n=3).

Nanocápsulas	Tamanho de partícula (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
Dilapiol	209,4 ± 0,25	0,191 ± 0,16	- 37,3 ± 0,09
Cipermetrina	196,7 ± 0,04	0,159 ± 0,16	- 38,5 ± 0,11
Alfacipermetrina	223,1 ± 0,09	0,281 ± 0,09	- 40,2 ± 0,11
Deltametrina	195,6 ± 0,04	0,201 ± 0,17	- 36,2 ± 0,1
Dilapiol + Cipermetrina	197,1 ± 0,09	0,163 ± 0,12	- 40,3 ± 0,06
Dilapiol + Alfacipermetrina	222,9 ± 0,12	0,265 ± 0,31	- 39,6 ± 0,03
Dilapiol + Deltametrina	176,8 ± 0,01	0,177 ± 0,24	- 40,1 ± 0,05

Os valores do Potencial Zeta neste trabalho exibiram carga negativa na faixa de -36,2 a -40,3 mV, similares aos resultados obtidos por Nambam e Philip (2012), com valores próximos à -45 mV. Entretanto, isso depende do peso molecular e o surfactante iônico utilizado (tensoativos) no método de nanoencapsulação.

Segundo Schaffazick *et al.* (2003), o valor relativamente alto do potencial zeta (ζ) é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes. O tamanho de partícula é uma importante propriedade das dispersões coloidais, uma vez que a tendência à sedimentação é determinada por mudanças nesse parâmetro (Magenheim e Benita 1991).

Além dos tensoativos, a fase oleosa, no presente trabalho o dilapiol, também pode influenciar no potencial zeta, assim como mostra o trabalho de Mora-Huertas *et al.* (2012), o tipo de óleo definiria a eficiência de encapsulação, independente do método e do tamanho quando as nanocápsulas são preparadas por nanoprecipitação (Hirenkumar *et al.*, 2011; Makadia e Siegel, 2011).

6.3. Análises de Repelência

Os testes para avaliar o dilapiol como repelente foram realizados com o óleo puro na quantidade de 0,762 g (662,44 μ L), espalhado em somente um antebraço do voluntário (braço tratado), ficando o outro livre de qualquer aplicação (braço não tratado).

O óleo do dilapiol nanoencapsulado foi testado na quantidade de 0,865 g (750 μ L/ 5mL de formulação) em dois tipos de formulação (sepigel e carbopol 0,7%) seguindo o mesmo modo de aplicação do óleo puro no antebraço, realizados em 25

dias com a participação de um casal de voluntários a cada dia. Considerando todos os bioensaios de repelência foram utilizados 2.000 fêmeas de mosquitos transmissores da malária humana – *Anopheles darlingi*. A figura 15 representa o percentual de repelência das amostras testadas.

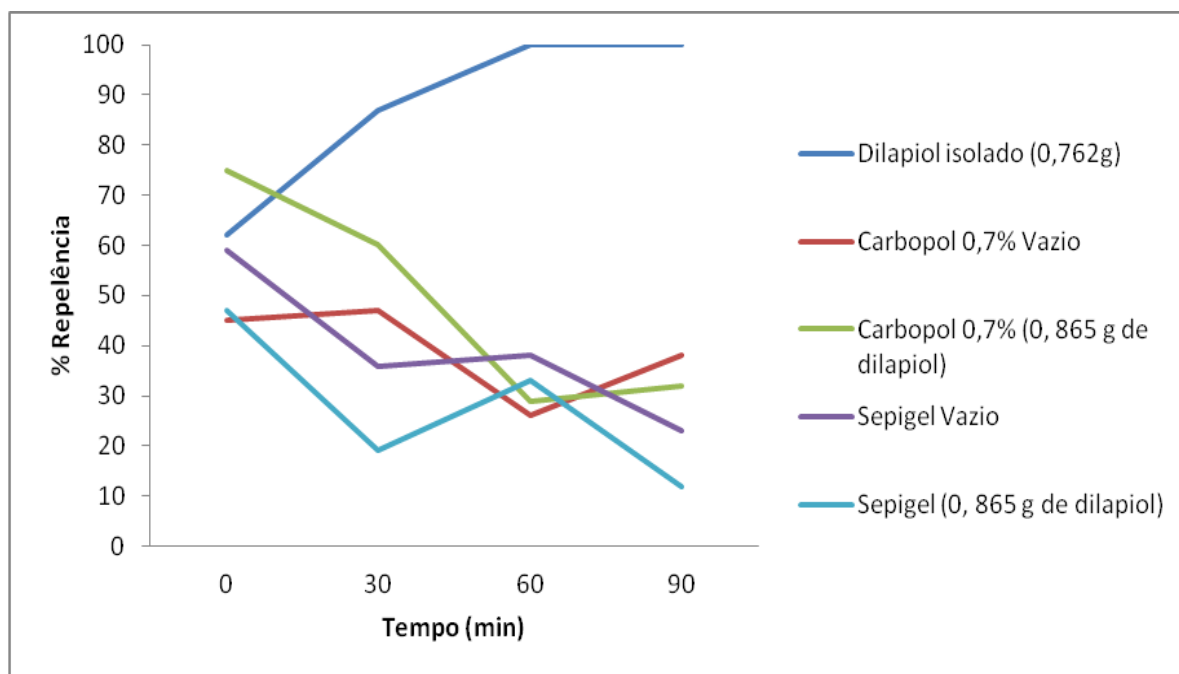


Figura 15. Percentual de repelência com exposição de três minutos a cada 30 min durante 90 min.

Os resultados mostraram que as formulações das nanocápsulas com os respectivos veiculadores (sepigel e carbopol 0,7%), ambos com dilapiol inserido, apresentaram 47% e 75% de repelência nos primeiros três minutos, logo após a aplicação do creme no antebraço dos voluntários. O dilapiol puro sem a formulação nanoencapsulada apresentou 62% de repelência no mesmo tempo avaliado das formulações.

Após 90 minutos da aplicação das formulações, a eficácia dos cremes sepigel e carbopol 0,7% com o dilapiol inserido baixou para 12% e 32% de repelência. O dilapiol puro mostrou 100% de repelência desde 60 min após a aplicação do óleo, perdurando até 90 min, o tempo máximo de avaliação das amostras.

As formulações de nanocápsulas vazias de sepigel e carbopol 0,7% representaram o “branco” dos testes. Estas, mesmo sem o dilapiol inserido, apresentaram 59% e 45% de repelência nos três minutos iniciais do teste, logo após a aplicação do creme. Aos 90 min as formulações vazias apresentaram 23% e 38% de repelência.

A média do número de picadas mostra que, em geral, o braço não tratado recebeu maior número de picadas em relação ao braço tratado (figura 16), e indica que nas amostras nanoencapsuladas vazias de sepigel e carbopol 0,7%, tanto no braço tratado como no não tratado, os mosquitos continuam com sua atividade de picar, sem se mostrarem inibidos com a amostra.

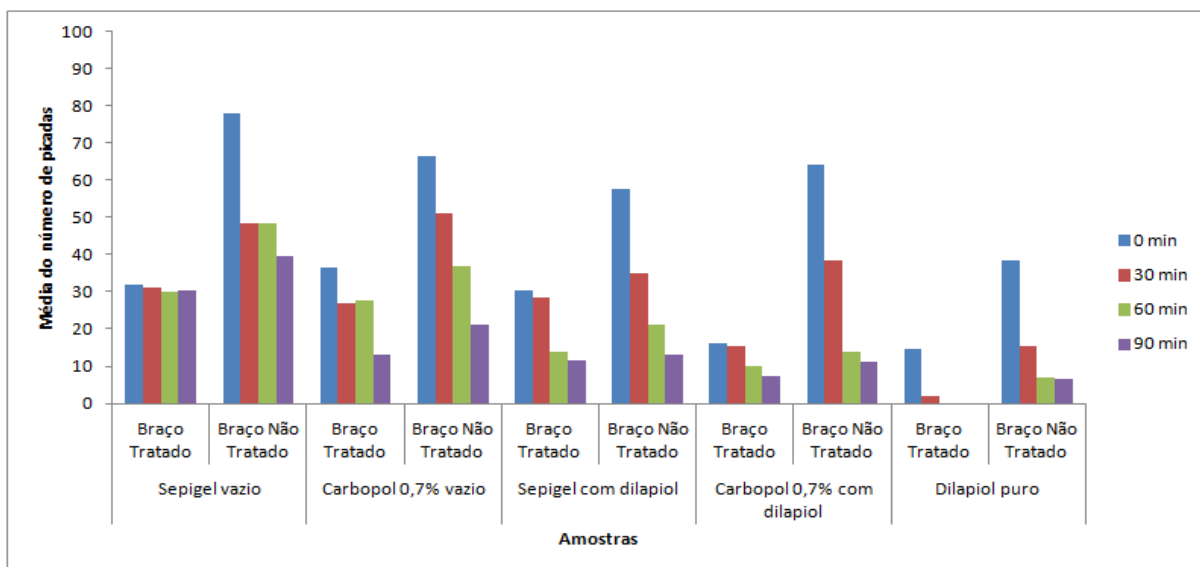


Figura 16. Média do número de picadas de cada amostra testada no braço tratado e não tratado.

Os resultados do teste da análise variância do número de picadas do braço não tratado mostram que o número de picadas é significativamente diferente tanto para as substâncias testadas quanto para o tempo após a aplicação. No entanto, esse número de picadas não depende da interação entre substância e tempo (tabela 04).

Tabela 04. Resultados da análise de variância fatorial (ANOVA) para a repelência das diferentes substâncias nos diferentes tempos testados – braço não tratado.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F	Valor Crítico	Probabilidade
Substância	1144,02	4	286,005	11,66309	2,6060	p < 0,05
Tempo	2213,32	3	737,7733	56,93672	2,6955	p < 0,05
Interação	139,38	12	11,615	0,896373	1,8503	p > 0,05
Total	6349,52	199	31,90714			

Por outro lado, quando analisada a variância dos testes com o braço tratado observou-se que o número de picadas é significativamente diferente, tanto para as substâncias testadas como para o tempo, bem como, diferente do descrito anteriormente, o número de picadas depende da interação entre substância e tempo

(tabela 05).

Tabela 05. Resultados da análise de variância fatorial (ANOVA) para a repelência das diferentes substâncias nos diferentes tempos testados– braço tratado.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F	Valor Crítico	Probabilidade
Substância	911,93	4	227,9825	19,06385	2,6060	p < 0,05
Tempo	137,8	3	45,93333	12,81596	2,6955	p < 0,05
Interação	112,35	12	9,3625	2,612251	1,8503	p < 0,05
Total	2184,08	199	10,97528			

Observando os dados pós-análise de variância (t-tukey) do braço não tratado, o tempo inicial (0) não apresentou diferença significativa entre as amostras nanoencapsuladas quando comparadas ao óleo do dilapiol puro - $p > 0,05$ (tabela 06). Igualmente, em 30 minutos após o início do teste, a nanocápsula de sepigel contendo o dilapiol não apresentou diferença significativa quando comparada com o dilapiol puro, sendo $p > 0,05$ (tabela 07). Em contrapartida, as nanocápsulas vazias de sepigel e carbopol 0,7% e o carbopol 0,7% contendo dilapiol, apresentaram diferença significativa quando comparadas ao dilapiol puro, sendo $p < 0,05$.

Tabela 06. Tempo 0 minutos, braço não tratado, probabilidades aproximadas para testes *post hoc* Erro: entre MS = 37,560, df = 45,000.

	Sepigel vazio	Cabopol 0,7% vazio	Sepigel com dilapiol	Carbopol 0,7% com dilapiol	Dilapiol isolado
Sepigel vazio					
Cabopol 0,7% vazio	0,916964				
Sepigel com dilapiol	0,570503	0,964513			
Carbopol 0,7% com dilapiol	0,844147	0,999768	0,989374		
Dilapiol isolado	0,113267	0,479463	0,860655	0,593523	

Tabela 07. Tempo 30 minutos, braço não tratado, probabilidades aproximadas para testes *post hoc* Erro: entre MS = 11,820, df = 45,000.

	Sepigel vazio	Cabopol 0,7% vazio	Sepigel com dilapiol	Carbopol 0,7% com dilapiol	Dilapiol isolado
Sepigel vazio					
Cabopol 0,7% vazio	0,997539				
Sepigel com dilapiol	0,411399	0,246028			
Carbopol 0,7% com dilapiol	0,692137	0,489196	0,990907		
Dilapiol isolado	0,001383	0,000577	0,132346	0,047717	

Após uma hora do início do teste, as nanocápsulas vazias sepigel e carbopol 0,7% não diferiram entre si, sendo $p > 0,05$. A nanocápsula de sepigel apresentou diferença significativa quando comparada com as nanocápsulas de sepigel com dilapiol, carbopol 0,7% com dilapiol e com o dilapiol puro – $p < 0,05$. As nanocápsulas de sepigel com o dilapiol e o carbopol 0,7% vazio não foram significativamente diferentes, $p > 0,05$. O carbopol 0,7% vazio foi significativamente diferente quando comparado ao carbopol 0,7% contendo o dilapiol e ao dilapiol puro, $p < 0,05$ (tabela 08). As nanocápsulas de sepigel e carbopol 0,7% contendo o dilapiol não foram significativamente diferentes, $p > 0,05$. No tempo final (90 min) da avaliação, a nanocápsula de sepigel vazio apresentou diferença significante quando comparada com todas as outras nanocápsulas e também quando comparada com o dilapiol puro - $p < 0,05$ (tabela 09).

Tabela 08. Tempo 60 minutos, braço não tratado, probabilidades aproximadas para testes *post hoc* Erro: entre MS = 7,8689 df = 45,000.

	Sepigel vazio	Cabopol 0,7% vazio	Sepigel com dilapiol	Carbopol 0,7% com dilapiol	Dilapiol isolado
Sepigel vazio					
Cabopol 0,7% vazio	0,367827				
Sepigel com dilapiol	0,000764	0,097503			
Carbopol 0,7% com dilapiol	0,000155	0,005689	0,797348		
Dilapiol isolado	0,000134	0,000308	0,186907	0,797348	

Tabela 09. Tempo 90 minutos, braço não tratado, probabilidades aproximadas para testes *post hoc* Erro: entre MS = 6,1467 df = 45,000.

	Sepigel vazio	Cabopol 0,7% vazio	Sepigel com dilapiol	Carbopol 0,7% com dilapiol	Dilapiol isolado
Sepigel vazio					
Cabopol 0,7% vazio	0,014119				
Sepigel com dilapiol	0,000310	0,603840			
Carbopol 0,7% com dilapiol	0,000195	0,384215	0,996318		
Dilapiol isolado	0,000136	0,084539	0,766829	0,925730	

Os dados analisados pelo t-tukey com relação ao antebraço tratado mostraram que no tempo inicial (0), não houve diferença significativa entre as amostras nanoencapsuladas ($p > 0,05$), exceto entre as amostras de carbopol 0,7% vazio e carbopol 0,7% contendo o dilapiol, sendo $p < 0,05$. O dilapiol puro apresentou diferença significativa quando comparado com as amostras de sepigel e carbopol 0,7% vazias e sepigel com dilapiol, sendo $p < 0,05$ e não apresentou diferença significativa quando comparado com a nanocápsula de carbopol 0,7% contendo dilapiol, sendo $p > 0,05$ (tabela 10).

