

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

RAFAEL LOPES FERREIRA

**AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO E DETERMINAÇÃO DA
CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL₅₀) DA ESPÉCIE BOTÂNICA
Ruta graveolens L. E DO FÁRMACO NITAZOXANIDA EM VETOR
DAS PRINCIPAIS ARBOVIROSES NO BRASIL, *Aedes aegypti*.**

DISSERTAÇÃO

**CURITIBA
2018**

RAFAEL LOPES FERREIRA

**AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO E DETERMINAÇÃO DA
CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL₅₀) DA ESPÉCIE BOTÂNICA
Ruta graveolens L. E DO FÁRMACO NITAZOXANIDA EM VETOR
DAS PRINCIPAIS ARBOVIROSES NO BRASIL, *Aedes aegypti*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), como requisito à obtenção do título de mestre em Ciências e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius de Liz
Coorientadora: Dra. Tatiana Zuccolotto

CURITIBA
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F383a Ferreira, Rafael Lopes
2018 Avaliação de crescimento e determinação da concentração letal média (cl 50) da espécie botânica ruta graveolens l. e do fármaco nitazoxanida em vetor das principais arboviroses no brasil, aedes aegypti / Rafael Lopes Ferreira.-- 2018.
71 f.: il.; 30 cm.

Disponível também via World Wide Web
Texto em português, com resumo em inglês
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2018
Bibliografia: p. 62-71

1. Bioensaio. 2. Dengue. 3. Pragas - Controle biológico. 4. Vetores de doenças - Controle. 5. Tecnologia ambiental - Dissertações. I. Liz, Marcus Vinícius de, orient. II. Zuccolotto, Tatiana, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, inst. IV. Título.

CDD: Ed. 22 -- 363.7

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 107

A Dissertação de Mestrado intitulada AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL₅₀) DA ESPÉCIE BOTÂNICA (*Ruta graveolens* L.) E DO FÁRMACO NITAZOXANIDA EM VETOR DAS PRINCIPAIS ARBOVIROSES NO BRASIL, *Aedes aegypti*, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Rafael Lopes Ferreira**, no dia 04 de setembro de 2018, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, área de concentração Tecnologias E Processos Ambientais, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

BANCA EXAMINADORA:

Prof(a). Dr(a). Marcus Vinícius de Liz - Presidente - UTFPR

Prof(a). Dr(a). Cibelle de Borba Dallagassa – PUC-PR

Prof(a). Dr(a). Gustavo Henrique Couto – UTFPR

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 04 de setembro de 2018.

Carimbo e Assinatura do(a) Coordenador(a) do Programa

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram na realização deste presente estudo, em especial ao professor Fontana por todo conhecimento transmitido.

Aos colegas de laboratório, Angelica, Barby, Ju e Léo e as minhas “madrinhas” (segundo professor Fontana), Cibelle e Tati, pelos momentos de descontração no laboratório.

A todos muito obrigado!

“Kylospa !”
(Fontana, 2017)

RESUMO

FERREIRA, Rafael Lopes. **Avaliação de crescimento e determinação da concentração letal média (CL₅₀) da espécie botânica *Ruta graveolens* L. e do fármaco nitazoxanida em vetor das principais arboviroses no Brasil, *Aedes aegypti***. 71 f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

O *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) apresenta distribuição mundial, em especial nas regiões tropicais e subtropicais, e constitui um grande problema de saúde pública, uma vez que é o principal vetor de inúmeras arboviroses. A dengue é uma das doenças virais mais importantes entre as transmitidas por mosquitos, devido à dispersão geográfica significativa do vírus e seu vetor em zonas anteriormente não afetadas. Torna-se, portanto, primordial a busca de novas formas de combate ao mosquito, já que o *Ae. aegypti* tem adquirido resistência a inseticidas químico-sintéticos em decorrência de sua utilização excessiva. O presente estudo tem por objetivo apresentar estratégia para acelerar o ciclo de vida do *Ae. aegypti* com adição de alimentos e insumos como água de coco, leite e caseína do leite obtida por precipitação isoelétrica. O estudo objetiva, ainda, determinar a concentração letal média (CL₅₀) da espécie botânica *Ruta graveolens* L. e do fármaco nitazoxanida, afim de avaliar a toxicidade e a letalidade na fase larval do vetor *Ae. aegypti*, provocada pela ação de seus respectivos extratos etanol. Os bioensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando o procedimento padrão da Organização Mundial da Saúde (OMS), com larvas de *Ae. aegypti* no 3º instar. Como resultado foi possível acelerar com sucesso a ecdise de *Ae. aegypti* se utilizando das fontes alimentares lácteas e água de coco. Em relação a determinação da CL₅₀, o estudo utilizando-se de larvas de terceiro instar do mosquito, demonstrou que após 24 h de exposição, a CL₅₀ da nitazoxanida foi de 10 mg.mL⁻¹ e de *Ruta graveolens* foi de 30 mg.mL⁻¹.

PALAVRAS CHAVE: Bioensaio, Dengue, Ecdise, Sinergismo, Vetor biológico.

ABSTRACT

FERREIRA, Rafael Lopes. **Growth evaluation and determination of the average lethal concentration (LC₅₀) of the botanical species *Ruta graveolens* L. and the drug nitazoxanide in vector of the main arboviruses in Brazil, *Aedes aegypti*.** 71 f. Masters dissertation. Postgraduate Program in Environmental Science and Technology. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) has a worldwide distribution, especially in the tropical and subtropical regions, and is a major public health problem, since it is the main vector of numerous arboviruses. Dengue is one of the most important mosquito-borne viral diseases due to the significant geographical spread of the virus and its vector in previously unaffected areas. Therefore, the search for new forms of mosquito control is essential, since *Ae. aegypti* has acquired resistance to chemical-synthetic insecticides due to its excessive use. The present study aims to present a strategy to accelerate the life cycle of *Ae. aegypti* with addition of food and inputs such as coconut water, milk and milk casein obtained by isoelectric precipitation. The objective of this study was to determine the average lethal concentration (LC₅₀) of the botanical species *Ruta graveolens* L. and the drug nitazoxanide in order to evaluate the toxicity and lethality in the larval phase of *Ae. aegypti*, caused by the action of their respective ethanol extracts. Cytotoxicity bioassays were performed using the standard procedure of the World Health Organization (WHO), with *Ae. aegypti* in the 3rd instar. As a result it was possible to successfully accelerate *Ae. aegypti* if using dairy food sources and coconut water. Regarding the determination of LC₅₀, the study using third instar larvae of the mosquito showed that after 24 h of exposure, the LC₅₀ of nitazoxanide was 10 mg.mL⁻¹ and *Ruta graveolens* was 30 mg.L⁻¹.