Aos 30 min do início do teste, os resultados mostraram que o dilapiol puro apresentou diferença significativa quando comparado com todas as amostras nanoestruturadas, sendo $p < 0,05$. O carbopol 0,7% com dilapiol mostrou diferença significativa quando comparado ao sepigel vazio ($p < 0,05$), mas não houve diferença significativa quando comparado com o carbopol 0,7% vazio e ao sepigel com dilapiol - $p > 0,05$ (tabela 11).

Tabela 10. Tempo 0, braço tratado, probabilidades aproximadas para testes *post hoc* Erro: entre MS = 9,9422 df = 45,000.

	Sepigel vazio	Cabopol 0,7% vazio	Sepigel com dilapiol	Carbopol 0,7% com dilapiol	Dilapiol isolado
Sepigel vazio					
Cabopol 0,7% vazio	0,967998				
Sepigel com dilapiol	0,999573	0,913009			
Carbopol 0,7% com dilapiol	0,174022	0,042685	0,256815		
Dilapiol isolado	0,001073	0,000258	0,001938	0,289496	

Tabela 11. Tempo 30, braço tratado, probabilidades aproximadas para testes *post hoc* Erro: entre MS = 5,1244 df = 45,000.

	Sepigel vazio	Cabopol 0,7% vazio	Sepigel com dilapiol	Carbopol 0,7% com dilapiol	Dilapiol isolado
Sepigel vazio					
Cabopol 0,7% vazio	0,932200				
Sepigel com dilapiol	0,987599	0,998329			
Carbopol 0,7% com dilapiol	0,029019	0,173152	0,093857		
Dilapiol isolado	0,000136	0,000196	0,000159	0,047391	

Uma hora após a aplicação das amostras, as nanocápsulas vazias de carbopol 0,7% e sepigel não apresentaram diferença significativa entre si - $p > 0,05$. Enquanto que as nanocápsulas sepigel e carbopol 0,7% contendo dilapiol, e o dilapiol puro diferiram quando comparados ao sepigel vazio - $p < 0,05$. O carbopol 0,7% com dilapiol apresentou diferença significativa quando comparado ao carbopol 0,7% vazio, sendo $p < 0,05$. As amostras de sepigel e carbopol 0,7% contendo o dilapiol, não foram diferentes entre si - $p > 0,05$. O dilapiol puro não apresentou diferença significativa entre as nanocápsulas de sepigel com dilapiol e carbopol 0,7% com dilapiol - $p > 0,05$ (tabela 12).

A última leitura dos testes de repelência mostrou diferença significativa da amostra de sepigel vazio comparada com todas as outras amostras nanoencapsuladas e com o dilapiol puro, sendo $p < 0,05$. Não houve diferença significativa do dilpaiol puro comparado ao carbopol 0,7% contendo dilapiol, $p < 0,05$. O carbopol 0,7% vazio não mostrou diferença significativa quando comparado ao sepigel e carbopol 0,7% contendo dilapiol, sendo $p > 0,05$. As amostras de sepigel e carbopol 0,7% com dilapiol, não apresentaram diferença significativa entre si - $p > 0,05$. O óleo puro do dilapiol apresentou diferença significativa com todas as amostras nanoencapsuladas ($p < 0,05$), exceto com o carbopol 0,7% contendo dilapiol - $p > 0,05$ (tabela 13). Quando comparadas as amostras nanoencapsuladas com o dilapiol puro, a formulação do veiculador carbopol 0,7% mais dilapiol, foi a que melhor representou o potencial de repelência.

Tabela 12. Tempo 60, braço tratado, probabilidades aproximadas para testes *post hoc* Erro: entre MS = 5,1578 df = 45,000.

	Sepigel vazio	Cabopol 0,7% vazio	Sepigel com dilapiol	Carbopol 0,7% com dilapiol	Dilapiol isolado
Sepigel vazio					
Cabopol 0,7% vazio	0,987749				
Sepigel com dilapiol	0,023118	0,076782			
Carbopol 0,7% com dilapiol	0,002622	0,010503	0,932945		
Dilapiol isolado	0,000136	0,000160	0,061235	0,297441	

Tabela 13. Tempo 90, braço tratado, probabilidades aproximadas para testes *post hoc* Erro: entre MS = 2,4867 df = 45,000.

	Sepigel vazio	Cabopol 0,7% vazio	Sepigel com dilapiol	Carbopol 0,7% com dilapiol	Dilapiol isolado
Sepigel vazio					
Cabopol 0,7% vazio	0,000235				
Sepigel com dilapiol	0,000162	0,992983			
Carbopol 0,7% com dilapiol	0,000134	0,530301	0,787593		
Dilapiol isolado	0,000134	0,005378	0,017283	0,226868	

O material nanoestruturado pode ser uma alternativa promissora em estudos sobre eficiência e eficácia de óleos essenciais extraídos de plantas naturais. O óleo dilapiol isolado evidenciou neste trabalho, capacidade de repelência por pelo menos uma hora e meia após a aplicação do composto. Considerando que as observações não se estenderam além de uma hora e meia em função da disponibilidade dos voluntários, ainda assim, pode-se observar que o princípio ativo se mostra eficaz para a proteção individual contra mosquitos adultos transmissores da malária humana na região amazônica.

Os óleos essenciais, em especial aqueles extraídos das piperáceas, estão sendo bastante estudados sob vários aspectos, desde suas propriedades microbianas, de repelência, e até o potencial larvicida e adulticida que estas plantas possuem (Scott *et al.*, 2004; Mehlhorn *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2008).

A revisão realizada por Scott *et al.*, (2008), mostra várias alternativas para o uso desta espécie, com resultados promissores, inclusive sugerindo a substituição de pesticidas por compostos com propriedade inseticida destas plantas, até o efeito

de inibição alimentar que seus princípios ativos exercem sobre os insetos. Isto mostra uma possível resposta do comportamento dos mosquitos quanto ao potencial de repelência do dilapiol, óleo isolado de uma piperácea.

No presente trabalho, tanto em testes com o braço tratado quanto com o braço não tratado com dilapiol puro, observou-se um comportamento de repulsa das fêmeas. Estas se deslocaram para as paredes laterais da gaiola teste, pousando na tela das mesmas. No início do teste, logo após a aplicação do óleo no antebraço, as fêmeas ainda picavam o braço não tratado e apenas voavam sobre o braço tratado, uma pousou, mas logo se distanciou. Após 30 minutos observou-se que o comportamento de repulsa das fêmeas também se estendeu ao braço não tratado. Provavelmente, este comportamento decorreu da volatilidade do óleo, que pode ter também influenciado o braço não tratado.

Este fato foi bem evidente no dilapiol puro e pode estar mais relacionado ao seu odor muito forte, contrastando com o observado nas amostras nanoencapsuladas, cujo odor é mais brando, mesmo assim ressalta-se que o carbopol 0,7% mostrou atividade repelente em todos os tempos observados.

Os estudos realizados por Tawatsin *et al.* (2006), também relataram o efeito de repelência de óleos essenciais extraídos de plantas da Tailândia, contra quatro espécies de culicídeos vetores de doenças. Os mosquitos *Anopheles dirus*, *Culex quinquefasciatus* e *Aedes albopictus* foram mais sensíveis a todos os óleos essenciais testados com repelência de 4,5 até 8 horas, quando comparado ao *A. aegypti* que o período de repelência foi 0,3 até 2,8 horas.

Estudos realizados por Misni *et al.*, (2009), em experimentos no laboratório, com *P. aduncum* mostraram que o óleo essencial bruto, na concentração de 0,4 g apresentou 100% de repelência contra picadas ou pouso de *A. albopictus* no braço tratado (25 cm²) logo após o tratamento com o óleo (0 h). Em 1 h após a aplicação houve 99,4% de repelência, 95,2% após duas horas da aplicação de proteção, e 51,6% até oito horas. Esta diferença de proteção, em relação aos resultados deste trabalho, pode ser explicada sob dois aspectos: 1 – A área do braço muito maior que a efetuada nos trabalhos citados. A OMS preconiza tanto a utilização do antebraço completo (a mesma que foi utilizada neste trabalho) ou de uma área delimitada, isto se deve ao tipo de material que será testado, ou quantidade de material suficiente para realização dos testes; 2 – O dilapiol isolado, de fato, apresentou maior potencial

de repelência quando comparado ao óleo essencial bruto de *P. aduncum*, este potencial contra picadas de mosquitos é observado em 60 min após a aplicação, se estendendo até 90 min que foi o tempo máximo de observação nos testes.

Entretanto, todos os trabalhos relatados acima apresentam a eficácia do óleo essencial de *P. aduncum*. Com base nos dados deste trabalho, o dilapiol isolado é uma alternativa de compostos naturais extraídos de plantas da Amazônia, com potencial de repelência para *Anopheles darlingi*, principal vetor da malária humana na Amazônia.

6.4. Análises da Prova Biológica de Parede

Com o objetivo de aumentar a duração do efeito da mortalidade e assim caracterizar o potencial sinérgico do dilapiol associado aos inseticidas sintéticos, a técnica de nanoencapsulação, realizada com partículas poliméricas biodegradáveis foi utilizada neste trabalho de acordo Kim *et al.* (2009), Stadler *et al.* (2010) e Makadia e Siegel (2011). As concentrações utilizadas nos testes foram as mesmas utilizadas para todos os experimentos de mortalidade, a diferença está no tipo de polímero usado para veicular os compostos: o PLA e o PLGA, como descrito no tópico em materiais e método de preparação das nanocápsulas (ver item 4.5).

Foram realizados três conjuntos de testes: No Experimento 1 foram utilizadas as placas lixadas e não pintadas, com duas leituras de mortalidades 24 h (1 dia) e 72 h (3 dias) após a borrifação das amostras, neste bloco foram utilizados 990 mosquitos sendo 495 para cada leitura; o Experimento 2 foi constituído de placas lixadas e pintadas, com seis leituras de mortalidade 1, 3, 5, 7, 17 e 21 dias, neste foram utilizados 2.970 mosquitos; e no Experimento 3 foram utilizadas as placas lixadas e não pintadas, com sete leituras de mortalidade 1, 3, 5, 6, 7, 10 e 12 dias e utilizamos 3.465 mosquitos. Considerando todos os testes da prova biológica de parede foram utilizadas 7.425 fêmeas de *A. darlingi* coletadas em campo, pelo método de atração humana com proteção.

6.4.1. Experimento 1

As nanocápsulas enviadas, no primeiro lote, para a realização da prova biológica de parede foram produzidas com o polímero PLGA. As mortalidades foram avaliadas no primeiro e no terceiro dia após a impregnação das placas com as substâncias, conforme mostra a figura 17. Os resultados apresentados indicam que

a mortalidade foi alta em 24 horas após a borrifação das amostras, sendo consideravelmente menor em 72 horas, sendo este padrão mais pronunciado nos resultados com a amostra nanoencapsulada de cipermetrina, em que se observou mortalidade de 73% em 24 horas e de apenas 7% em 72 horas.

As nanocápsulas das três associações que representam o potencial sinérgico (delta+dil, ciper+dil e alfa+dil), da mesma forma descrita acima, demonstraram eficácia somente na primeira leitura, ressaltando a associação alfa+dil que apresentou 22% de mortalidade em 24 horas e nenhuma mortalidade em 72 horas. Em contrapartida, o controle positivo se manteve eficaz nas duas leituras do teste: a cipermetrina comercial com 42% e 51%, alfacipermetrina com 82% nas duas leituras e a deltametrina que manteve 100% de mortalidade também nas duas leituras.

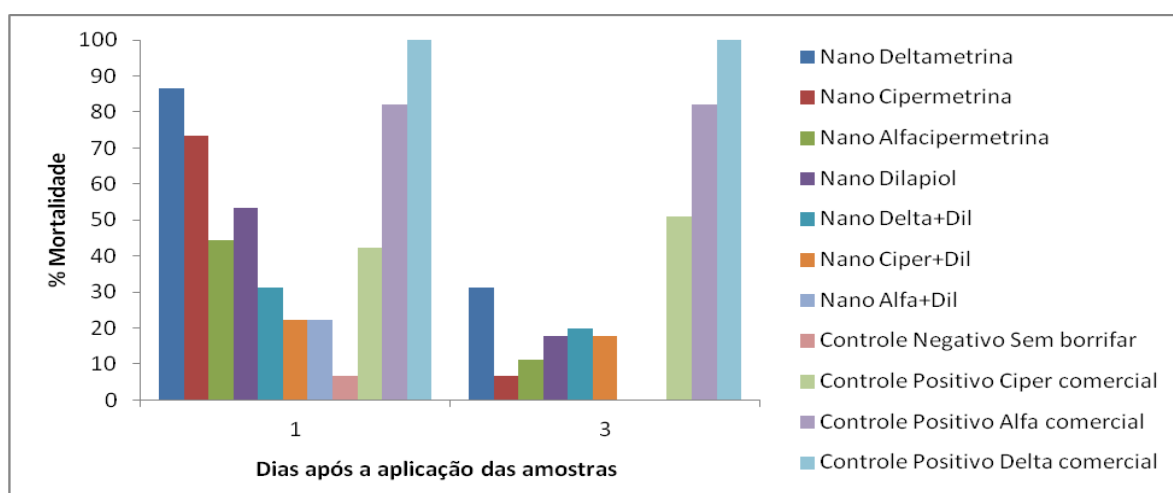


Figura 17. Percentual de mortalidade (24 h) e 72 (h) após a impregnação das amostras nas placas de madeira.

Os resultados analisados por ANOVA (tabela 14) mostraram diferença estaticamente significativa entre a mortalidade provocada pelas substâncias e os intervalos após a aplicação inicial, ou seja, da mesma forma que nos resultados obtidos nos testes de repelência com o braço tratado, a eficiência da substância depende do tempo.

Tabela 14. Resultados da análise de variância com fatores independentes, primeiro experimento da prova de parede.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F	Valor Crítico	Probabilidade
Substância	1178,48	10	117,84	29,83	2,0772	p < 0,05
Tempo	157,64	1	157,64	39,90	4,0847	p < 0,05
Interação	202,36	10	20,236	5,12	2,0772	p < 0,05
Total	1712,48	65	26,34			

Os resultados (t-tukey) avaliados 24 h após a impregnação indicaram que das sete amostras nanoencapsuladas, a deltametrina mostrou diferença significativa quando comparada com as demais amostras com associação ($p < 0,05$), de acordo com a tabela 15. A deltametrina e a cipermetrina nanoencapsuladas não apresentaram diferença significativa quando comparadas com as amostras comerciais (controle positivo) $p > 0,05$, da mesma forma que a cipermetrina nanoestruturada não apresentou diferença significativa quando comparada com a amostra nanoencapsulada associada delta+dil, sendo $p > 0,05$.

A alfacipermetrina nanoestruturada não apresentou diferença significativa quando comparada com as amostras comerciais de alfacipermetrina e cipermetrina ($p > 0,05$), mas quando comparada com deltametrina comercial observa-se diferença significativa $-p < 0,05$. A alfacipermetrina nanoencapsulada não apresentou diferença significativa quando comparada com as amostras nanoestruturadas - $p > 0,05$, exceto quando comparada à deltametrina comercial.