KEY WORDS: Bioassay, Dengue, Ecdise, Synergism, Biological vector.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do Temefós (composto organofosforado).	25
Figura 2: Estrutura química da Cipermetrina (composto piretroide).	26
Figura 3: Distribuição geográfica de <i>Cocos nucifera</i> L.	32
Figura 4: <i>Ruta graveolens</i> L.	34
Figura 5: Estrutura química da nitazoxanida.	36
Figura 6: Papel filtro com ovos da cepa Rockefeller de <i>Ae. aegypti</i>	40
Figura 7: Recipiente contendo solução nutritiva.....	40
Figura 8: Esquema dos bioensaios com larvas de <i>Aedes aegypti</i>	46
Figura 9: Monitoramento numérico de todas as formas de <i>Ae. aegypti</i> no dia 7 após a eclosão quando alimentado com os 4 tipos de leites, precipitado de caseína e água de coco.....	47
Figura 10: Estrutura química da chalepensina.	56
Figura 11: Espectro 1 – Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do grupo III com os sinais integrados para Rg-D1.....	57
Figura 12: Espectro 2 – Mapa de correlação de HSQC (400 MHz, CDCl ₃) da substância Rg-D1.....	58
Figura 13: Espectro 3 – Mapa de correlação de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) da substância Rg-D1.....	58
Figura 14: Espectro 4 - Experimento (+)-ESI HRMS do grupo III evidenciando o íon de <i>m/z</i> 255,1053 de Rg-D1.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Constituintes do leite.	30
Tabela 2: Caracterização físico-química da água-de-coco anão verde com 7 meses de idade.	33
Tabela 3: Fontes alimentares utilizados nos ensaios de crescimento do <i>Ae. aegypti</i>	41
Tabela 4: Fracionamento dos constituintes da fração diclorometano (Rg-D).....	43
Tabela 5: Concentrações para determinação da CL ₅₀ e atividade larvívica de nitazoxanida (2,5 mg.mL ⁻¹)... ..	46
Tabela 6: Concentrações para determinação da CL ₅₀ e atividade larvívica de <i>Ruta graveolens</i> (50 mg.mL ⁻¹).....	46
Tabela 7: Concentrações para determinação da CL ₅₀ e atividade larvívica das frações do extrato etanol bruto de <i>Ruta graveolens</i>	46
Tabela 8: Informações nutricionais dos Leite Ninho. 200 mL (1 copo).....	49
Tabela 9: Mortalidade das larvas do mosquito <i>Ae. aegypti</i> após 24 h de exposição em diferentes concentrações de extrato etanol bruto de nitazoxanida 2,5 mg.mL ⁻¹ ..	50
Tabela 10: Mortalidade das larvas do mosquito <i>Ae. aegypti</i> após 24 h de exposição em diferentes concentrações de extrato etanol bruto de <i>Ruta graveolens</i>	53
Tabela 11: Mortalidade das larvas do mosquito <i>Ae. aegypti</i> após 24 h de exposição em diferentes concentrações da fração hexano (Rg-H) do extrato etanol bruto de <i>Ruta graveolens</i>	53
Tabela 12: Mortalidade das larvas do mosquito <i>Ae. aegypti</i> após 24 h de exposição em diferentes concentrações da fração diclorometano (Rg-D) do extrato etanol bruto de <i>Ruta graveolens</i>	53
Tabela 13: Mortalidade das larvas do mosquito <i>Ae. aegypti</i> após 24 h de exposição em diferentes concentrações da fração acetato de etila (Rg-Ae) do extrato etanol bruto de <i>Ruta graveolens</i>	53

Tabela 14: Mortalidade das larvas do mosquito <i>Ae. aegypti</i> após 24 h de exposição em diferentes concentrações da fração aquosa (Rg-Aq) do extrato etanol bruto de <i>Ruta graveolens</i>	54
Tabela 15: Mortalidade das larvas do mosquito <i>Ae. aegypti</i> após 24 h de exposição em diferentes concentrações do grupo III proveniente da fração diclorometano (Rg-D) do extrato etanol bruto de <i>Ruta graveolens</i>	54
Tabela 16: Mortalidade das larvas do mosquito <i>Ae. aegypti</i> após 24 h de exposição em diferentes concentrações do grupo IV proveniente da fração diclorometano (Rg-D) do extrato etanol bruto de <i>Ruta graveolens</i>	54
Tabela 17: Dados de RMN e ^1H , ^{13}C , HMBC de Rg-D1 em comparação com literatura....	57

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP - Trifosfato de adenosina.

B.O.D - Demanda Bioquímica de Oxigênio

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CHIKV - Febre chikungunya

CL - Concentração letal

DEN – Dengue

LQBB - Laboratório de Químio/Biotecnologia de Biomassas

MAYV - Febre mayaro

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde

PFOR - Piruvato-ferredoxina oxiredutase

RE - Reticulo endoplasmático

RIISPOA - Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

SE - Semana Epidemiológica

UFPR - Universidade Federal do Paraná

UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná UTFPR

ZIKV - Vírus da Zika

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo Geral	18
3.2 Objetivos específicos	18
4 REFERENCIAL TEÓRICO	19
4.1 <i>Aedes aegypti</i>	19
4.2 Etiologia das doenças	20
4.2.1 Dengue.....	20
4.2.2 Febre amarela	22
4.2.3 Febre Chikungunya (CHIKV).....	22
4.2.4 Febre Mayaro (MAYV).....	24
4.2.5 Zika (ZIKV)	24
4.3 Métodos de controle do <i>Aedes aegypti</i>	25
4.3.1 Controle químico	25
4.3.2 Controle com extratos vegetais	27
4.3.3 Controle biológico.....	28
4.4 Características Físico Químico do Leite	29
4.4.1 Proteínas do Leite: Caseína	31
4.5 <i>Cocos nucifera</i> L.	32
4.6 <i>Ruta graveolens</i> L.	34
4.7 Nitazoxanida.....	36
5 METODOLOGIA	37
5.1 Obtenção das larvas	37
5.2 Obtenção dos produtos para crescimento e controle do <i>Ae. aegypti</i>	38
5.3 Fontes alimentares para acelerar o desenvolvimento de larvas recém-eclodidas de <i>Ae. Aegypti</i>	38
5.3.1 Teste nutricional para crescimento do <i>Ae. aegypti</i>	39
5.4.1 Obtenção do extrato bruto etanol do fármaco	41
5.4.2 Preparo do extrato etanol bruto e frações de <i>R. graveolens</i>	41
5.4.3 Fracionamento, identificação e determinação estrutural dos constituintes químicos de <i>R. graveolens</i>	42

5.4.3.1 <i>Fracionamento do extrato bruto</i>	42
5.4.3.2 <i>Identificação e determinação estrutural dos constituintes químicos</i>	43
5.5 Determinação da CL ₅₀ e avaliação da atividade larvica	45
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6.1 Resultado do teste nutricional	47
6.2 Determinação da CL ₅₀ e da atividade larvica dos extratos etanol brutos de nitazoxanida e <i>R. graveolens</i>	50
6.2.1 Nitazoxanida.....	50
6.2.2 <i>Ruta graveolens</i>	52
6.2.2.1 <i>Identificação e determinação estrutural do composto Rg-D1</i>	55
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

As doenças emergentes caracterizam-se, em geral, pela sua gravidade e potencialidade em deixar sequelas ou, até mesmo, de levar o paciente ao óbito, impactando de forma significativa em uma determinada população (ROBERTO E PEDROSO, 2009). Nestes casos, a incidência de pacientes acometidos tende a aumentar rapidamente em frequência, gerando problemas de saúde pública, como é o caso das arboviroses¹. No Brasil, as arboviroses de maior circulação são Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV), Febre Amarela (FAV), Zika (ZIKV) e Mayaro (MAYV) e são transmitidas por mosquitos flebotomíneos² como *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (HIGGS E BEATY, 2005).

Com a crescente incidência da dengue nas últimas décadas e o risco de reurbanização da febre amarela, são necessárias estratégias efetivas e eficientes para o enfrentamento desses complexos processos eco epidemiológicos pelos serviços de saúde pública no Brasil (ZARA et al., 2016).

Devido ao fato do *Ae. aegypti* ser um mosquito oportunista, que vive dentro e ao redor dos domicílios ou em locais com bastante movimentação de pessoas, o controle da disseminação das doenças relacionadas ao mosquito está diretamente relacionada ao controle de seus criadouros afim que seus ovos cheguem a fase adulta (JANSEN, 2010; INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2018). E, portanto, a redução do número criadouros, onde as fêmeas adultas depositam seus ovos, faz parte do incentivo por parte do governo, afim de reduzir a população de mosquitos adultos (BRASIL, 2001).

Diversas tecnologias têm sido desenvolvidas como alternativas no controle do *Aedes aegypti*, utilizando-se isoladamente ou em combinação de diferentes mecanismos de ação, afim de obter maior efetividade. Entre estes podemos citar o monitoramento seletivo da infestação, medidas sociais, dispersão de inseticidas,

¹ Os arbovírus compreendem um conjunto de vírus que se replicam em artrópodes e podem ser transmitidos à hospedeiros vertebrados (CAMPOS et al.,2018).

² Os flebotomíneos são insetos pequenos, de cor amarelada e pertencem à ordem Diptera, mesmo grupo das moscas, mosquitos, borrachudos e maruins; apresentam um par de asas e um par de pequenas estruturas, chamados de halteres ou balancins, responsáveis pela estabilidade do voo e o zumbido característico dos dípteros. No Brasil, esses insetos podem ser conhecidos por diferentes nomes de acordo com sua ocorrência geográfica, como tatuquira, mosquito palha, asa dura, asa branca, cangalhinha, birigui, anjinho, entre outros (FIOCRUZ, 2013).

novos agentes de controle biológico e técnicas moleculares para controle populacional dos mosquitos (ZARA et al., 2016).

Tradicionalmente, a principal estratégia para o controle do *Aedes aegypti* tem sido o uso intensivo de inseticidas para a eliminação do mosquito adulto ou de suas larvas. Para o combate ao adulto, utilizam-se com mais frequência os inseticidas organofosforados e piretroides, geralmente durante as epidemias de dengue. No controle de larvas, o principal larvicida empregado há décadas no país é o composto, organofosforado, temefós (LIMA et al., 2006).

Neste sentido, a necessidade e procura por métodos alternativos de controle do vetor precisam ser pesquisados utilizando plantas que possuem bioativos com efeitos tóxicos para insetos, explorando a biodiversidade de espécies encontradas no território brasileiro. Uma das alternativas é a utilização do óleo essencial extraído de plantas, os quais são incluídos em formulações caseiras ou colocados no mercado de forma artesanal para repelir mosquitos hematófagos (BUENO; ANDRADE, 2010). O uso de maneira combinada dos extratos de duas ou mais plantas pode servir como alternativa no combate ao *Aedes aegypti*, pois pode levar a um efeito larvicida maior, já que as plantas possuem metabólitos secundários com mecanismos bioquímicos de ação diferentes e então atuantes negativamente no ciclo morfogênético do inseto (GRZYBOWSKI et al., 2011).

As prioridades para o objeto em estudo foram o desenvolvimento de formas de aceleração dos estágios larvais do *Ae. aegypti* para bioensaios mais rápidos, juntamente com avaliação de novas substâncias com potencial larvicida.

2 JUSTIFICATIVA

O tema de pesquisa proposto – fontes alimentares para acelerar o desenvolvimento de larvas recém-eclodidas de *Ae. aegypti* e apresentar alternativas para o controle do vetor das principais abovíroses no Brasil, *Aedes aegypti*. – é relevante para análise porque no período atual, segundo a Organização Pan- Americana da Saúde, (2017) (OPAS/OMS) os mosquitos matam cerca de 700 mil pessoas por ano, quando infectados com vírus que causam doenças como chikungunya, dengue e zika, podendo transmiti-las aos seres humanos com uma picada. Já no Brasil, segundo o boletim epidemiológico 31, no período de (31/12/2017 a 09/06/2018), foram registrados 161.154 casos prováveis de dengue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

A propagação geográfica dos vetores e dos vírus conduziu a ressurgência global da dengue epidêmica e a emergência da febre hemorrágica nos últimos 25 anos, com o desenvolvimento da hiperendemicidade em muitos centros urbanos, sendo que dos 50 milhões de casos de infecções que ocorrem por ano, aproximadamente, 500 mil são da febre hemorrágica (MENDONÇA et al., 2009).

As estratégias de controle das doenças transmissíveis por vetores biológicos são de difícil execução, principalmente quando associadas à existência de reservatórios domésticos e silvestres (MACIEL et al., 2010). O uso indiscriminado de substâncias inseticidas podem levar à resistência do mosquito a estes compostos, inviabilizando o controle por essa estratégia de ação. Na realidade, observa-se, tanto deficiências no controle do *Aedes aegypti* determinadas por falhas operacionais de campanha, como pela existência de populações de *Aedes aegypti* resistentes ao temefós, indicando a necessidade da realização de investigações e de monitoramento da resistência para melhor manejo das ações de controle (LIMA et al., 2006).

Além da importância do tema proposto, a intenção desta pesquisa é ampliar o conhecimento sobre a aceleração no crescimento do *Ae. aegypti*, através de fontes alimentares, além de promover o controle do vetor através de testes de letalidade, utilizando-se dessa espécie botânica e o uso de um fármaco. As evidências empíricas obtidas através dos ensaios fitoterápicos se tornam necessárias quando consideramos que ela não é utilizada em larga escala nas regiões endêmicas.

A prioridade para a vertente deste estudo é o desenvolvimento de novas alternativas, afim de um controle mais amplo das populações de mosquitos. Devido

ao fato do vetor ter papel fundamental na transmissão da dengue, e outras doenças, vem à tona a necessidade de delineamento de futuras pesquisas para o isolamento e identificação de princípios ativos, úteis para o planejamento de novos produtos com atividade inseticida.