O dilapiol nanoencapsulado não apresentou diferença significativa com as amostras nanoencapsuladas, tampouco com as amostras comerciais - $p > 0,05$. A alfacipermetrina e a deltametrina comerciais apresentaram diferenças significativas quando comparadas com todas as amostras nanoestruturadas associadas delta+dil, alfa+dil e ciper+dil, sendo $p < 0,05$.

Os resultados observados três dias após a borrifação das amostras mostraram que dentre as nanoencapsuladas, somente a deltametrina não apresentou diferença significativa quando comparadas entre si ($p > 0,05$), exceto com a nanoestruturada associada de delta+dil que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), conforme descrita na tabela 16.

A deltametrina nanoencapsulada quando comparada aos inseticidas

comerciais alfacipermetrina e a deltametrina, apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), exceto com a cipermetrina comercial, sendo $p > 0,05$. As nanocápsulas de cipermetrina, alfacipermetrina, dilapiol e as associadas delta+dil, ciper+dil e alfa+dil foram todas significativamente diferentes quando comparadas com as amostras comerciais, sendo $p < 0,05$. Em relação às amostras comerciais, a cipermetrina também apresentou diferença significativa quando comparada com a alfacipermetrina e deltametrina - $p < 0,05$.

Tabela 15. Teste Tukey da variável - 1 dia, probabilidades aproximadas para testes *post hoc* Erro: entre MS =5,8182, df = 22,000.

	Deltamet	Cipermet	Alfaciper	Dilapiol	Delta+Dil	Ciper+dil	Alfa+Dil	Sem borrifar	Ciper Comerc.	Alfa Comerc.	Delta Comerc
Deltametrina											
Cipermetrina	0,992697										
Alfacipermetrina	0,103482	0,526983									
Dilapiol	0,335679	0,896546	0,999744								
Delta+Dil	0,012033	0,103482	0,992697	0,824119							
Ciper+dil	0,002665	0,025387	0,824119	0,426370	0,999744						
Alfa+Dil	0,002665	0,025387	0,824119	0,426370	0,999744	1,000000					
Sem borrifar	0,000336	0,001852	0,193653	0,052262	0,733596	0,977851	0,977851				
Ciper Comerc.	0,073968	0,426370	1,000000	0,998292	0,998292	0,896546	0,896546	0,257710			
Alfa Comerc.	1,000000	0,999744	0,193653	0,526983	0,025387	0,005646	0,005646	0,000518	0,142702		
Delta Comerc.	0,992697	0,631821	0,012033	0,052262	0,001302	0,000409	0,000409	0,000210	0,008240	0,947429	

Tabela 16. Teste Tukey da variável - 3 dias, probabilidades aproximadas para testes *post hoc* Erro: entre MS =2,0909, df = 22,000.

	Deltamet	Cipermet	Alfaciper	Dilapiol	Delta+Dil	Ciper+dil	Alfa+Dil	Sem borrifar	Ciper Comerc.	Alfa Comerc.	Delta Comerc.
Deltametrina											
Cipermetrina	0,127776										
Alfacipermetrina	0,334577	0,999950									
Dilapiol	0,823402	0,932548	0,998272								
Delta+Dil	0,932548	0,823402	0,984124	1,000000							
Ciper+dil	0,823402	0,932548	0,998272	1,000000	1,000000						
Alfa+Dil	0,022282	0,998272	0,932548	0,491530	0,334577	0,491530					
Sem borrifar	0,022282	0,998272	0,932548	0,491530	0,334577	0,491530	1,000000				
Ciper Comerc.	0,334577	0,000615	0,001834	0,011935	0,022282	0,011935	0,000249	0,000249			
Alfa Comerc.	0,000249	0,000201	0,000201	0,000202	0,000202	0,000202	0,000201	0,000201	0,022282		
Delta Comerc.	0,000201	0,000201	0,000201	0,000201	0,000201	0,000201	0,000201	0,000201	0,000301	0,491530	

6.4.2. Experimento 2

Os testes realizados nesta fase foram avaliados com as amostras nanoencapsuladas com o polímero PLA impregnadas em placas lixadas e pintadas. Os dados mostram que até o sétimo dia após a borrifação, as amostras nanoencapsuladas apresentavam um percentual de mortalidade baixo variando entre 0% e 24%. Observa-se que as amostras do controle positivo foram eficazes em todo o período de avaliação entre 42% a 100% de mortalidade (figura 18).

Após o sétimo dia da borrifação das amostras, a mortalidade era baixa ou ausente, sugerindo relação com o tipo de polímero (PLA), e/ou as nanocápsulas, não estariam aderindo-se totalmente às placas pintadas. Assim, para esta fase os resultados observados foram apresentados de forma descritiva, não sendo possível a análise estatística.

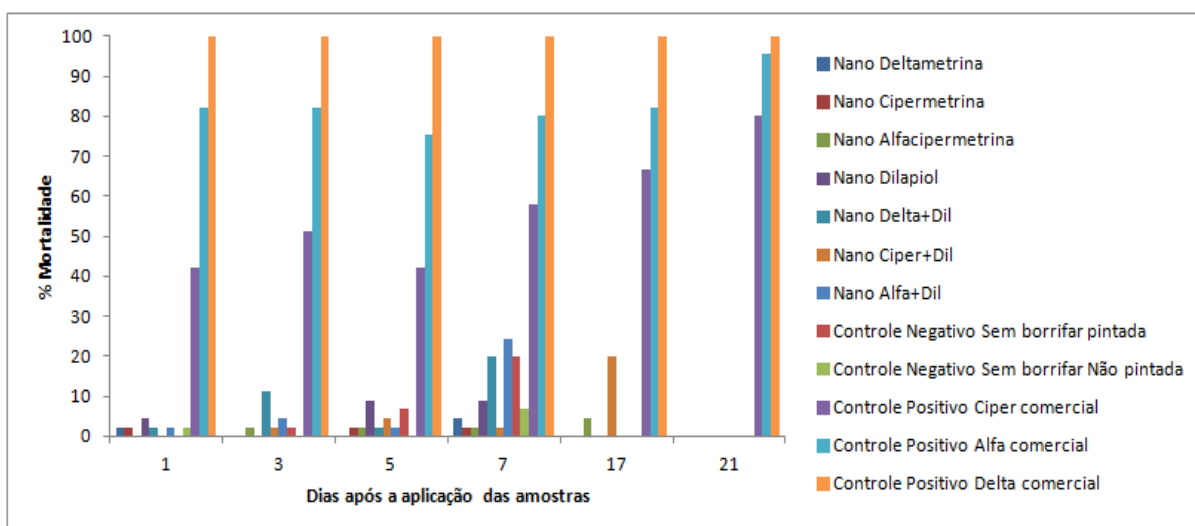


Figura 18. Nanocápsulas de PLA contendo as amostras avaliadas por 21 dias após a borrifação.

6.4.3. Experimento 3

Neste último experimento (placas utilizadas somente lixadas, não pintadas e amostras nanoencapsuladas com o polímero PLGA), apesar de serem os mesmos parâmetros do experimento 1, adotou-se considerar em análise como um experimento distinto, haja vista resultados muito discrepantes para uma performance esperada com este polímero em uma análise duplo cego.

As leituras com este experimento foram realizadas durante 12 dias após a impregnação nas placas (figura 19). A primeira avaliação 24 horas após a borrifação

mostrou que as nanocápsulas apresentaram mortalidade entre 2% a 22%, considerado relativamente baixo em relação à mortalidade dos inseticidas comerciais não nanoencapsulados (controle positivo), onde ocorreram mortalidades entre 42% e 100%.

A análise de variância mostrou ser significativa que as mortalidades provocadas pelas distintas amostras diferem entre si, e que a eficiência da substância é influenciada pelo tempo, pois também este parâmetro foi significativamente diferente (tabela 17).



Figura 19. Percentual de mortalidade avaliado durante 12 dias após a aplicação das amostras nanoestruturadas.

Tabela 17. Resultados da análise de variância com fatores independentes, terceiro experimento da prova de parede.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F	Valor Crítico	Probabilidade
Substância	3211427	10	321142,7	82,24377	1,8308	p < 0,05
Tempo	1558598	6	259766,3	66,52545	2,0987	p < 0,05
Interação	469118	60	7818,633	2,002331	1,3182	p < 0,05
Total	5840477	230	25393,38			

Os resultados pós ANOVA do t-tukey (tabela 18) no primeiro dia após a aplicação, mostraram que as nanoencápsulas de cipermetrina, alfacipermetrina, ciper+dil e alfa+dil não diferiram da cipermetrina comercial, indicando que a resposta da mortalidade destas amostras foi igual quando comparada a este inseticida

químico - $p > 0,05$. Considerando o tempo de leitura, não foram verificadas diferenças significativas entre as amostras nanoencapsuladas, sendo $p > 0,05$.

No terceiro dia de avaliação das placas borrifadas, as amostras nanoencapsuladas não apresentaram diferenças significativas em relação à cipermetrina comercial ($p > 0,05$), exceto a nanocápsula alfa+dil, que apresentou a mortalidade de apenas 7% evidenciando uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos controles positivos (produtos comerciais), os quais apresentaram mortalidade de 51%, 82% e 100%, para cipermetrina, alfacipermetrina e deltametrina, respectivamente. Os controles positivos cipermetrina e alfacipermetrina não registraram uma diferença significativa em relação à alfacipermetrina nanoencapsulada - $p > 0,05$ (tabela 19 e figura 19).

Os resultados do quinto dia mostraram que entre as amostras nanoencapsuladas, o dilapiol apresentou diferença em relação à deltametrina, cipermetrina e entre as nanocápsulas associadas de delta+dil, ciper+dil e alfa+dil, sendo $p < 0,05$. Nesta avaliação, a nanocápsula de dilapiol não causou mortalidade. Já com as nanocápsulas de deltametrina e cipermetrina obteve-se 44% e 36% de mortalidade, assim como nas nanocápsulas associadas de delta+dil, ciper+dil e alfa+dil observou-se mortalidade de 64%, 56% e 53%, respectivamente, indicando efetividade no sinergismo (tabela 20 e figura 19).

Tabela 18. Teste Tukey da variável - 1 dia, probabilidades aproximadas para testes *post hoc* Erro: entre MS = 2,2424, df = 22,000.

	Delta	Ciper	Alfa	Dilapiol	Delta+Dil	Ciper+dil	Alfa+Dil	Sem borrifar	Ciper Comerc.	Alfa Comerc.	Delta Comerc.
Deltametrina											
Cipermetrina	0,987629										
Alfacipermetrina	0,987629	1,000000									
Dilapiol	0,999964	0,850680	0,850680								
Delta+Dil	0,999964	0,999964	0,999964	0,987629							
Ciper+dil	0,987629	1,000000	1,000000	0,850680	0,999964						
Alfa+Dil	0,706346	0,998711	0,998711	0,379826	0,945241	0,998711					
Sem borrifar	0,998711	0,706346	0,706346	1,000000	0,945241	0,706346	0,250146				
Ciper Comerc.	0,008983	0,092800	0,092800	0,002671	0,029936	0,092800	0,379826	0,001493			
Alfa Comerc.	0,000201	0,000202	0,000202	0,000201	0,000201	0,000202	0,000206	0,000201	0,002671		
Delta Comerc.	0,000201	0,000201	0,000201	0,000201	0,000201	0,000201	0,000201	0,000201	0,000211	0,538828	

Tabela 19. Teste Tukey da variável - 3 dias, probabilidades aproximadas para testes *post hoc* Erro: entre MS = 3,9697, df = 22,000.

	Deltamet	Cipermet	Alfaciper	Dilapiol	Delta+Dil	Ciper+dil	Alfa+Dil	Sem borrifar	Cipermet Comercial	Alfaciper Comercial	Deltamet Comercial
Deltametrina											
Cipermetrina	0,998688										
Alfacipermetrina	0,992197	1,000000									
Dilapiol	1,000000	0,998688	0,992197								
Delta+Dil	0,743692	0,276759	0,196593	0,743692							
Ciper+dil	0,971572	0,620671	0,494370	0,971572	0,999892						
Alfa+Dil	0,377038	0,091542	0,060530	0,377038	0,999892	0,971572					
Sem borrifar	0,196593	0,039424	0,025367	0,196593	0,992197	0,849122	0,999997				
Ciper Comerc.	0,849122	0,998688	0,999892	0,849122	0,060530	0,196593	0,016174	0,006483			
Alfa Comerc.	0,006483	0,039424	0,060530	0,006483	0,000271	0,000532	0,000215	0,000206	0,196593		
Delta Comerc.	0,000319	0,001109	0,001685	0,000319	0,000202	0,000206	0,000201	0,000201	0,006483	0,849122	

Tabela 20. Teste Tukey da variável - 5 dias, probabilidades aproximadas para testes *post hoc* Erro: entre MS = 2,6364, df = 22,000.

	Deltamet	Cipermet	Alfaciper	Dilapiol	Delta+Dil	Ciper+dil	Alfa+Dil	Sem borrifar	Ciper Comerc.	Alfa Comerc.	Delta Comerc.
Deltametrina											
Cipermetrina	0,993211										
Alfacipermetrina	0,643886	0,993211									
Dilapiol	0,002057	0,019098	0,150632								
Delta+Dil	0,488975	0,093326	0,010927	0,000207							
Ciper+dil	0,967082	0,488975	0,093326	0,000284	0,993211						
Alfa+Dil	0,993211	0,643886	0,150632	0,000358	0,967082	1,000000					
Sem borrifar	0,002057	0,019098	0,150632	1,000000	0,000207	0,000284	0,000358				
Ciper Comerc.	1,000000	0,999347	0,789848	0,003556	0,348023	0,901820	0,967082	0,003556			
Alfa Comerc.	0,056112	0,006228	0,000750	0,000201	0,967082	0,488975	0,348023	0,000201	0,033001		
Delta Comerc.	0,000284	0,000207	0,000202	0,000201	0,019098	0,002057	0,001218	0,000201	0,000244	0,234306	

Os dados do 6º dia representam a eficácia das amostras nanoestruturadas em relação aos controles positivos. Dentre as amostras nanoencapsuladas, a associação alfa+dil foi a única que apresentou diferença significativa em relação às demais amostras nanoencapsuladas, com apenas 38% de mortalidade, sendo $p < 0,05$. O controle positivo - cipermetrina comercial apresentou diferença significativa, quando comparada com as amostras nanoencapsuladas de dilapiol e delta+dil, sendo $p < 0,05$. A mortalidade da cipermetrina comercial foi 58%, enquanto que a mortalidade de dilapiol e delta+dil foi 82% cada. Considerando ainda esta avaliação, as amostras de alfacipermetrina e deltametrina comerciais também apresentaram diferenças significativas quando comparadas com a amostra nanoencapsulada associada alfa+dil, sendo $p < 0,05$. Estas amostras comerciais apresentaram 80 e 100% de mortalidade sobre a amostra nanoencapsulada com apenas 38% (tabela 21).