De modo geral, a escolha do tema justifica-se, devido ao fato desta espécie poder desenvolver o seu ciclo em até 12 dias à temperatura ambiente, desde o primeiro contato permanente entre ovos viáveis e água até o último estágio de crescimento larval, além de apresentar resistência aos produtos químico-sintéticos atualmente empregados em seu controle (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Neste sentido, afim de prover bioensaios mais rápidos em épocas de surto epidemiológico, torna-se indispensável acelerar o crescimento das larvas originadas a partir da eclosão dos ovos de cepas Rockefeller de *Ae. aegypti*. Torna-se necessário também, verificar a avaliação de novas substâncias com potencial larvicida nas condições mais próximas àquelas encontradas no hábitat do mosquito, tornando-se importante para aplicação de medidas sobre a utilização de inseticidas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o uso de fontes alimentares para acelerar o desenvolvimento de larvas recém-eclodidas de *Ae. aegypti* e determinar a concentração letal média (CL₅₀) da espécie botânica *Ruta graveolens* L. e do fármaco nitazoxanida frente às cepas do vetor em estudo.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a taxa de crescimento das larvas de *Ae. aegypti* utilizando três tipos de leite em embalagens longa vida de 1 L: (Ninho[®] Integral, Nestle-Brasil), (Ninho[®] Leve, Nestle-Brasil) e (Ninho[®] Zero Lactose, Nestle-Brasil);
- Avaliar a taxa de crescimento das larvas de *Ae. aegypti* utilizando caseína de leite obtida por precipitação isoelétrica;
- Avaliar a taxa de crescimento das larvas de *Ae. aegypti* utilizando água de coco verde (*Cocos nucifera* L.);
- Avaliar a bioatividade dos extratos etanol bruto de *Ruta graveolens* L. e do fármaco nitazoxanida, frente às cepas de *Ae. aegypti*;
- Calcular a concentração letal média, CL₅₀, dos extratos a partir dos testes de toxicidade.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 *Aedes aegypti*

Segundo o Instituto Oswaldo Cruz (2017a), o mosquito transmissor da dengue *Aedes aegypti*, originário do Egito, na África, vem se espalhando pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta desde o século XVI, inicialmente por meio de navios que traficavam escravos. Os primeiros casos de dengue no Brasil datam do final do século XIX. O mosquito já era considerado um problema no início de século XX, devido a transmissão da febre amarela urbana. Com resultados de medidas para controle da doença, em 1955 foi erradicado o *Aedes aegypti* no Brasil. No entanto, no final da década de 1960, foi verificado que o vetor estava presente novamente em território nacional. Hoje, o mosquito é encontrado em todos os estados brasileiros.

O *Ae. aegypti* possui três fases muito diferentes de vida: o ovo, a fase aquática (com as etapas de larva e pupa) e a fase adulta, em que o mosquito chega a sua forma alada. O ciclo de vida deste vetor pode variar de acordo com a temperatura (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2017b), disponibilidade de alimentos e quantidade de larvas existentes no mesmo criadouro, uma vez que a competição de larvas por alimento (em um mesmo criadouro com pouca água) consiste em um obstáculo ao amadurecimento do inseto para a fase adulta. A fêmea do mosquito pode dar origem em torno de 1.500 mosquitos durante a sua vida e em condições ambientais favoráveis, após a eclosão do ovo, o desenvolvimento do mosquito até a forma adulta pode levar um período de aproximadamente 10 dias (VIEIRA, 2017a). O mosquito adulto vive aproximadamente 30 dias em condições normais, e durante este período precisa se alimentar. No caso das fêmeas, a alimentação com sangue é necessária como parte do processo de maturação dos ovos (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2017b).

Os maiores índices de infestação pelo *Ae. aegypti* são registrados em bairros com alta densidade populacional e baixa cobertura vegetal, onde o mosquito encontra alvos para alimentação mais facilmente. Outro fator importante para a infestação do mosquito, é a falta de infraestrutura de algumas localidades. Sem fornecimento regular de água, a população armazena o suprimento em grandes recipientes, que na maioria das vezes não recebem os cuidados necessários e, por não serem completamente vedados, acabam tornando-se focos deste vetor (VIEIRA, 2017a).

Segundo a Fundação Nacional da Saúde (2010), é observado um padrão sazonal de incidência coincidente com o verão, devido à maior ocorrência de chuvas e ao aumento da temperatura nessa estação. O *Ae. aegypti* é um mosquito antropofílico, isto é, ele vive perto do homem. Sua presença é mais comum em áreas urbanas, onde a quantidade de criadouros naturais ou resultantes da ação do ser humano é maior. Nestes locais, as fêmeas têm mais oportunidades para alimentação e dispõem de mais criadouros para desovar, entretanto, a doença pode ocorrer em qualquer localidade, desde que exista população humana suscetível, presença do vetor e o do vírus (FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE 2010; VIEIRA, 2017b).

4.2 Etiologia das doenças

4.2.1 Dengue

A dengue é uma doença infecciosa transmitida por vetores que ameaça a saúde humana em escala global. Por causa da mudança climática, da globalização e de outros fatores, a dengue tem se espalhado cada vez mais para novos países e para áreas maiores, de zonas tropicais a temperadas (XU et al., 2017).

A dengue foi uma das primeiras doenças infecciosas ligadas a um vírus. Embora uma única infecção geralmente não seja fatal (BARNETT, 2017), nem todas as infecções por vírus da dengue causam sintomas (PUJANANDEZ, 2017). Em estudo recente, foi observado que a infecção por mais de um sorotipo aumenta a suscetibilidade aos outros, e a infecção múltipla - dengue grave, também conhecida como febre hemorrágica da dengue - pode ser fatal (BARNETT, 2017).

A dengue é uma doença febril aguda, causada por um vírus RNA (arbovírus do gênero *Flavivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*), que pode ser de curso benigno ou grave, dependendo da forma como se apresenta: infecção inaparente, dengue clássico (DC), febre hemorrágica da dengue (FHD) ou síndrome do choque da dengue (SCD), sendo classificado em quatro sorotipos de vírus de dengue (DEN 1, DEN 2, DEN 3 e DEN 4) (FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE, 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (2017), os quatro vírus da dengue originaram-se entre 100 a 800 anos atrás entre a África e o sudeste da Ásia. A doença permaneceu geograficamente restrita, até meados do século XX, porém o término da segunda guerra mundial e o aumento do transporte de carga, tiveram papel crucial para a disseminação do vírus. A dengue hemorrágica foi documentada pela primeira vez somente na década de 1950 durante as epidemias nas Filipinas e na Tailândia (FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE, 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

Ainda de acordo com a Fundação Nacional da Saúde (2010), atualmente a dengue é a mais importante arbovirose que afeta o ser humano, constituindo-se um sério problema de saúde pública no mundo. A ocorrência e disseminação ocorrem especialmente nos países tropicais, onde as condições ambientais favorecem o desenvolvimento e a proliferação do *Ae. aegypti*, principal mosquito vetor.

A transmissão da dengue se faz pela picada destes mosquitos, no ciclo: ser humano - *Ae. aegypti* - ser humano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE, 2010). O vírus multiplica-se no intestino médio do vetor e infecta outros tecidos chegando finalmente às glândulas salivares. Uma vez infectado, o mosquito torna-se um transmissor enquanto viver (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2017c). Após um repasto de sangue infectado, o mosquito está apto a transmitir o vírus, após 8 a 12 dias de incubação extrínseca. A transmissão mecânica também é possível, quando o repasto é interrompido e o mosquito, imediatamente, se alimenta num hospedeiro susceptível. Não há transmissão por contato direto de um doente ou de suas secreções com pessoa sadia, nem por intermédio de água ou alimento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE, 2010).

4.2.2 Febre amarela

Segundo o Ministério da Saúde (2017a), a febre amarela é uma doença infecciosa febril aguda, imunoprevenível, cujo agente etiológico é transmitido por vetores artrópodes. O vírus da febre amarela apresenta dois ciclos epidemiológicos de transmissão distintos, silvestre e urbano. Do ponto de vista etiológico, clínico, imunológico e fisiopatológico, a doença é a mesma nos dois ciclos.

No ciclo silvestre da febre amarela, os primatas não humanos (macacos) são os principais hospedeiros e amplificadores do vírus, e os vetores são mosquitos com hábitos estritamente silvestres, sendo os gêneros *Aedes* na África e *Haemagogus* e *Sabethes* os mais importantes na América Latina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a), (VASCONCELOS, 2003). Nesse ciclo, o homem participa como um hospedeiro acidental ao adentrar áreas de mata. No ciclo urbano, o homem é o único hospedeiro com importância epidemiológica e a transmissão ocorre a partir de vetores urbanos (*Ae. aegypti*) infectados. A vacina é a principal ferramenta de prevenção e controle da doença.

A febre amarela vem apresentando aspectos irregulares, com tendência estacionária, marcada por períodos endêmicos aqui no Brasil. Os casos se caracterizam como isolados em indivíduos não vacinados, geralmente na região amazônica, intercalados por períodos epizooticos e/ou epidêmicos, quando o vírus afeta principalmente populações de áreas com baixas coberturas vacinais. Na América do Sul, no ano de 2016, foram relatados casos de febre amarela silvestre no Brasil, Peru e Colômbia, tendo como principal região afetada a região amazônica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b).

4.2.3 Febre Chikungunya (CHIKV)

A febre chikungunya (CHIKV) é uma arbovirose causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV), pertencente à família *Togaviridae* e do gênero *Alphavirus*, transmitida principalmente por mosquitos do gênero *Aedes* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015), (COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS, 2017). Após meio século de surtos focais de poliartralgia febril aguda na África e na Ásia, a doença se espalhou inesperadamente na última década com grandes surtos

na África e ao redor do Oceano Índico e transmissão autóctone rara em áreas temperadas (SIMON et al., 2011).

O vírus foi isolado inicialmente na Tanzânia por volta de 1952, desde então, há relatos de surtos em vários países no mundo. A viremia persiste por até dez dias após o surgimento das manifestações clínicas. A transmissão do vírus CHIKV é feita pela picada de fêmeas dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015), (COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS, 2017).

Os sinais e sintomas da febre chikungunya são clinicamente parecidos aos da dengue podendo evoluir em três fases distintas, aguda, subaguda e crônica (COELHO, 2016). O período de incubação é de 1 a 12 dias. Após o período de incubação, inicia-se a fase aguda ou febril, que pode durar até o décimo dia. Alguns pacientes podem evoluir com persistência das dores articulares após a fase aguda, caracterizando o início da fase subaguda, com duração de até três meses. Quando os sintomas persistem além dos três meses atinge a fase crônica. Nestas fases, algumas manifestações clínicas podem variar de acordo com o sexo e a idade. Exantema, vômitos, sangramento e úlceras orais parecem estar mais associados ao sexo feminino, enquanto dor articular, edema e maior duração da febre são mais prevalentes quanto maior a idade do paciente (DUTTA et al., 2012; COELHO, 2016).

Em menos de uma década, o CHIKV se tornou um novo gigante entre as doenças arbovirais, próximo à dengue. Este surgimento é, principalmente, o resultado da convergência evolutiva viral com *Ae. albopictus*. Esta mudança epidemiológica levou à sua expansão global, apoiada pelo transporte mais rápido de viajantes virêmicos (CHIKV) para áreas suscetíveis com atividade de *Aedes* spp. O CHIKV levanta desafios modernos em ciência, assistência ao paciente e saúde pública que devem ser prontamente utilizados para limitar sua atual disseminação rápida e grandes consequências (SIMON et al., 2011).

4.2.4 Febre Mayaro (MAYV)

A Febre Mayaro é uma virose exantemática que acomete populações humanas. Isolado pela primeira vez no ano de 1954 em Trinidad, o vírus Mayaro tem ocasionado casos esporádicos e surtos localizados nas Américas, incluindo a região Amazônica do Brasil, principalmente nos estados das regiões Norte e Centro-Oeste, onde é considerado endêmico (PORTAL DA SAÚDE, 2017b).

O vírus causa uma doença infecciosa febril aguda e pode evoluir com um curso benigno semelhante a dengue. Normalmente após uma ou duas semanas o paciente se recupera completamente. Os principais sintomas da febre mayaro são cefaleia, exantema, mialgias, sendo semelhante a febre do chikungunya, artralgia intensa, acompanhada ou não de edema nas articulações. A lesão pode ser limitante ou incapacitante e durar por meses, quanto a recuperação sendo mais prolongada (PORTAL DA SAÚDE, 2017b; PORTAL DA SAÚDE, 2017c).

4.2.5 Zika (ZIKV)

O vírus Zika é um *flavivírus* transmitido por mosquitos e foi identificado pela primeira vez em macacos, em Uganda no ano de 1947, através de uma rede que monitorava a febre amarela. Em 1952, em Uganda e na República Unida da Tanzânia foi identificado o vírus em humanos. Surtos da doença do vírus da Zika foram registrados na África, nas Américas, na Ásia e no Pacífico. Em 2015, o Brasil notificou uma associação entre a infecção pelo vírus e a microcefalia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

Ainda segundo a OMS, o período de incubação do vírus não é claro e os sintomas são semelhantes aos de outras infecções por arbovírus, como a dengue. Estes incluem, febre, erupções cutâneas, conjuntivite, dores musculares e nas articulações, mal-estar ou dor de cabeça.