Os testes realizados no 7º dia mostraram que entre as nanocápsulas, o dilapiol e a associação delta+dil apresentaram diferenças significativas quando comparadas com a nanocápsula de deltametrina - $p < 0,05$, onde o dilapiol apresenta 24% de mortalidade e a associação de delta+dil 31%, enquanto a nanocápsula de deltametrina apresenta 58%. A cipermetrina comercial, com mortalidade de 67%, não apresentou diferença significativa quando comparada com as amostras nanoencapsuladas de deltametrina (58%) e cipermetrina (47%), sendo $p > 0,05$, mas apresentou diferença em relação às amostras nanoencapsuladas de alfacipermetrina com mortalidade de 40%, dilapiol (24%), delta+dil (31%), ciper+dil (33%) e alfa+dil (38%) confirmada - $p < 0,05$ (tabela 22).

Tabela 21. Teste Tukey da variável - 6 dias, probabilidades aproximadas para testes *post hoc* Erro: entre MS = 2,0303, df = 22,000.

	Deltamet	Cipermet	Alfaciper	Dilapiol	Delta+Dil	Ciper+dil	Alfa+Dil	Sem borrifar	Ciper Comerc.	Alfa Comerc.	Delta Comerc.
Deltametrina											
Cipermetrina	1,000000										
Alfacipermetrina	0,998044	0,999943									
Dilapiol	0,926535	0,982390	0,999943								
Delta+Dil	0,926535	0,982390	0,999943	1,000000							
Ciper+dil	1,000000	1,000000	0,999943	0,982390	0,982390						
Alfa+Dil	0,002893	0,001564	0,000537	0,000280	0,000280	0,001564					
Sem borrifar	0,000201	0,000201	0,000201	0,000201	0,000201	0,000201	0,005464				
Ciper Comerc.	0,471556	0,316136	0,117086	0,036481	0,036481	0,316136	0,316136	0,000209			
Alfa Comerc.	0,999943	1,000000	1,000000	0,998044	0,998044	1,000000	0,000884	0,000201	0,197792		
Delta Comerc.	0,117086	0,197792	0,471556	0,810963	0,810963	0,197792	0,000202	0,000201	0,000884	0,316136	

Tabela 22. Teste Tukey da variável - 7 dias, probabilidades aproximadas para testes *post hoc* Erro: entre MS = 1,6061, df = 22,000.

	Deltamet	Cipermet	Alfaciper	Dilapiol	Delta+Dil	Ciper+dil	Alfa+Dil	Sem borrifar	Ciper Comerc.	Alfa Comerc.	Delta Comerc.
Deltametrina											
Cipermetrina	0,861699										
Alfacipermetrina	0,316860	0,995003									
Dilapiol	0,003148	0,102357	0,493735								
Delta+Dil	0,026930	0,493735	0,961407	0,995003							
Ciper+dil	0,053445	0,691755	0,995003	0,961407	1,000000						
Alfa+Dil	0,186326	0,961407	1,000000	0,691755	0,995003	0,999835					
Sem borrifar	0,000202	0,000225	0,000485	0,053445	0,006452	0,003148	0,000833				
Ciper Comerc.	0,961407	0,186326	0,026930	0,000327	0,001574	0,003148	0,013254	0,000201			
Alfa Comerc.	0,053445	0,001574	0,000327	0,000202	0,000205	0,000211	0,000256	0,000201	0,493735		
Delta Comerc.	0,000327	0,000203	0,000201	0,000201	0,000201	0,000201	0,000201	0,000201	0,003148	0,316860	

O 10º dia de avaliação apresentou uma diferença significativa entre as amostras nanoestruturadas (tabela 23). A mortalidade das amostras associadas delta+dil com 93%, ciper+dil (82%) e alfa+dil (78%), mostraram diferenças significativas quando comparadas com a mortalidade de deltametrina (36%), cipermetrina (33%) e dilapiol (27%) nanoencapsulados, sendo $p < 0,05$. Os resultados da mortalidade da amostra nanoencapsulada associada de alfa+dil não apresentaram diferenças significativas quando comparada com a mortalidade das nanocápsulas de alfacipermetrina (42%), delta+dil (93%) e ciper+dil (82%) - $p > 0,05$. As mortalidades entre as formulações nanoestruturadas associadas delta+dil, ciper+dil e alfa+dil não apresentaram diferenças significativas da quando comparadas com as amostras comerciais de cipermetrina (80%), alfacipermetrina (96%) e deltametrina (100%), sendo $p > 0,05$.

A avaliação após o 12º dia de borrifação dentre as amostras nanoencapsuladas, apenas a alfacipermetrina, com a mortalidade de 33%, e a associação alfa+dil com 29%, apresentaram diferenças significativas em relação à nanocápsula de deltametrina 69%, sendo $p < 0,05$, as demais amostras nanoestruturadas não foram significativas entre elas - $p > 0,05$. A cipermetrina comercial com mortalidade de 98% apresentou diferença significativa comparada com todas as amostras nanoestruturadas ($p < 0,05$) exceto com a deltametrina nanoencapsulada - $p > 0,05$. A alfacipermetrina comercial com mortalidade de 82% não obteve diferença significativa relacionada com as nanocápsulas de deltametrina com mortalidade de 69%, cipermetrina 53% e delta+dil 51%, sendo $p > 0,05$. A deltametrina comercial com 100% de mortalidade obteve diferença significativa com todas as nanocápsulas ($p < 0,05$), exceto com a nanocápsula de deltametrina - $p > 0,05$ (tabela 24).

Tabela 23. Teste Tukey da variável - 10 dias, probabilidades aproximadas para testes *post hoc* Erro: entre MS = 3,3636, df = 22,000.

	Deltamet	Cipermet	Alfaciper	Dilapiol	Delta+Dil	Ciper+dil	Alfa+Dil	Sem borrifar	Ciper Comerc.	Alfa Comerc.	Delta Comerc.
Deltametrina											
Cipermetrina	1,000000										
Alfacipermetrina	0,999773	0,997392									
Dilapiol	0,997392	0,999773	0,883315								
Delta+Dil	0,000493	0,000368	0,001694	0,000231							
Ciper+dil	0,004467	0,002731	0,019788	0,000707	0,985681						
Alfa+Dil	0,012084	0,007345	0,051475	0,001694	0,883315	0,999995					
Sem borrifar	0,081177	0,125212	0,019788	0,382544	0,000201	0,000202	0,000204				
Ciper Comerc.	0,007345	0,004467	0,032116	0,001077	0,951667	1,000000	1,000000	0,000203			
Alfa Comerc.	0,000368	0,000296	0,001077	0,000217	1,000000	0,951667	0,778790	0,000201	0,883315		
Delta Comerc.	0,000254	0,000231	0,000493	0,000206	0,999773	0,778790	0,511285	0,000201	0,648862	0,999995	

Tabela 24. Teste Tukey da variável - 12 dias, probabilidades aproximadas para testes *post hoc* Erro: entre MS = 3,3030, df = 22,000.

	Deltamet	Cipermet	Alfaciper	Dilapiol	Delta+Dil	Ciper+dil	Alfa+Dil	Sem borrifar	Ciper Comerc.	Alfa Comerc.	Delta Comerc.
Deltametrina											
Cipermetrina	0,877658										
Alfacipermetrina	0,048090	0,637590									
Dilapiol	0,179555	0,948889	0,999754								
Delta+Dil	0,769964	1,000000	0,769964	0,984726							
Ciper+dil	0,118620	0,877658	0,999994	1,000000	0,948889						
Alfa+Dil	0,018259	0,370594	0,999994	0,984726	0,498964	0,997195					
Sem borrifar	0,000226	0,001534	0,118620	0,029809	0,002478	0,048090	0,262971				
Ciper Comerc.	0,179555	0,006707	0,000247	0,000457	0,004064	0,000346	0,000215	0,000201			
Alfa Comerc.	0,948889	0,179555	0,002478	0,011083	0,118620	0,006707	0,000981	0,000202	0,877658		
Delta Comerc.	0,118620	0,004064	0,000226	0,000346	0,002478	0,000283	0,000209	0,000201	1,000000	0,769964	

Após a descrição dos resultados referentes à prova biológica de parede no terceiro experimento, verificou-se que o 6º dia após a impregnação das placas com o material nanoencapsulado, representou o melhor momento de liberação do composto. Todos os dados dessa prova biológica indicam a efetividade das amostras nanoencapsuladas em relação às comerciais e confirma o potencial sinérgico, quando se avalia as nanocápsulas associadas. Entretanto, o 7º dia foi o intervalo de tempo que melhor exibiu este potencial, representado pelas nanocápsulas associadas de delta+dil, alfa+dil e ciper+dil.

Múltiplos parâmetros são considerados quando se analisa a efetividade dos procedimentos para a borrifação intradomiciliar. Há interferência desde o treinamento dos agentes até os procedimentos que são realizados no intradomicílio. O primeiro ponto que pode ser considerado refere-se à distribuição correta da concentração do inseticida químico, ao longo da área borrifada. Dentre outros fatores, podemos também citar os procedimentos corretos de manutenção de equipamentos utilizados na borrifação: uso dos bicos dosadores calibrados, aceitação dos moradores das áreas endêmicas, entre outros e, finalmente, financiamentos adequados para o êxito do programa (WHO, 1997).

Outro aspecto importante no Programa de Controle da Malária trata-se das substâncias que apresentam efeito sinérgico associados aos inseticidas químicos. Os estudos sobre o modo de atuação destas substâncias estão sendo realizados continuamente com vários tipos de insetos, com o intuito de otimizar o uso dos produtos químicos, minimizando o fenômeno de detoxificação – resistência, que acontece quando há intensa aplicação dos inseticidas sintéticos nas ações de controle de insetos (Samson *et al.*, 1990; Dagnish *et al.*, 1995; Lorini e Galley, 2000).

Estudos sobre os níveis da interação de alfacipermetrina e dilapiol sobre a mortalidade de adultos de *A. albipictus* foram realizados por Gomes *et al.* (2010), na Amazônia. Os autores relataram que a alfacipermetrina associada com o dilapiol nas proporções 0,155:10 µg e 0,155:5µg, respectivamente, resultaram na mortalidade total de adultos de *A. albipictus*. Relataram também que o dilapiol isolado mostra-se bastante eficaz contra adultos de *A. albipictus*, obtendo-se índices de mortalidade entre 73% a 100%. Os dados destes experimentos, realizados no Laboratório de Malária e Dengue do INPA, foram os indicativos sugerindo a ocorrência de sinergismo quando associam-se dilapiol e piretróides.

Ocorrência de Sinergismo foi também relatado por Darriet e Chandre (2011), em experimento combinando o butóxido de piperonila, um dos sinergistas sintéticos mais utilizados na associação com inseticidas, com a deltametrina e o neonicotinóide dinotefuran, contra mosquitos resistentes da espécie *A. gambiae*, principal vetor da malária humana na África. A avaliação desses inseticidas foi realizada com mosquiteiros impregnados, configurando o mesmo modelo da prova biológica de parede realizada no presente trabalho - *cone chambers* modelo (VBC/81.5) em 30 minutos de exposição. A deltametrina em associação com o butóxido de piperonila apresentou 58,2% de mortalidade, enquanto que neste trabalho a combinação de deltametrina com o dilapiol mostrou 82% de mortalidade, no 6º dia após a borrifação das placas.

Considerando os Programas de Controle da Malária, os dados deste trabalho mostram uma relação direta com os procedimentos da borrifação intradomiciliar, que podem contribuir para o aumento da residualidade dos inseticidas. Os resultados do terceiro experimento indicaram, claramente, que os compostos nanoestruturados podem ser uma alternativa no aumento da manutenção da residualidade do inseticida. Ou seja, havendo um tempo maior de ação residual do inseticida, significa menor necessidade de reaplicações em campo, refletindo em economia de inseticidas e recursos financeiros do Programa.

Os resultados do presente trabalho corroboram estudos anteriores na literatura que mostram também o potencial de espécies de Piperaceae como fontes de inseticidas naturais (Bernard, 1995). Gomes *et al.* (2002), mostraram que espécies da família Piperaceae apresentam atividade larvicida contra *A. aegypti*, indicando ser uma alternativa para o controle das formas imaturas, em nível domiciliar. Desta forma, o sinergismo pode ser considerado uma estratégia para diminuir a aplicação de inseticidas químicos nocivos ambientalmente, e para a saúde humana, tornando-se uma atividade ecologicamente correta.

6.5. Testes de borrifação direta do produto nanoestruturado sobre os mosquitos - Contato Tópico: Visualização por Microscópio Eletrônico de Varredura – MEV

Os inseticidas podem ser aplicados diretamente na população de mosquitos vetores de doenças que se pretende controlar. A aplicação tópica é um método que vem sendo usado nos Programas de Controle da Dengue, quando se utiliza

pulverizadores de Ultra Baixo Volume – UBV. No Programa de Malária, a aplicação tópica acontece quando são utilizados os termonebulizadores que veiculam o inseticida sobre os mosquitos, por meio de gotículas de óleo formadas na combustão realizada pelo equipamento. Neste trabalho, utilizou-se aplicação tópica de forma experimental no laboratório, para se avaliar o efeito das nanocápsulas em contato direto com os mosquitos.

A amostra nanoencapsulada utilizada para borrifação nos mosquitos foi a PLA, a mesma utilizada no experimento 2 da prova biológica de parede. Apesar do PLA não apresentar mortalidade significativa, optou-se por sua utilização para esclarecer se mesmo assim havia algum efeito em nível tópico, que não necessariamente estivesse resultando na morte do mosquito.

Após a aplicação das nanopartículas sobre os mosquitos, estes foram analisados ao MEV, visando observar a aderência das nanocápsulas, nas diferentes regiões do corpo do mosquito. O tegumento foi rastreado e a maior parte das nanopartículas foi encontrada aderida às nervuras das escamas das asas do mosquito, conforme mostram as figuras 20 e 21.