O principal modo de transmissão do vírus Zika é por vetor, principalmente, através da picada de um mosquito infectado do gênero *Aedes*. Também é possível que o vírus seja transmitido por via sexual ou transfusões de sangue. Outras possíveis formas de transmissão são a de mãe para filho, por transplantes de órgãos e medula óssea, além de exposição laboratorial (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016;

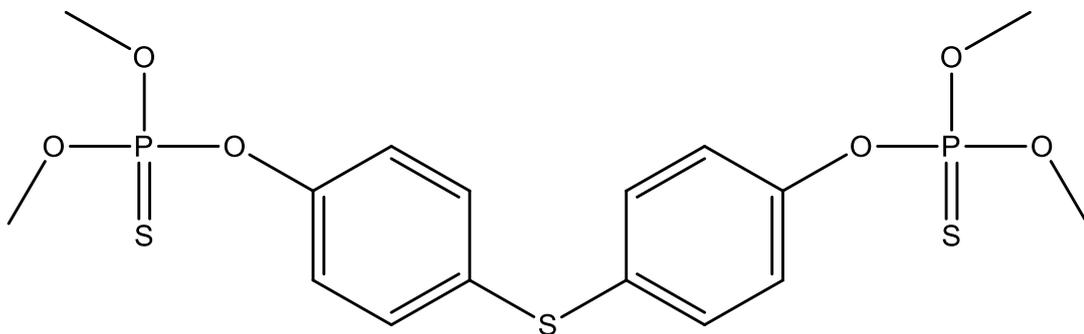
PORTAL DA SAÚDE, 2017a). Apesar do RNA ZIKV ter sido detectado no leite materno, a transmissão através da amamentação ainda não foi demonstrada, reforçando as recomendações atuais de que as mães com infecção por ZIKV devem manter a amamentação para seus bebês. A febre ocasionada pelo vírus Zika é descrita como uma doença febril aguda, autolimitada, tendo duração de 3 a 7 dias, geralmente sem ocorrências de complicações graves, porém, há registro de mortes e manifestações neurológicas, além de microcefalia (PORTAL DA SAÚDE, 2017a).

4.3 Métodos de controle do *Aedes aegypti*

4.3.1 Controle químico

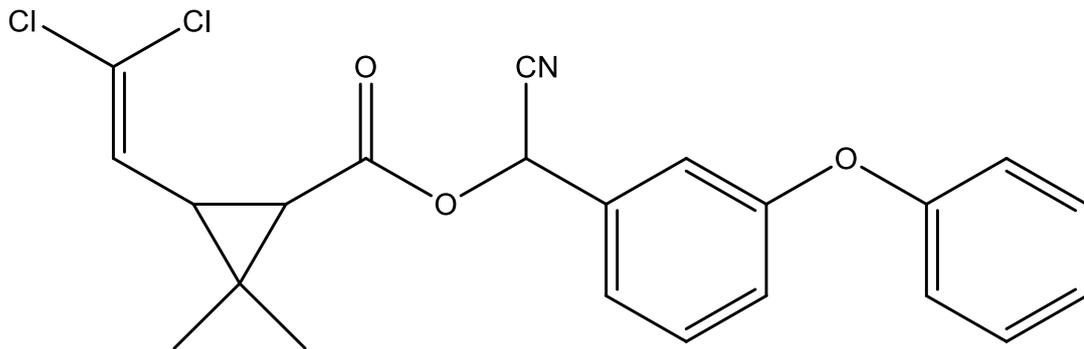
Segundo Pizarro (2013), um dos métodos de controle do *Ae. aegypti* adotados pela Organização Mundial da Saúde, além da higienização e eliminação dos seus viveiros, é a utilização de produtos químicos sintéticos com atividade repelente e inseticida. No Brasil o combate ao *Ae. aegypti* e *Aedes albopictus* envolve algumas vezes o controle químico mediante o uso de produtos inseticidas que pertencem ao grupo dos organofosforados (FIGURA 1) e dos piretróides (FIGURA 2) (FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE, 2001).

Figura 1: Estrutura química do Temefós (composto organofosforado).



Fonte: (O autor, 2018).

Figura 2: Estrutura química da Cipermetrina (composto piretroide).



Fonte: (O autor, 2018).

Esses inseticidas são neurotóxicos, ou seja, são capazes de atuar no sistema nervoso dos insetos, e tiveram seu uso intensificado a partir de 1986, devido as epidemias de dengue (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2017d). Em consequência de décadas de utilização destes inseticidas, como uma das principais formas de controle das arboviroses, houve o aparecimento de populações de *Ae. aegypti* resistentes à estas substâncias (VALLE, OLIVEIRA 2016). Ressalta-se que pelas características de herança genética deste tipo de resistência (fenótipo recessivo), a mutação só aumenta de frequência tão rapidamente se a pressão de seleção for intensa, ou seja, se o uso acentuado de piretroides nos últimos anos tem selecionado populações de mosquitos resistentes (VALLE, MARTINS 2011.) A literatura científica descreve vários exemplos de disseminação rápida da resistência a inseticidas em decorrência de sua utilização excessiva. Notadamente, o uso doméstico de inseticidas comercializados em mercados, normalmente exacerbado em períodos epidêmicos, em muito contribuiu para a rápida disseminação da resistência aos piretroides (VALLE, OLIVEIRA 2016). Ainda segundo os autores, o controle químico com uso de larvicidas é recomendado como ferramenta complementar de controle vetorial, sendo aplicado apenas nos criadouros que não possam ser eliminados. Ao contrário, o controle químico do vetor adulto não deve ser usado na rotina, não é preventivo e, como mencionado acima, somente é indicado de forma localizada para bloqueio de surtos e em pontos estratégicos.

4.3.2 Controle com extratos vegetais

A utilização de espécies botânicas para a produção de fitolarvicidas surge como uma alternativa aos produtos químicos sintéticos, como os organofosforados e piretroides, pois tem se observado o surgimento da seleção de populações de *Ae. aegypti* resistentes devido ao uso destes compostos (ACIOLE, 2009). Embora sésseis, os vegetais desenvolveram inúmeros mecanismos de respostas específicas a estresses variados (SOARES, MACHADO, 2007), entre estes, a produção de metabólitos secundários que agem como compostos de defesa química para as espécies vegetais que os produzem, auxiliando nos processos adaptativos e de manutenção destas espécies nos ambientes em que vivem (HARTMANN, 1996; WINK, 2003; GOBBO-NETO, 2007).

As atividades biológicas de uma espécie vegetal, normalmente, são atribuídas aos diversos compostos químicos presentes, e não a um único componente e nem a um único mecanismo de ação. Esta diversidade de compostos químicos pode atingir vários alvos simultaneamente, levando a um importante sinergismo na atividade biológica (SHEWRY, LUCAS, 1997). Nesse sentido a segurança e eficácia dos produtos químicos sintéticos com poder repelente e inseticida, tem sido confrontada com o surgimento de novos produtos de origem vegetal usados contra mosquitos vetores de doenças infecciosas (PIZARRO, 2013). Entretanto, dois fatores devem ser considerados quanto ao uso de substâncias fitolarvicidas, primeiro a avaliação sobre os possíveis riscos potenciais que uso sistemático, constante ou esporádico, destes produtos pode causar ao homem em nível mutagênico e/ou genotóxico. É imprescindível, portanto, para o uso seguro, manutenção da saúde e equilíbrio do meio ambiente, a investigação do potencial mutagênico e/ou genotóxico de produtos utilizados para o controle de insetos (MÉLO, 2009). Além deste, o outro fator a ser considerado é se o emprego de fitolarvicidas no controle do vetor da dengue, terá a mesma eficiência que os larvicidas utilizados atualmente.

Para dar respostas a atual problemática, a eficácia de utilização de compostos vegetais obtidos a partir de plantas, deve ser incluído em meio de suporte de liberação controlada como métodos de controle alternativo aos produtos sintéticos para este fim. Uma das plantas das quais são extraídos os referidos compostos vegetais é a *Mentha x piperita* L. Os constituintes do óleo essencial revelaram excelentes propriedades inseticidas em todas as fases do ciclo evolutivo do mosquito (ovo, pupa,

mosquito adulto), mas o resultado mais significativo foi como larvicida. Quando testado em outras concentrações, este produto vegetal mostrou atividade repelente contra o mosquito adulto. Desta forma, o óleo essencial de *Mentha x piperita* constitui e pode revelar-se uma ferramenta viável e eficaz na prevenção do dengue e erradicação do *Ae. aegypti* (PIZARRO, 2013).

Em outro estudo, sobre a utilização de fitolarvicidas no controle do vetor da dengue, utilizando *Annona muricata* L. (graviola) e frutos de *Piper nigrum* L. (pimenta-do-reino) os resultados demonstraram uma base inovadora do trabalho inicialmente proposto. O estudo mostrou que, praticamente, todas as combinações dos extratos etanol das sementes de *Annona muricata* L. (graviola) e frutos de *Piper nigrum* L. (pimenta-do-reino) apresentaram efeitos sinérgicos sobre a letalidade em larvas de *Ae. aegypti*. Com base nos resultados apresentados, é possível reduzir as quantidades dos extratos necessários para produzir mortalidade das larvas de *Ae. aegypti*, vetor que persiste como um sério problema de saúde pública no país (GRZYBOWSKI et al., 2011).

4.3.3 Controle biológico

O *Ae. aegypti* já foi identificado em aproximadamente 4.523 municípios, distribuídos nos 23 estados do país (ZARA, et al., 2016). Diante da redução na eficácia dos inseticidas químicos, em geral, devido ao desenvolvimento de resistência, torna-se necessário a busca por outras formas de controle. Inúmeras tecnologias têm sido desenvolvidas para esse propósito, entre as quais, vale destacar o controle biológico, que vem sendo amplamente utilizado na agricultura e na luta contra os vetores (ANDRADE; SANTOS, 2004). Este método baseia-se na utilização de patógenos, como bactérias e fungos, ou ainda, predadores naturais como alternativas de controle (ZARA, et al., 2016).

A utilização da bactéria entomopatogênica, *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses*, como patógeno demonstrou ser um bioinseticida eficaz, tendo alta atividade e um efeito residual prolongado, causando a mortalidade de 99,5% das larvas contaminadas (ESPINDOLA et al., 2008). Outra alternativa de controle biológico, que mostrou resultados relevantes foi a utilização dos fungos entomopatogênicos, *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. A linhagem de

Metarhizium anisopliae demonstrou patogenicidade contra os mosquitos adultos e ovos de *Ae. aegypti*, possuindo potencial para aplicação em campo (LELES, 2013).

Os predadores naturais também se tornam uma opção eficaz para o controle das larvas de *Aedes* spp. Dentre as opções, os peixes têm se destacado pela eficiência na predação das larvas dos mosquitos (ANDRADE; SANTOS, 2004). Em estudo sobre a competência das espécies de peixes como predadores de larvas de *Ae. aegypti*, Cavalcanti et al. (2007), concluiu que as espécies *Trichogaster trichopteros*, *Astyanax fasciatus*, *Betta splendens* e *Poecilia sphenops* apresentam boa capacidade para predação das larvas.

No entanto, a utilização desses vertebrados é um tanto restrita em função do tamanho desse predador e da preferência dos mosquitos *Aedes* spp. a pequenos criadouros (ANDRADE; SANTOS, 2004).

4.4 Características Físico Químico do Leite

O leite por definição, é um produto integral da ordenha total e ininterrupta de uma fêmea leiteira sadia, bem nutrida e não fatigada, devendo ser produzido de uma forma adequada, isento de substâncias estranhas e não conter colostro (OCTÁVIO, 2001). É um líquido duas vezes mais viscoso que a água, de coloração branca, opaco e ligeiramente adocicado, tendendo à neutralidade, de odor pouco acentuado, constituído de gorduras em emulsão, proteínas em estado coloidal (caseína) e carboidratos (lactose), sais (citratos), vitaminas B e C em solução, sendo a água o meio dispersante (OCTÁVIO, 2001; BEZERRA et al., 2010).

Segundo o artigo 475 e 476 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), a definição de leite é tido como:

Art. 475 – Entende-se por leite, sem outras especificações, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que se proceda.

Art. 476 – Considera-se leite normal, o produto que apresente:

- 1 – caracteres normais;
- 2 – teor de gordura mínimo de 3% (três por cento);
- 3 – acidez em graus Dornic entre 15 e 20);
- 4 – densidade a 15° C (quinze graus centígrados) entre 1.028 (mil e vinte e oito) e 1.033 (mil e trinta e três);
- 5 – lactose – mínimo de 4,3 (quatro e três décimos por cento);

- 6 – extrato seco desengordurado – mínimo 8,5 (oito e cinco décimos por cento);
- 7 – extrato seco total – mínimo 11,5% (onze e cinco décimos por cento);
- 8 – índice crioscópico mínimo - 0,55°C (menos cinquenta e cinco graus centígrados);
- 9 – índice refratométrico no soro cúprico a 20° C (vinte e graus centígrados) não inferior a 37° (trinta e sete graus) Zeiss (AGAIS.COM, 2018).

Em média, o leite é formado por 7/8 de água e 1/8 de substâncias sólidas, denominado de Extrato Seco Total, representando a parte nutritiva do leite (OCTÁVIO, 2001), podendo ser representada conforme a tabela 1. No entanto, a composição química do leite pode ser influenciada por diversos fatores, entre eles:

- A raça do animal, que irá afetar principalmente os teores de gordura e proteína do leite;
- A porcentagem de gordura do leite varia entre diferentes ordenhas;
- Animais que executam trabalhos intensos proporcionam menor rendimento da produção de leite;
- Os diferentes quartos do úbere promovem variação: o úbere é dividido em quatro câmaras, a produção e a composição podem variar entre os quartos;
- O período de lactação afeta a composição do leite;
- As estações do ano exercem influência sobre a composição;
- Os alimentos e seus respectivos níveis nutricionais ingeridos pelo animal também influenciam na composição do leite;
- A temperatura ambiente pode promover variações fora da faixa entre -1°C e 23°C;
- A sanidade do animal e a idade do animal. (BEZERRA et al., 2010).