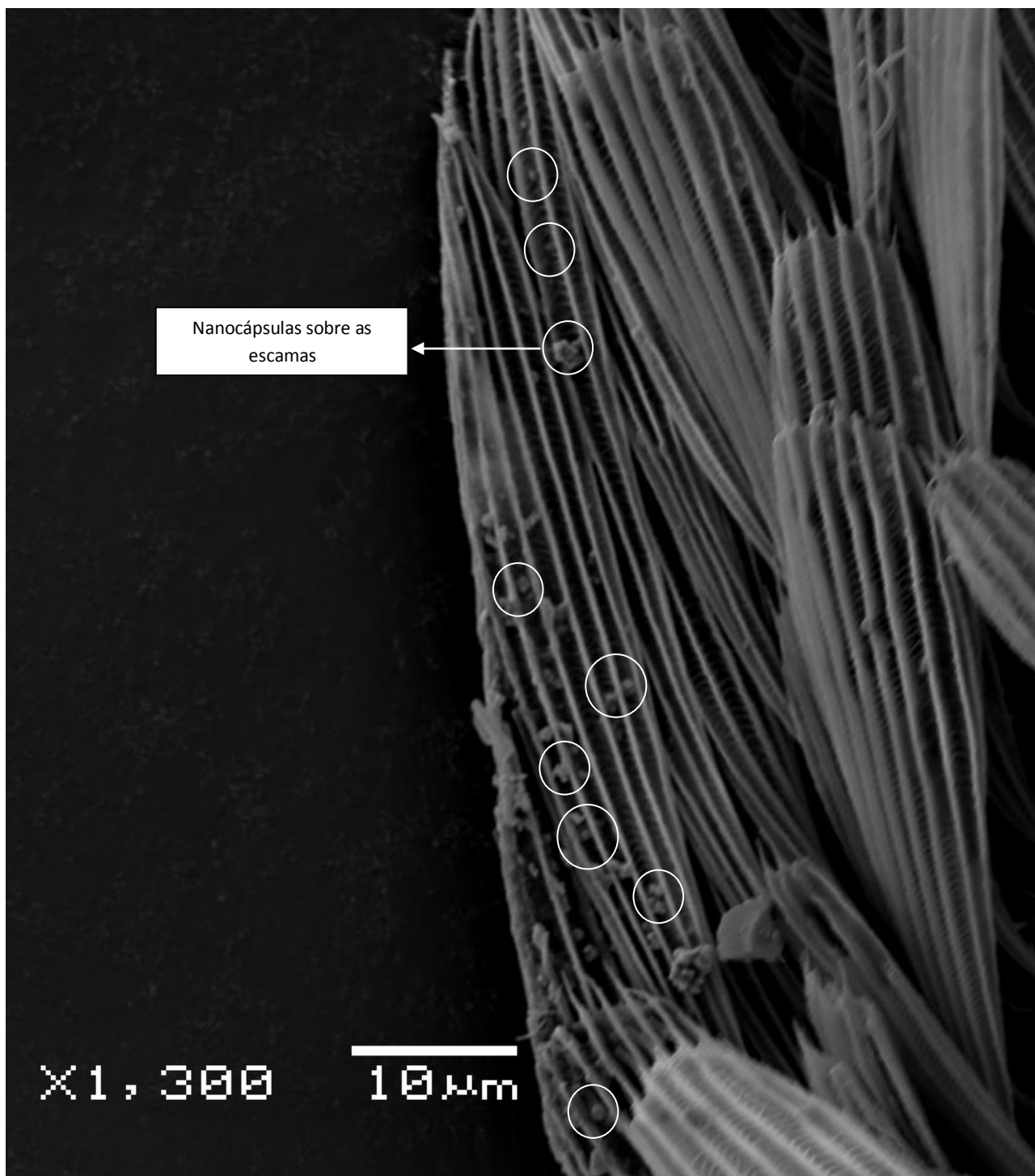


Figura 20. Micrografia do mosquito (escamas) após o tratamento com compostos nanoencapsulados no aumento de 1.300x.

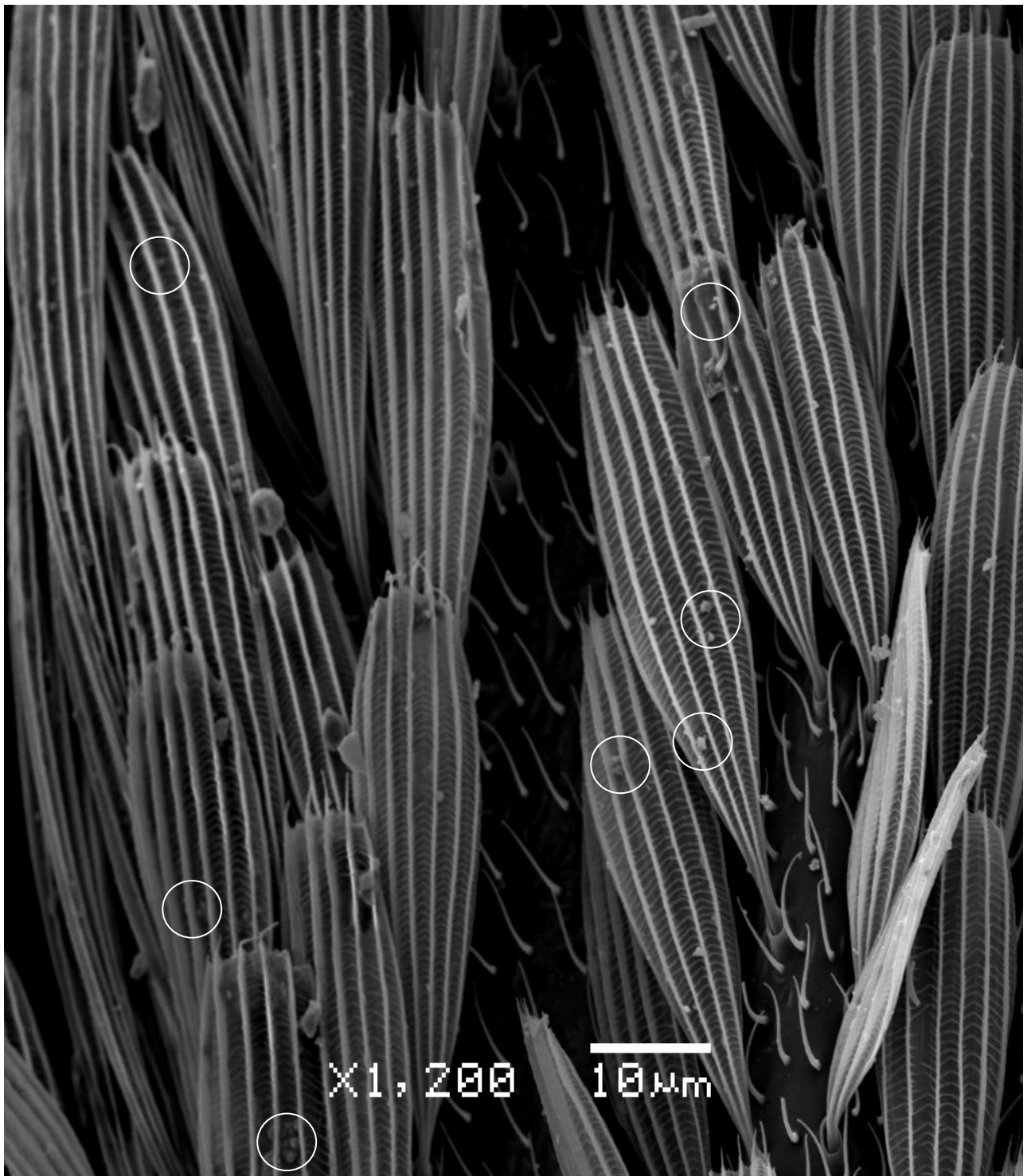


Figura 21. Micrografia do mosquito (escamas) após o tratamento com compostos nanoencapsulados com o aumento de 1.200x.

A mortalidade do contato tópico registrada consta na figura 30. Logo após a aplicação direta no mosquito, as amostras nanoestruturadas de deltametrina e cipermetrina apresentaram 90% e 70% de mortalidade, respectivamente e as amostras nanoencapsuladas associadas delta+dil (13%), ciper+dil (13%) e alfa+dil

(10%). A análise de variância aplicada neste experimento mostrou que a mortalidade provocada pelas substâncias testadas foi significativamente diferente, bem como a mortalidade nos diversos tempos testados. Portanto, os dados corroboram que a eficiência da substância depende do tempo (tabela 25).

Os dados obtidos pela análise t-tukey demonstram que não houve diferença significativa entre as nanocápsulas de cipermetrina e deltametrina - $p > 0,05$. As amostras nanoencapsuladas de alfacipermetrina, dilapiol, delta+dil, ciper+dil, alfa+dil, apresentaram diferenças significativas em relação à cipermetrina e deltametrina ($p < 0,05$), mas não apresentaram entre cada uma destas cinco amostras nanoencapsuladas - $p > 0,05$ (tabela 26).

Duas horas após a borrifação direta, os resultados mostraram que a nanocápsula de alfacipermetrina causou 90% de mortalidade e as amostras associadas (delta+dil 87%; ciper+dil 87% e alfa+dil de 90%), representando diferenças significativas quando comparadas com a nanocápsula de deltametrina (10%) e a cipermetrina (30%) - $p < 0,05$. A maioria dos mosquitos morreu em até duas horas após a borrifação direta. Nesta leitura, não houve diferença significativa entre o dilapiol nanoencapsulado com as demais amostras testadas - $p > 0,05$. As amostras nanoencapsuladas associadas também não apresentaram diferença significativa na mortalidade quando comparadas entre si e com a alfacipermetrina nanoencapsulada, sendo $p > 0,05$ (tabela 27). Como 90% dos insetos morreram nas duas primeiras horas do experimento (figura 22), as leituras subsequentes foram desconsideradas na análise - $p > 0,05$.

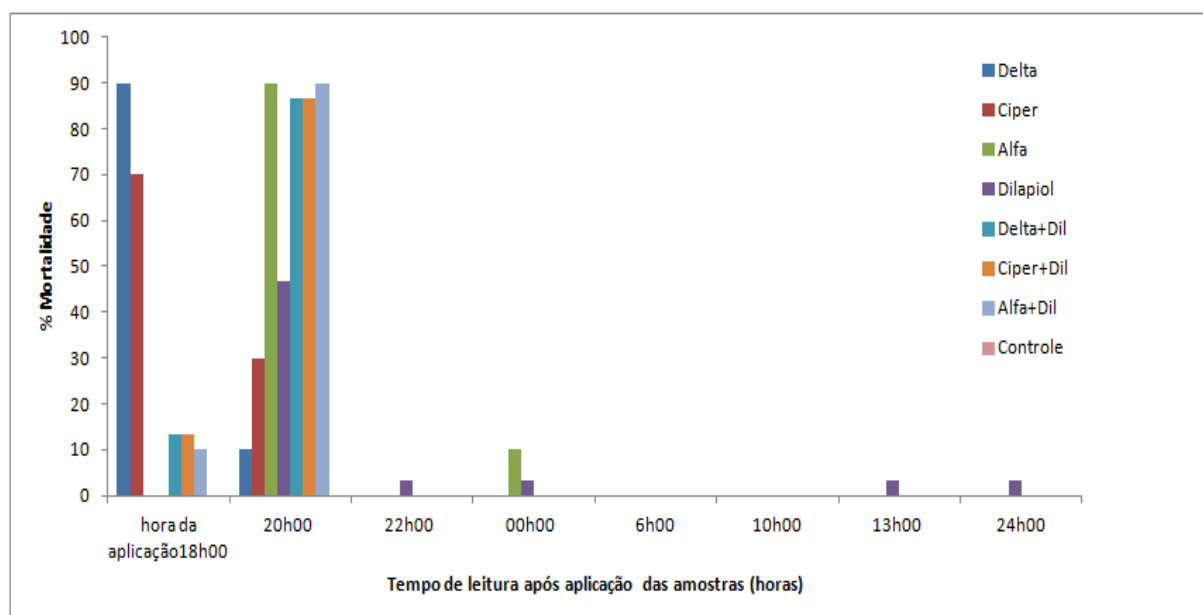


Figura 22. Percentual de mortalidade avaliado durante 24 horas após a borrfiação direta no mosquito.

Tabela 25. Resultados da análise de variância (ANOVA Fatorial) com fatores mistos – prova de contato tópico.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F	Valor Crítico	Probabilidade
Substância	34,32	7	4,902857	34,86476	2,6572	p < 0,05
Tempo	667,65	7	95,37857	95,66328	2,1343	p < 0,05
Interação	533,85	49	10,8949	10,92742	1,5548	p < 0,05
Total	1321,82	191	6,920524			

Tabela 26. t -Tukey; 18h00 probabilidades aproximadas para testes *post hoc* Erro: entre MS = 2,3333, df = 16,000.

	Delta	Ciper	Alfa	Dilapiol	Delta+Dil	Ciper+Dil	Alfa+Dil	Controle
Delta								
Ciper	0,742185							
Alfa	0,000203	0,000921						
Dilapiol	0,000203	0,000921	1,000000					
Delta+Dil	0,000437	0,006298	0,954646	0,954646				
Ciper+Dil	0,000437	0,006298	0,954646	0,954646	1,000000			
Alfa+Dil	0,000333	0,003795	0,990562	0,990562	0,999993	0,999993		
Controle	0,000203	0,000921	1,000000	1,000000	0,954646	0,954646	0,990562	

Tabela 27. t -Tukey; 20h00 probabilidades aproximadas para testes *post hoc* Erro: entre MS = 2,7500, df = 16,000.

	Delta	Ciper	Alfa	Dilapiol	Delta+Dil	Ciper+Dil	Alfa+Dil	Controle
Delta								
Ciper	0,808445							
Alfa	0,000591	0,007810						
Dilapiol	0,189484	0,910708	0,081096					
Delta+Dil	0,000852	0,012572	0,999996	0,125370				
Ciper+Dil	0,000852	0,012572	0,999996	0,125370	1,000000			
Alfa+Dil	0,000591	0,007810	1,000000	0,081096	0,999996	0,999996		
Controle	0,994185	0,392261	0,000273	0,051573	0,000337	0,000337	0,000273	

7.0. CONCLUSÕES

1. Repelência

- A diversidade de testes para avaliar a eficácia do sistema nanoestruturado com os veiculadores Sepigel e Carbopol 0,7%, utilizados no método de repelência, mostrou que as amostras nanoencapsuladas apresentaram eficácia em todos os testes realizados;
- O número de picadas no **braço não tratado** foi maior que o tratado, estatisticamente constatado, tanto para as substâncias testadas como para o tempo após a aplicação. No entanto, o número de picadas não depende da interação entre a substância e o tempo;
- O número de picadas no **braço tratado** mostrou diferença significativa tanto para as substâncias testadas como para o tempo, assim como o número de picadas depende da interação entre a substância e o tempo de aplicação;
- A nanocápsula de Carbopol 0,7% com dilapiol não apresentou diferença significativa em relação ao óleo puro do dilapiol. Esta nanocápsula foi a que melhor representou o potencial de repelência entre as amostras nanoencapsuladas testadas neste trabalho;
- O óleo de dilapiol isolado mostrou potencial de repelência de pelo menos uma hora e meia após a aplicação (tempo máximo analisado). Este princípio ativo se mostrou eficaz para a proteção individual contra mosquitos adultos transmissores da malária humana, na região amazônica;
- Os dados deste trabalho indicam o dilapiol puro e nanoencapsulado, como uma alternativa de compostos naturais extraídos de plantas da Amazônia, para ser utilizado como repelente para *Anopheles darlingi*, principal vetor da malária humana na região.

2. Prova Biológica de Parede

- As análises de mortalidade para avaliação do potencial sinérgico do dilapiol nanoencapsulado, e as associações com os piretróides indicaram a eficácia do composto como uma alternativa para redução da quantidade do produto químico utilizado nas ações de controle, especialmente no que se refere às borrições intradomiciliares;
- Na prova biológica de parede no terceiro experimento, verificou-se que o 7º dia foi o intervalo de tempo que melhor exibiu o potencial de sinérgico das nanocápsulas associadas de delta+dil, alfa+dil e ciper+dil.
- Todos os resultados da prova biológica indicam a efetividade das amostras nanoencapsuladas em relação às comerciais e confirma seu potencial sinérgico, quando se avalia as nanocápsulas associadas.

3. Aplicação Tópica

- A análise da microscopia eletrônica de varredura mostrou que as nanopartículas de PLA, após a aplicação tópica, ficam aderidas principalmente nas nervuras das escamas do mosquito, embora no experimento de parede não tenha sido observada mortalidade dos mesmos em nível significativo;
- As amostras nanoencapsuladas tanto dos inseticidas comerciais quanto das nanocápsulas associadas de delta+dil, alfa+dil e ciper+dil, constituem-se em uma opção viável para substituir os produtos químicos sintéticos.

Assim, este trabalho, ao apresentar três modelos de estudo para avaliar o Dilapiol nanoestruturado quanto ao potencial de repelência, efeito sinérgico e mortalidade de mosquito pelo contato tópico, constituem-se em

ferramentas eficazes para a proteção do homem em áreas endêmicas de malária.

Desta forma, este trabalho mostrou que os princípios ativos extraídos da biodiversidade representam um direcionamento, ao mesmo tempo, efetivo e promissor diante de um vasto campo a ser desvendado, cujos princípios ativos estão armazenados na natureza e que podem retornar à sociedade contribuindo para melhorias na qualidade de vida.

8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABQCT, 2009. (www.abqct.com.br/vnoticia.aspx?id=100). Acesso: 07/01/2012.

Al-Khoury, N.; Fessi, H.; Roblot-Treupel, L.; Devissaguet, J.P.h.; Puisieux, F. 1986. An original procedure for preparing nanocapsules of polyalkylcyanoacrylates for interfacial polymerization. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 61:274-81.

Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L.K.; Farokhzad, O.C. 2008. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 5:505-515.

Amer, A.; Mehlhorn, H. 2006. Repellency effect of forty-one essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes. *Parasitology Research*, 99:478–490.

Avgoustakis, K.; Beletsi, A.; Panagi, Z.; Klepetsanis, P.; Livaniou, E.; Evangelatos, G.; Ithakissios, D.S. 2003. Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA-mPEG nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 259:115-27.

Bagavan, A.; Kamaraj, C.; Elango, G.; Abduz, Z.A.; Rahuman, A.A. 2009. Adulticidal and larvicidal efficacy of some medicinal plant extracts against tick, fluke and mosquitoes. *Veterinary Parasitology*, 166 (3-4):286-92.

Barnard, D.R. 1999. Repellency of essential oils to mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 36:625-629.

Barnard, D.R.; Xue, R.D. 2004. Laboratory Evaluation of Mosquito Repellents Against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 41(4):726-730.

Beckel, H.S.; Lorini, I.; Lazzari, S.M.N. 2006. Efeito do sinergista butóxido de piperonila na resistência de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae) a deltametrina e fenitrotiom. *Revista Brasileira de Entomologia*, 50(1):110-114.

Benjawan, T.; Wratten, S.D.; Scott, R.R.; Thavara, U.; Techadamrongsin, Y. 2005. Repellent properties of celery, *Apium graveolens* L., compared with commercial repellents, against mosquitoes under laboratory and field conditions. *Tropical Medicine and International Health*. 10(11):76-82.

Bernard, C.B.; Krishnamurty, H.G.; Chauret D.; Durst, T.; Philogène, B.J.R.; Sánchez-Vindas, P.; Hasbun, C.; Poveda, L.; San Román, L.; Arnason, J.T. 1995. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. *Journal of Chemical Ecology*, 21:801-814.

Bielza, P.; Espinosa, J.P.; Quinto, V.; Abellán, J.; Contreras, J. 2007. Synergism studies with binary mixtures of pyrethroid, carbamate and organophosphate insecticides on *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Pest Management Science*, 63: 84-89.

Bingham, G.; Gunning, R.V.; Gorman, K.; Field, L.M.; Moores, G.D. 2007. Temporal synergism by microencapsulation of piperonyl butoxide and α -cypermethrin overcomes insecticide resistance in crop pests. *Pest Management Science*, 63:276–281.

Blouza, I.L.; Charcosset, C.; Sfar, S.; Fessi, H. 2006. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. *International Journal of Pharmaceutics*, 325:124-31.

Boonyabancha, S.; Suphaphom, K.; Srisurapat, A. 1997. Repellent effect of volatile oils on *Aedes aegypti*. *Bulletin Department of Medical Science*, 39:61-66.

Braibante, M.E.F.; Zappe, J.A. 2012. A química dos Agrotóxicos. *Química na Escola*. 34 (1):10-15.

Brannon-Peppas, L.; Blanchette, J.O. 2004. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56:1649-1659.

Breman, J.G. 2001. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants and estimates of the malaria burden. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 64:1–11.

Brindley, W.A.; Selim, A.A. 1984. Synergism and antagonism in the analysis of insecticide resistance. *Environmental Entomology*, 13:348–353.

Calvo, P.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J. 1996. Comparative in Vitro Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules, and Nanoemulsions, as Ocular drug Carriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(5):530-36.

Casida, J.E. 1970. Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18:753–772.

Casida, J.E.; Quistad, G.B. 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *The Annual Review of Entomology*, 43:1–16.

Casida, J.E. 1990. Pesticide mode of action: evidence for and implications of a finite number of biochemical targets. In: J.E. Casida (Ed). *Pesticides and Alternatives: Innovative Chemical and Biological Approaches to Pest Control*, pp. 11–22. Amsterdam: Elsevier. 586 pp.

Casimiro, S.; Coleman, M.; Mohloai, P.; Hemingway, J.; Sharp, B. 2006. Insecticide resistance in *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) from Mozambique. *Journal of Medical Entomology*, 43:267–275.

Castro Neto, N.; Denuzi, V.S.S.; Rinaldi, R.N.; Staduto, J.A.R. 2010. Produção orgânica: uma potencialidade estratégia para a agricultura familiar. *Revista Percurso*, 2(2):73-95.

Chokechaijaroenporn, O.; Bunyapraphatsara, N.; Kongchuensin, S. 1994. Mosquito repellent activities of ocimum volatile oils. *Phytomedicine*. 1:135-139.

Ciccio, J.F.; Ballester, C. 1997. Constituyentes volátiles de las hojas y espigas de *Piper aduncum* (Piperaceae) de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 45(2): 783.

Coleman, R.E.; Robert, L.L.; Roberts, L.W.; Glass, J.A.; Seeley, D.C.; Laughinghouse, A.; Perkins, P.V.; Wirtz, R.A. 1993. Laboratory evaluation of repellents against four anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) and two phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 30: 499-502.

Consoli, R.A.G.B. e Lourenço-de-Oliveira, R. 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro. 225pp.

Corbel, V.; N'Guessan, R.; Brengues, C.; Chandre, F.; Djogbenou, L.; T. Martin; M. Akogbeto; J.M. Hougard; M. Rowland. 2007. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Tropica*, 101(3):207-216.

Dash, A.P.; Adak, T.; Raghavendra, K.; Singh, O.P. 2007. The biology and control of malaria vectors in India. *Current Science*, 92:1571-1578.

Dash, A.P.; Raghavendra, K.; Pillai, M.K.K. 2006. Combating Resistance to Insecticides in Malaria Control- Gains Made in India. *Bayer Environmental Science Journal*, 18:30-37.

Daglish, G.J.; Eelkema, M.; Harrison, L.M. 1995. Chlorpyrifosmethyl plus either methoprene or synergized phenothrin for control of Coleoptera in maize in Queensland, Australia. *Journal of Stored Products Research*. 31:235–241.

Darriet, F.; Chandre, F. 2011. Combining piperonyl butoxide and dinotefuran restores the efficacy of deltamethrin mosquito nets against resistant *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 48:952-955.

Dartigues, V. 1987. Utilización de la deltametrina en el control de la malaria. Paris, *Roussel Uclaf Agrovét Division*, 77p.

Deane, L.M. 1986. Malaria vectors in Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 8/(supl.II):5-14.

Deane, L.M.; Casey, O.R.; Deane, M.P. 1948. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das Regiões Nordeste e Amazônica do Brasil. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública*, 1:827-965.

Djouaka, R.; Irving, H.; Tukur, Z.; Wondji, C.S. 2011. Exploring Mechanisms of Multiple Insecticide Resistance in a Population of the Malaria Vector *Anopheles funestus* in Benin. *Plos One*, 6(11): 277-60.

Duran, N.; Mattoso, L.H.C.; Morais de, P.C.; 2006. *Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplo de aplicações*. São Paulo: Artliber Editora. 208 pp.

- Dutta, S.; Ray, D.; Kolli, B.K.; Chang, K.P. 2005. Photodynamic sensitization of *Leishmania amazonensis* in both extracellular and intracellular stages with aluminum phthalocyanine chloride for photolysis *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49:4474-4484.
- Elango, G.; Bagavan, A.; Kamaraj, C.; Zahir, A.A.; Rahuman, A.A. 2009. Oviposition-deterrent, ovicidal, and repellent activities of indigenous plant extracts against *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 105:1567–1576.
- Enderlein, R. 1994. *Microeletrônica: Uma Introdução ao Universo dos microchips, seu funcionamento, fabricação e aplicações*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. p. 192.
- Faria, A.B. de C. 2009. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais. *Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais*, 5(2):345 – 358.
- Ferrari, J.A. 1996. Insecticide resistance. *In: Beaty, B. J., Marquardt, W. C. The biology of disease vectors*. Niwot: University Press of Colorado. p.512-529.
- Ferreira, W.L.B. 1999. Inseticidas de uso domiciliar e controle de vetores de doenças. *In: Mariconi, F.A.M. (Ed.). Insetos e outros invasores de residências*. Vol. 6. Piracicaba: FEALQ, p. 403-452.
- Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.P.H.; Ammoury, N.; Benita, S. 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55:1-4.
- Forattini, O.P. 2002. *Culicidologia médica*, vol 2: Identificação, biologia e epidemiologia. São Paulo, Ed. da Universidade de São Paulo, 860p.
- Forattini, O.P. 1962. *Entomologia médica*. Parte geral, Diptera, Anophelini. v. 1, São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP.
- Fradin, M.S.; Day, J.F. 2002. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *The New England J. of Medicine*, 347:13–18.
- Fundação Nacional de Saúde. 1997. (FNS – National Foundation of health/ Ministry of Health), Internal Directive 164 CCDTV/DEOPE from March 3 rd.
- Georghiou, G.P. 1990. From Fundamental Research to Practical Strategies. *In: Green M.B.; LeBaron H.M.; Moberg W.K. (Eds). Managing Resistance to Agrochemicals*. American Chemical Society, Washington DC, p.18-41.
- Gomes, E.O.; Quignard, E.T.J.; Tadei, W.P. 2002. Prospecção de Substâncias larvicidas em Extratos de Plantas da Amazônia. *Anais da XI Jornada de Iniciação Científica do PIBIC/INPA*, 03 a 05 de Julho de 2002. Manaus: INPA, p.94.

Gomes, E.O.; Tadei, W.P. 2010 ; Nunomura, S.M. 2010. Estudo do Dilapiol como Agente Sinergista em Inseticidas Sintéticos. *Resumos do 7º Seminários Avançados em Doenças Tropicais e Biotecnologia do XI Curso de Controle Biológico*, 28 a 30 de outubro de 2010. Manaus: INPA.

Gorham, J.R.; Stojanovick, C.J.; Scott, H.G. 1967. *Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos de Sudamérica Oriental*. Washington DC: U.S. Department of Health, Education e Welfare.

Gottlieb, O.R.; Salatino, A. 1987. Função e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. *Ciência e Cultura*, 39(8):707-715.

Grellier, P.; Benach, J.; Labaied, M.; Charneau, S.; Gil, H.; Monsalve, G.; Alfonso, R.; Sawyer, L.; Lin, L.; Steiert, M.; Dupuis, K. 2008. Photochemical inactivation with amotosalen and long-wavelength ultraviolet light of Plasmodium and Babesia in platelet and plasma components, *Transfusion*, 48:1676-168.

Grieger, K.D.; Baun, A.; Owen, R. 2010. Redefining risk research priorities for nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(2):383-392.

Guterres, S.S.; Benvenuto, E.V.; Pohlmann, A.R., 2006. Nanopartículas Poliméricas para administração de Fármacos. In: Nelson D.; Mattoso, L. H.C.; Morais P.C. (Eds.). *Nanotecnologia - Introdução, Preparação e Caracterização de Nanomateriais e Exemplos de Aplicação*. Editora Artliber, São Paulo. p. 161-166.

Hamblin, M. R. e Hasan, T. 2004. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochemical e Photobiological Sciences*, 3:436-450.

Hans, M.L.; Lowman, A.M. 2002. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6:319-27.

Hargreaves, K.; Koekemoer, L.L.; Brooke, B.D.; Hunt, R.H.; Mthembu, J.; Coetzee M. 2000. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology*, 14:1-9.

Hirata, H.M.; Hirata, R.D.C.; Filho, J.M. 2012. Manual de Biossegurança. In: Consiglieri, V.O. (Ed). *Biossegurança em Biotecnologia*. São Paulo: Manole. p. 331-340.

Hirenkumar, K.; Makadia, Steven, J. Siegel. 2011. Review Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 3:1377-1397.

Jensen, H.R.; Scott, I.M.; Sims, S.; Trudeau, V.L; Arnason, J.T. 2006. The effect of a synergistic concentration of a *P. nigrum* extract used in conjunction with pyrethrum upon gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology*, 15:329-339.

Kamaraj, C.; Rahuman, A. A.; Mahapatra, A.; Bagavan, A.; Elango, G. 2010. Insecticidal and larvicidal activities of medicinal plant extracts against mosquitoes. *Parasitology Research*, Aug 6.

Kayser, O.; Lemke, A.; Hernandez-Trejo, N. 2005. The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. *Current Pharmaceutical Biotechnology*,6:3-5.

Kazachkova, N.I. 2007. *Genotype analysis and studies of pyrethroid resistance of the oil seed rape (Brassica napus) insect pest-pollen beetle (Meligethes aeneus)*. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden. 56p.

Kim, E.J.; Yoon, S.J.; Yeo, G.D.; Pai, C.M.; Kang, I.K. 2009. Preparation of biodegradable PLA/PLGA membranes with PGA mesh and their application for periodontal guided tissue regeneration. *Publishing Biomedical Materials Biomed. Mater*, 4 (7pp).

Lei Federal Nr. 11936 de 14 de Maio, 2009. Diário Oficial da União, Brasília, D.F., 15 de Maio, 2009.

Lichtenstein, E.P.; Liang, T.T.; Schulz, R.K.; Schnoes, K.H.; Carter, T.G. 1974. Insecticidal and Synergistic Components Isolated from Dill Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22:658-664.

Lorini, I.; Galley, D.J. 2000. Effect of the synergists piperonyl butoxide and DEF in deltamethrin resistance on strains of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 29:749–755.

Lourenço de Oliveira, R.; Guimarães, E.G.G.; Arlé, M.; Silva, T.F.; Castro, M.G.; Motta, M. A.; Deane, L. M. 1989. Anopheline species, some of their habitats and relation to malaria in endemic areas of Rondônia state, Amazon region of Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 84:501-514.

Maia, J.G.S.; Zoghbi, M.G.S.; Andrade, E.H.A.; Santos, A.S.; Silva, M.L.; Luz, A.I.R.; Bastos, C.N. 1998. Constituents of the oil of *Piper aduncum* L. growing in the Amazon Region. *Flavour and Fragrance Journal*, Scotland, 13:269-272.

Makadia, H.K.; Siegel, S.J. 2011. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*. 13(3):1377-1397

Maynard, A.D.; Warheit, D.B.; Philbert, M.A. 2011. The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond. *Toxicological Sciences*. 120(1): 109–129.

Martinez-Torres, D.; Chandre, F.; Williamson, M.S.; Darriet, F.; Bergé, J.B.; Devonshire, A.L.; Guillet, P.; Pasteur, N.; Pauron, D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 7:179–184.

Magenheim, B.; Benita, S., 1991. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. *STP Pharma Sciences*. 1:221-241.

Mehlhorn, H.; Schmahl, G.; Schmidt, J. 2005. Extract of the seeds of the plant *Vitex agnus castus* proven to be highly efficacious as a repellent against ticks, fleas, mosquitoes and biting flies. *Parasitology Research*, 95(5):363–365.

Midio, A.F.; Silva, E.S. 1995. *Inseticidas-Acaricidas - Organofosforados e Carbamatos*. São Paulo, Ed. Roca Ltda. 84 pp.

Ministry of Agriculture Directive 329 from September 2, 1985. Diário Oficial da União, Brasília, D.F.: September 3 rd, Section 1, p.12941.

Ministry of Health – Brazil Directive 11 from January 8, 1998. Diário Oficial da União, Brasília, D.F.: January 1st, Section 1, p.2.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2006. Ações de controle da malária: manual para profissionais de saúde na atenção básica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 52 p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Misni, N.; Sulaiman, S.; Othman, H.; Omar, B. 2009. Repellency of essential oil of *Piper aduncum* against *Aedes albopictus* in the laboratory. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 25(4):442-7.

Mohan, L.; Sharma, P.; Srivastava, C.N. 2006. Evaluation of *Solanum xanthocarpum* extract as a synergist for cypermethrin against larvae of the filarial vector *Culex quinquefasciatus* (Say). *Entomological Research*, 36:220–225.

Mora-Huertas, C.E.; Garrigues, O.; Fessi, H.; Elaissari, A. 2012. Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification–diffusion methods: Comparative study European. *Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80:235–239.

Morais, S.M.; Cavalcanti, E.S.; Bertini, L.M.; Oliveira, C.L.; Rodrigues, J.R.; Cardoso, J.H. 2006. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti* L. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22(1):161–164.

Mosqueira, V.C.F.; Legrand, P.; Pinto-Alphandary, H.; Puisieux, F.; Barratt, G. 2000. Poly (D, L-Lactide) Nanocapsules Prepared by a Solvent Displacement Process: Influence of the Composition on Physicochemical and Structural Properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(5):614-26.

Muller, P. 1959. *The Insecticide Dichlorodiphenyltrichloroethane and Its Significance*. Vol. II. Basel: Berkhauser Verlag. 570 pp.

Nambam, J.S.; Philip, J. 2012. Competitive adsorption of polymer and surfactant at a liquid droplet interface and its effect on flocculation of emulsion. *Journal of Colloid and Interface Science*, 366:88–95.

Nerio, L.S.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E. 2010. Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource Technology*, 101(1):372-8.

Nunes, M.V.; Tajara, E.H. 1998. Efeitos tardios dos praguicidas no homem. *Revista de Saúde Pública*, 32:372-382.

Oberdörster G.2012.<http://ehp03.niehs.nih.gov/article/info:doi/10.1289/ehp.1104320>). Acessado 30/01/2012.

Oliveira Filho, A.M. 1992. Control of malaria vectors in the amazon region. Implications of insecticide resistance. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. São Paulo, 34:16-20.

Olivier, J.C. 2005. Drug Transport to Brain with Targeted Nanoparticles. *Neuro Rx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2:108-19.

O'Neill, P.M.; Ward, S.A.; Berry, N.G.; Jeyadevan, J.P.; Biagini, G.A.; Asadollaly, E.; Park, B.K.; Bray, P.G. 2006. A medicinal chemistry perspective on 4-aminoquinoline antimalarial drugs, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 6:479-507.

Osimitz, T.G.; Murphy, J.V.; Fell, L. A. 2010. Adverse events associated with the use of insect repellents containing N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 56:93–99.

Pennetier, C.; Corbel, V.; Hougard, J.M. 2005. Combination of a non-pyrethroid insecticide and a repellent: a new approach for controlling knockdown-resistant mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72:739–44.

Pillai, O.; Panchagnula, R. Polymers in drug delivery. 2001. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5:447-451.

Pimentel, F.A.; Pereira, J.B.M.; Oliveira de, M.N. 1998. Zoneamento e caracterização de habitats naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) no Acre. Rio Branco: *Embrapa CPAF/AC*, 20:17.

Pinto Reis, C.; Neufeld, R.J.; Ribeiro, A.J.; Veiga, F. 2006. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2:8-21.

Pinto, A.C.S.; Nogueira, K.L.; Tadei, W.P.; Soares Neto, M.A. 2011. Avaliação do potencial larvicida de óleos essenciais da Amazônia em *Aedes aegypti*. In: 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis.

Plapp, F.W.; Casida, J.E. 1958. Hydrolysis of the alkyl-phosphate bond in certain dialkyl aryl phosphorothioate insecticides by rats, cockroaches, and alkali. *Journal of Economic Entomology*, 51:800-803.

Pohlit, A.M.; Lopes, N.P.; Gama, R.A.; Tadei, W. P.; Andrade Neto, V.F. 2011. Patent Literature on Mosquito Repellent Inventions which Contain Plant Essential Oils - A Review. *Planta Medica*, 77:598-617.

Posey, K.H.; Barnard, D.R.; Schreck, C.E. 1998. Triple cage olfactometer for evaluating mosquito (Diptera: Culicidae) attraction responses. *Journal of Medical Entomology*, 35(3):330-334.

Primo, F.L.; Michieletto, L.; Rodrigues, M.A.M.; Macaroff, P.P.; Morais, P.C.; Lacava, Z.G.M.; Bentley, M.V.L.B.; Tedesco, A.C. 2007. Magnetic nanoemulsions as drug delivery system for Foscan: Skin permeation and retention in vitro assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 311:354–357.

Qiu, H.; Jun, H.W.; McCall, J. W. 1998. Pharmacokinetics, formulation, and safety of insect repellent *N,N*-diethyl-3-methylbenzamide (deet): A review. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14:12-27.

Quignard, E.T.J.; Pohlit, M.A.; Rodrigues, B.I.; Nunomura, S.M.; Tadei, W.P.; Alecrim, A.M.; Pinto, A.C.S.; Pedroso, A.C.S.; Gomes, E. O.; Souza, K.S.; Oliveira, L.C.P.; Don, L.C.; Henrique, C.M.; Santos, M. 2002. Screening of plants found in Amazonas state, Brazil for activity against *Aedes aegypti* larvae. *Atti-Resumenes XI Congresso Italo-latinoamericano di Etnomedicina*. Pavia, Itália.

Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Doelker, E.; Fessi, H. 1998. Preparation and Characterization of Nanocapsules form Preformed Polymers by a New Process based on Emulsification-Diffusion Technique. *Pharmaceutical Research*, 15(7):1056-62.

Raffa, K.F.; Priester, T.M. 1985. Synergists as research tools and control agents in agriculture. *Journal of Agricultural Entomology*, 2:27–45.

Raghavendra, K.; Barik, T.K.; Reddy, B.P.N.; Sharma, P.; Dash, A.P. 2011. Malaria vector control: from past to future. *Parasitology Research*, 108:757–779.

Raghavendra, K.; Subbarao, S.K. 2002. Case studies on insecticide resistance and its anagement. In: Frederick G (Ed). *Proceedings of Mekong Malaria Forum*, RMCP-EC, pp 17–21.

Rahuman, A. A.; Venkatesan, P. 2008. Larvicidal efficacy of five cucurbitaceous plant leaf extracts against mosquito species. *Parasitology Research*, 103:133–139.

Rahuman, A.A.; Bagavan, A.; Kamaraj, C.; Saravanan, E.; Zahir, A. A.; Elango, G.; 2009a. Efficacy of larvicidal botanical extracts against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 104(6):1365–1372.

Rahuman, A.A.; Bagavan, A.; Kamaraj, C.; Vadivelu, M.; Zahir, A.A.; Elango, G.; Pandiyan, G. 2009b. Evaluation of indigenous plant extracts against larvae of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 104(3):637–643.

Redhead, H.M.; Davis, S.S.; Illum, L. 2001. Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in

vitro characterisation and *in vivo* evaluation. *Journal of Contolled Release*, 70:353-63.

Reichling, J.; Schnitzler, P.; Suschke, U.; Saller, R. 2009. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties-an overview. *Forsch Komplementmed*, 16(2):79-90.

Ribeiro, J.E.L. do S.; Hopkins, M.J.G.; Vicentini, A.; Sothers, C.A.; Costa, M.A. da S.; Brito, J.M.; Souza, M.A.D.; Martins, L.H.P.; Lohmann, L.G.; Assunção, P.A.C.L.; Pereira, E. da C.; Silva, C.F.; Mesquita, M.R.; Procópio, L.C. 1999. *Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central*. Manaus, INPA. 816p.

Rico, A.; Geber-Corrêa, R.; Campos, P.S.; Garcia, M.V.B.; Waichman, A.V.; Brink P. J.V.D. 2010. Effect of Parathion-Methyl on Amazonian Fish and Freshwater Invertebrates: A Comparison of Sensitivity with Temperate Data. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 58:765–771.

Rodrigues, J.S.; Santos-Magalhães, N.S.; Coelho, L.C.B.B.; Couvreur, P.; Pochel, G.; Gref, R. 2003. Novel core (polyester)-shell (polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. *Journal of Controlled Release*, 92:103-112.

Rogan, W.J.; Chen, A. 2005. Health risks and benefits of bis (4-chlorophenyl)-1, 1, 1-trichloroethane (DDT). *Lancet* 2005, 366:763-73.

Rozendaal, J.A. 1997. *Vector Control. Methods for use by individuals and communities*. World Health Organization. Geneva. 398p.

Samson, P.R.; Parker R.J.; Hall, E.A. 1990. Synergized deltamethrin as a protectant against *Sitophilus zeamais* Motsch. and *S. oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) on stored maize. *Journal of Stored Products Research* 26:155–161.

Santos, N.P.S.; Nascimento, S.C.; Silva, J.F.; Pereira, E.C.; Silva, N.H.; Honda, N.K.; Santos-Magalhães, N.S. 2005. Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. *Journal Drug Delivery Sciense Technology*, 15(5):355-61.

Santos, M.A.T.; Areas, M.A.; Reyes, F.G.R. 2007. Piretróides - uma visão geral. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara, 18(3):339-349.

Santos-Magalhães, N.S.; Pontes, A.; Pereira, V.M.W.; Caetano, M.N.P. 2000. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, 208:71-80.

Schaffazick, S.R.; Guterres, S.S.; Freitas, L.L.; Pohlmann, A.R. 2003. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos. *Quimica Nova*, 26(5):726-737.

Scott, I.M.; Jensen, H.R.; Philogène, B.J.R.; Arnason, J.T. 2008. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews*, 7:65–75.

Scott, I.M.; Jensen, H.; Nicol, R.; Lesage, L.; Bradbury, R.; Sanchez-Vindas, P.; Poveda, L.; Arnason, J.T.; Philoge, B.G. 2004. Efficacy of Piper (Piperaceae) extracts for control of common home and garden insect pests. *Journal of Economic Entomology*, 97:1390–1403.

Sharma, V.P.; Ansari, M.A.; Razdan, R.K. 1993. Mosquito repellent action of neem (*Azadirachta indica*) oil. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 9: 359-360.

Silva, W.M. 2011. *Aspectos Genéticos e Comportamentais da Resistência a Deltametrina em Populações de Plutella xylostella (L.) (Lepidoptera: Plutellidae)*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola/Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 73pp.

Silvério, F.O.; Alvarenga, E.S.; Moreno, S.C.; Picanço, M.C. 2009. Synthesis and insecticidal activity of new pyrethroids. *Pest Management Science*, 65:900–905.

SIVEP/MALÁRIA - Sistema de Vigilância Epidemiológica. 2009.(<http://www.saúde.gov.br>) Acesso 01/05/10.

Sousa, P.J.C.; Barros, C.A.L.; Rocha, J.C.S.; Lira, D.S.; Monteiro, G.M.; Maia, J.G.S. 2008. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2):217-221.

Souza, W. 2007. *Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas*. Sociedade Brasileira de Microscopia e Microdiálise/SBMM, Rio de Janeiro, 1:1-357.

Stadler, T.; Butelerb, M.; KWeaverb, D. 2010. Novel use of nanostructured alumina as an insecticide. *Pest Management Science*, 66:577–57.

Suarez, M.F.; Quiñones, M.L.; Palacios, J.D.; Carrillo, A. 1990. First Record of DDT resistance in *Anopheles darlingi*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 6(1):72-74.

Suwonkerd, W.; Tantrarongroj, K. 1994. Efficacy of essential oil against mosquito biting. *Journal of Communicable Diseases*, 20:4-11.

Tadei, W.P. 1993. Biology of Amazonian Anophelines. XVIII. Considerations about *Anopheles* species (Culicidae), transmission and malaria control in the Amazon region. *Revista da Universidade do Amazonas*, 2(1-2):1-34.

Tadei, W.P.; Santos, J.M.M. 1982. Biologia de Anofelinos Amazônicos. VII. Estudo da variação de freqüências das inversões cromossômicas de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera, Culicidae). *Acta Amazônica*, 12(4):759-785.

Tadei, W.P.; Scarpassa, V.M.; Souza, A.C. 1988. Estudo das adaptações de anofelinos e outros culicídeos na UHE de Tucuruí. In: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, São Paulo. *Ciência e Cultura*, 40:665-665.

Tadei, W.P.; Ferreira, A.W.; Ávila, S.L.M.; Nussenzweig, R.S.; Xavier, P.A.; Lima, I.E.N.S. 1991. Prevalence of *Plasmodium* spp. in *Anopheles* spp. in goldmining areas of Amapá State, Brazil detected by immuno-enzimatic assay. IV International Congress on Malaria and Babesiosis (Abstracts), Fiocruz/Foundation Internationale Laveran, Rio de Janeiro, ab. 10.34.

Tadei, W.P.; Rodrigues, I.B.; Santos, J.M.M.; Rafael, M.S.; Passos, R.A.; Costa, F.M.; Pinto, R.C.; Oliveira, A.E.M. 2007. O Papel da Entomologia no Controle da Malária. X Reunião Nacional de Pesquisa em Malária. *Revista Brasileira de Medicina Tropical*, 40:22-26.

Tawatsin, A.; Asavadachanukorn, P.; Thavara, U.; Wongsinkongman, P.; Bansidhi, J.; Boonruad, T.; Chavalit-tumrong, P.; Soonthornchareonnon, N.; Komalamisra, N.; Mulla, M.S. 2006. Repellency of essential oils extracted from plants in thailand against four mosquito vectors (Diptera: Culicidae) and oviposition deterrent effects against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 37(6):915-931.

Tawatsin, A.; Wratten, S.D.; Scott, R.R.; Tharara, U.; Techadamrongsin, Y. 2001. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. *Journal of Vector Ecology*, 26:76-82.

Tedesco, A.C. 2006. Uso de Dispositivos Nano-estruturados no tratamento do Câncer. In: Paulo C. Morais; Nelson Duran; Luiz C Mattoso (Eds). *Nanotecnologia*. São Paulo: Artliber Editora LDTA, cap.12, p.183-193.

Tedesco, A.C. 2008. Terapia Fotodinâmica sinérgica: Perspectivas e Desafios para o futuro. In: Bagnato S. Vanderlei (Ed). *Novas Técnicas Ópticas para as Áreas da Saúde*. São Paulo: Livraria da Física. cap. 02, p.23-52.

Tedesco, A.C.; Simiono, A.R.; Primo, F.L. 2007. Introdução a Nanotecnologia. In: Marcelo M. de Morais (Ed). *Terapias Avançadas: Células Tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia Aplicada a Saúde*. São Paulo: Atheneu, cap.16, p.237-246.

Teixeira, M.; Alonso, M.J.; Pinto, M.M.M.; Barbosa, C.M. 2005. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59: 491-500.

Wainwright, M.; Amaral, L. 2005. Review: The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs, *Tropical Medicine e International Health*, 10:501-511.

Walker, T.W.; Robert, L.L.; Copeland, R.A.; Githeko, A.K.; Wirtz, R.A.; Githure, J.I.; Klein, T.A. 1996. Field evaluation of arthropod repellents, deet and a piperidine compound, AI3-37220, against *Anopheles funestus* and *Anopheles arabiensis* in West Kenya. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 12:172-176.

Ware, G.W. An introduction to insecticides. 2000. Disponível em: <<http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>>. Acesso em: 10 agosto 2012.

Wondji, C.S.; Dabire, R.K.; Tukur, Z.; Irving, H.; Djouaka, R.; Morgan, J.C. 2011. Identification and distribution of a GABA receptor mutation conferring dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7):484-91.

Yap, H.H. 1986. Effectiveness of soap formulations containing deet and permethrin as personal protection against outdoor mosquitoes in Malaysia. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2:63-7.

World Health Organization - WHO. 1975. Manual on Practical Entomology in Malaria. Part II. Methods and Techniques. Geneva. 191p.

World Health Organization - WHO. 1980. Fourth Meeting of the Scientific Work Group on Biological Control of Insect Vectors of diseases. Geneva. 6-10 October. Document TDR/BCV/80.03.

World Health Organization - WHO. 1986. World malaria situation in 1984. *World health statistics quarterly*, 39:171-205.

World Health Organization - WHO. 1996. Report of the WHO informal consultation on the evaluation and testing of insecticides. CTD/ WHOPE/IC/96.1, Control of Tropical Diseases Division. World Health Organization, Geneva, 69pp.

World Health Organization - WHO. 1997. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Edited by Yap, H.H. e Chavasse D.C. WHO/CTD/WHOPE/97.2., 138p.

World Health Organization - WHO. gives indoor use of DDT a clean bill of health for controlling malaria. 2006 Available at <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr50/en/print.html>. Accessed em 20 Agosto, 2012).

World Health Organization - WHO. 2008. World malaria situation in 2007 population at risk. *Weekly Epidemiological Record*, 73:269-274.

World Health Organization – WHO. 2011. Part 6. World Malaria Report 2010 WHO Global Malaria Programme, p. 39-60.

ANEXO

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre Esclarecido: Repelência

I – IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Documento de identidade: _____ Data de nascimento: _____

Endereço: _____

Município: _____

II-DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1- NOME DO ESTUDO

“EFETIVIDADE DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS NO USO DO DILAPIOL (ÓLEO ESSENCIAL) EM AÇÕES DE CONTROLE DA MALÁRIA AVALIANDO-SE O EFEITO REPELENTE, E NA ASSOCIAÇÃO COM PIRETRÓIDES O POTENCIAL SINERGÍSTICO E O EFEITO DO CONTATO TÓPICO EM MOSQUITOS.”

2- AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Sem risco ____ Risco mínimo X Risco médio ____
Risco baixo ____ Risco maior ____

3- DURAÇÃO DA PESQUISA : 10 MESES

III- REGISTRO DE EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR

1. PROPOSTA DO ESTUDO:

Você está sendo convidado (a) a participar, de modo voluntário, em um projeto de pesquisa (acima especificado) onde será realizado testes de repelência. Estes experimentos serão realizados aplicando o repelente sobre a pele, e serão submetidos a uma área com uma alta densidade de mosquitos e comparados com indivíduos não tratados.

2. RISCOS:

Estudos já confirmaram que o óleo essencial de *P. aduncum* apresenta uma baixa toxicidade, estando dentro da margem de precauções à saúde humana. Reações locais severas (inchaço extremo) à picada de mosquitos são muito incomuns e choque anafilático é extremamente raro.

3. PRECAUÇÕES PARA MINIMIZAR OU ELIMINAR RISCOS:

Estes produtos serão testados contra mosquitos criados em laboratório, observando o momento do contato do mosquito com a formulação. Este procedimento permite que não haja risco algum para o indivíduo de contrair malária durante os testes.

4. BENEFÍCIOS POTENCIAIS E COMPENSAÇÃO:

Você não receberá e nem terá benefício pessoal ao participar deste estudo. Todo o cuidado médico prestado a você em caso de problemas de saúde relacionados às atividades do estudo será fornecido gratuitamente. Não há custo para você participar deste estudo.

5. CUIDADO MÉDICO PARA DANOS À SAÚDE RELACIONADOS AO ESTUDO:

Se você apresentar qualquer problema de saúde como resultado direto da sua participação no estudo, terá atendimento médico gratuito. Antes de participar deste estudo, discuta com o investigador principal todos os problemas inerentes a sua participação.

6. CONFIDENCIALIDADE:

Você não será identificado pelo nome em nenhum relatório ou apresentação dos resultados sem a sua permissão. As informações serão arquivadas durante 5 anos após o término do trabalho para futuras notificações sobre sua participação no mesmo.

7. PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:

Sua participação neste estudo é inteiramente voluntária e você pode desistir de participar em qualquer momento sem nenhuma penalidade ou perda de benefícios a que você faça jus. Se você decidir não participar ou sair do estudo, mesmo assim terá assistência médica. Você receberá uma cópia deste termo de consentimento.

8. PONTOS DE CONTATO:

Se você quiser ou precisa falar com alguém acerca deste estudo ou se você necessitar de assistência de saúde por participar do mesmo, você poderá contactar o Dr. Wanderli Pedro Tadei Orientador/ Erika de Oliveira Gomes Mestranda, INPA, (92) 3642-3435/9112-9416, Av. André Araújo n.2936, Aleixo, Manaus-Amazonas. Se você concorda em participar deste estudo, assine abaixo.

Se você concorda em participar deste estudo, assine abaixo.

Nome (letra de forma)

Data

Assinatura

Nome de testemunha (letra de forma)

Data

Assinatura da testemunha

Assinatura do Coordenador

Data

Nota: Cópias assinadas deste termo devem ter o seguinte destino: a) retida e arquivada pelo Coordenador, b) dada ao participante, e c) guardada no prontuário médico do paciente (quando for o caso).

ANEXO B - Formulário para realização do Teste de Repelência

Indivíduo:

Data do teste:

Nº:

Espécie testada:

Tempo de exposição (3 min)	Intervalo (30 min)	Nº de Picadas (braço controle)	Nº Picadas (braço tratado)
18:00-18:03	18:33		
Tempo de exposição (3 min)	Intervalo (30 min)	Nº de Picadas (braço controle)	Nº Picadas (braço tratado)
18:33-18:36	19:06		
Tempo de exposição (3 min)	Intervalo (30 min)	Nº de Picadas (braço controle)	Nº Picadas (braço tratado)
19:06-19:09	19:39		
Tempo de exposição (3 min)	Intervalo (30 min)	Nº de Picadas (braço controle)	Nº Picadas (braço tratado)
19:39-19:42	20:12		
Tempo de exposição (3 min)	Intervalo (30 min)	Nº de Picadas (braço controle)	Nº Picadas (braço tratado)
20:12-20:15	20:45		
Tempo de exposição (3 min)	Intervalo (30 min)	Nº de Picadas (braço controle)	Nº Picadas (braço tratado)
21:45-21:48	22:18		
Tempo de exposição (3 min)	Intervalo (30 min)	Nº de Picadas (braço controle)	Nº Picadas (braço tratado)
22:18-22:21	23:18		

ANEXO C – Formulário Prova de Parede

FORMULÁRIO PROVA BIOLÓGICA DE PAREDE - Painéis									
Espécie Testada:					Nº da Prova:				
Modo de coleta dos espécimes:									
Alimentação:									
Local de coleta:					Temperatura inicial do				
Data da Prova:					Umidade inicial do Teste:				
Hora:									
Dias após a aplicação:									
Superfície testada:									
Mosquitos Expostos									
CONE	Nº Cone	Nº Mosquitos testados	Tempo Exposição		Vivos após 30 min	Caídos após 30 min	Leitura 24 horas após exposição		% Mort
			Início	Término			Vivos	Mortos	
Painel 1									
Painel 2									
Painel 3									
Painel 4									
Painel 5									
Painel 6									
Painel 7									
Painel 8 (Controle)									
Prova realizada por:									
Temperatura Final do Teste:									
Umidade Final do Teste:									

ANEXO D – Formulário Contato tópico

FORMULÁRIO PROVA BIOLÓGICA DE CONTATO TÓPICO												
Espécie Testada:						Nº da Prova:						
Modo de coleta dos espécimes:												
Alimentação:						Temperatura inicial do Teste:						
Local de coleta:						Umidade inicial do Teste:						
Data da Prova e Exposição:												
Hora:												
Superfície testada:												
Gaiola circular	Nº Mosquitos testados	Mortos no início do teste	Mortalidade após o contato tópico								% Mort	
Gaiola	1											
	2											
	3											
Gaiola	4											
	5											
	6											
Gaiola	7											
	8											
	9											
Gaiola	10											
	11											
	12											
Gaiola	13											
	14											
	15											
Gaiola	16											
	17											
	18											
Gaiola	19											
	20											
	21											
Gaiola	22											
(Controle)												
Prova realizada por:												
Temperatura Final do Teste:												
Umidade Final do Teste:												

ANEXO E – Aprovação do Comitê de Ética – CEP/INPA



PARECER CONSUBSTANCIADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS COM SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO DO PROTOCOLO

Protocolo de Pesquisa nº:	033-10	Data de entrada:	19.10.10
Título do Projeto:	Avaliação do potencial de repelência e do efeito sinérgico do dilapiol associado à piretróides, em um sistema nanoestruturado, utilizando <i>Anopheles darlingi</i> (DIPTERA: CULICIDAE), Manaus/AM, Brasil.		
Áreas do Conhecimento:	4. Ciências da Saúde		
Grupo Temático:	Grupo III		
Data de Início:	Dez-10	Data de Término:	Out-12
Valor Orçamento:	R\$ 36.352,24		
Pesquisador Responsável:	Erika de Oliveira Gomes		
Financiamento Aprovado:	Não:	Sim:	x
Submetido:	Não:	Sim:	
Órgão Financiador	CNPq/FAPEAM/CAPES		
Currículos no CNPq:	sim		
Currículos anexos ao Projeto:	sim		
Instituição Responsável:	INPA		
Resumo do Projeto:	<p>Sobre o controle da malária na Amazônia, um aspecto relevante trata-se do estudo de substâncias biologicamente ativas, com propriedades inseticidas. Estas possuem grande potencial para o controle, especialmente aquelas com atividade larvívora e adultívora, pelo fato de substituir o uso de inseticidas químicos que, frequentemente, mostram efeitos colaterais, quando utilizados rotineiramente como pesticidas na agricultura. Dentre os efeitos colaterais indesejáveis, estão os distúrbios sensoriais cutâneos, hipersensibilidade, neurite periférica, irritante de mucosas, entre outros. Em decorrência da crescente resistência dos mosquitos aos produtos químicos sintéticos, há a necessidade de alternativas mais eficazes, que minimizem os inconvenientes causados à saúde humana e os danos ao meio ambiente. Estudos revelaram que dentre as piperáceas da Amazônia, a Pimenta de Macaco - <i>Piper aduncum</i> L., é uma excelente produtora de óleo essencial, apresentando como componente majoritário o fenilpropanóide – dilapiol. Alguns estudos mostram que esta substância é um agente sinérgico de inseticidas sintéticos. Neste cenário a Nanotecnologia pode atuar como uma ferramenta poderosa para o desenvolvimento de sistemas nano-estruturados que permita a veiculação destes óleos essenciais ativos, associados aos piretróides de forma especial a exibir uma liberação sustentada e mais lenta, garantido uma alta ação específica. Esta abordagem tem sido usada com sucesso na veiculação de inúmeros ativos nas mais diferentes áreas da saúde. Sendo assim, este projeto de pesquisa propõe o desenvolvimento de</p>		

Recebido
Erika de Oliveira Gomes
13/12/2010

novos sistemas de liberação para fármacos e óleos essenciais inseticidas aplicados a área da saúde voltada para infectologia. Destacando-se: malária, Leishmaniose, dengue e outras doenças do gênero, aprofundando os estudos nesta área e expandindo-os para as novas tecnologias usando fotoprocessos e nanotecnologia na veiculação de fármacos clássicos e fotoativos.

PALAVRAS CHAVE (máximo de 6):	Controle vetorial, Inseticida, Sinergismo, malária.
---	---

OBJETIVOS (CONFORME PROJETO DE PESQUISA)

OBJETIVOS	METAS	Indicador Quantitativo
1. Utilizar a nanotecnologia no <i>design</i> de novos sistemas de veiculação para óleos essenciais associados aos piretróides, maximizado a ação sinérgica dos mesmos	1. Elaborar nanocápsulas para liberação lenta dos compostos associados.	Nova formulação de inseticida
2. Avaliar a associação de compostos fotossensíveis nanoestruturados, usados atualmente no tratamento do câncer através de processos fotodinâmicos, para serem utilizados juntamente com os novos inseticidas contra a malária.	1. Associar compostos fotossensíveis nanoestruturados contra mosquitos vetores de doenças tropicais.	Outra nova formulação de inseticida
3. Comparar a ação do poder residual de diferentes dos compostos.	1. Especificar a quantidade necessária para o efeito satisfatório da mortalidade.	Normas de uso dos inseticidas
4. Avaliar o potencial de repelência do Dilapiol	1. Especificar o tempo e a quantidade de exposição necessária para o efeito do dilapiol como repelente.	Dados percentuais de repelência
5. Avaliar da citotoxicidade e especificidade <i>in vitro</i>	1. Verificar a ação das partículas menores que causam efeitos adversos comparado a partículas de escala normal, devido ao maior alcance da área.	Valores de DL ₅₀

PARECER FINAL

Após análise por pareceristas e membros do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do INPA, informo-lhe que seu protocolo teve a indicação de APROVAÇÃO.



Indicação: APROVAR
Comentários: O protocolo atende as exigências da Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares.

Informo-lhe que deverá apresentar ao CEP-INPA, ao final da pesquisa, cópia do trabalho previsto como produto do projeto, que servirá como relatório de conclusão da pesquisa. Assim, e conforme cronograma apresentado no protocolo, solicitamos que a mesma seja entregue até JANEIRO/2013.

Data de liberação do Parecer: 09/12/10 na 66ª Reunião Ordinária do CEP-INPA.

Atenciosamente,


Dra. Sirely de Souza Costa
Coordenadora do CEP-INPA
PO nº 246/2009