Tabela 1: Constituintes do leite

	Água	87%
Extrato Seco Total	Gordura	4,0%
Extrato Seco	Lactose	4,8%
Desengordurado	Proteínas	3,5%
	Sais minerais	0,7%

Fonte: Adaptado de (OCTÁVIO, 2001).

Ainda de acordo com Octavio (2001), é válido dizer que, em 100 kg de leite, nós temos 87 litros de água e 13 kg de substâncias sólidas. Pouco menos de meio litro de leite na dieta de um adulto é fornecido aproximadamente 320 kcal. Sendo estas calorias fornecidas pelas proteínas, pelo açúcar e pela gordura encontrados no leite.

O açúcar do leite está sob a forma de lactose, possuindo digestibilidade de 98%, este por não fermentar rapidamente não provoca alterações digestivas como acontece com outros tipos de açúcares.

A gordura do leite fica sob forma de emulsão, possuindo coeficiente de digestibilidade de 95%. Em comparação com outras gorduras, a gordura do leite é uma fonte rica de energia servindo de meio de transporte para as vitaminas lipossolúveis: A, D, E e K.

4.4.1 Proteínas do Leite: Caseína

Exercendo diversas funções básicas de nutrição, as proteínas são fonte de aminoácidos para síntese proteica e de energia devido as suas propriedades funcionais e sensoriais.

No leite, as proteínas são as substâncias mais representativas da chamada fração *azotada* do leite. A constituição desta fração se dá através de dois grupos, dos quais o principal é o das proteínas sendo o outro formado por matérias *azotadas* não proteicas.

As proteínas do leite são constituídas pelas caseínas ou proteínas insolúveis, que representam cerca de 27 g.L⁻¹, e que se apresentam sob a forma de micelas de fosfocaseinato de cálcio. Essas proteínas são facilmente degradadas por todas as enzimas proteolíticas e pelas proteínas solúveis que se encontram no lactosoro, dividindo-se em albuminas, globulinas e enzimas (OCTÁVIO, 2001).

As caseínas são as principais proteínas do leite compreendendo cerca de 80% de sua estrutura além de possuir coeficiente de digestibilidade de 97 % (OCTÁVIO, 2001; BELCHIOR BRASIL et al., 2015). São considerados veículos naturais, que fornecem micronutrientes essenciais, aminoácidos, assim como componentes do sistema imune, além disso, possuem propriedades de fundamental importância nas características de muitos produtos lácteos. As caseínas consistem de quatro proteínas principais: α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseína, as quais possuem elevada estabilidade térmica, o que proporciona às indústrias de laticínio realizar o tratamento do leite a temperaturas elevadas (BELCHIOR BRASIL et al., 2015).

Fisiologicamente essas proteínas são substâncias indispensáveis a construção dos tecidos, em especial do tecido muscular, por isso constitui a base da vida, ocupando um lugar importantíssimo da nutrição dos animais e do homem (OCTÁVIO, 2001).

4.5 *Cocos nucifera* L.

Cocos nucifera (L.) é comumente chamado de “coqueiro”, e é a planta frutífera mais difundida naturalmente na Terra (LIMA et al., 2015). No Brasil, sua distribuição geográfica (FIGURA 3) é predominante nas regiões Norte (Pará), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe) e Sudeste (Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo) (REFLORA, 2014).

Figura 3. Distribuição geográfica de *Cocos nucifera* L.



Fonte: (REFLORA, 2014).

A água de coco (endosperma líquido de coco), com suas muitas aplicações, é um dos produtos naturais mais versáteis do mundo (YONG et al., 2009), suas proteínas têm atraído cada vez mais atenção devido a seus benefícios nutricionais e potenciais à saúde, possuindo importantes efeitos farmacológicos com baixa toxicidade (HUANG et al., 2016) (LIMA et al., 2015).

Há cada vez mais evidências científicas que apoiam o papel da água de coco na saúde e nas aplicações medicinais (YONG et al., 2009), pois os constituintes de *Cocos nucifera* apresentam alguns efeitos biológicos, tais como atividades anti-helmínticas, antiinflamatórias, antinociceptivas, antioxidantes, antifúngicas, antimicrobianas e antitumorais (LIMA et al., 2015). A água de coco também é

tradicionalmente usada como suplemento de crescimento em cultura de tecidos de plantas / micropropagação. As amplas aplicações da água de coco podem ser justificadas por sua composição química única de açúcares, vitaminas, minerais, aminoácidos e fito hormônios (YONG et al., 2009). No entanto, os efeitos farmacológicos diferem de acordo com a parte da planta ou fruta utilizada. Variações geográficas e sazonais entre países e regiões podem influenciar a composição química da (LIMA et al., 2015).

A água de coco é rica em sais minerais e açúcares, que a torna uma bebida isotônica natural. A Tabela 2 apresenta dados de análise físico-química da água-de-coco verde (ROSA; ABREU, 2000).

Tabela 2: Caracterização físico-química da água-de-coco anão verde com 7 meses de idade.

sacarose (mg/100mL)	280
glicose (mg/100mL)	2378
frutose (mg/100mL)	2400
P (mg/100g)	7,4
Ca (mg/100g)	17,1
Na (mg/100g)	7,05
Mg (mg/100g)	4,77
Mn (mg/100g)	0,52
Fe (mg/100g)	0,04
K (mg/100g)	156,86
acidez (%v/p)	1,11
pH	4,91
sólidos totais (g/100g)	5,84
brix	5,00
vitamina C (mg/100mL)	1,2
glicídeos totais (g/100g)	3,46
proteína (mg/100g)	370
valor calórico (Cal/100g)	27,51

Fonte: (ROSA; ABREU, 2000).

4.6 *Ruta graveolens* L.

Pertencente à família Rutaceae Juss, a *Ruta graveolens* L., também conhecida como arruda doméstica (FIGURA 4), tem origem do sul da Europa e Mediterrâneo. O nome do gênero *Ruta* vem do grego RUTE, derivado de *Ruesthai*, que significa salvador, referindo-se ao poder curativo da planta.

A *Ruta graveolens* é um subarbusto de folhagem densa com odor característico, podendo atingir até 1,5 m de altura; folhas alternas, carnosas, pecioladas, de coloração verde azulada, contendo glândulas oleíferas.

As flores são de cor amarelo-esverdeadas, hermafroditas com pétalas livre entre si, lanceoladas, com brácteas pequenas; ovário súpero com muitos óvulos. Possui fruto com 4 a 5 lobos, arredondado; sementes pardas e rugosas (RODRIGUES, V. G. S.; GONZAGA, 2001).

Figura 4 *Ruta graveolens* L.



Fonte: (O autor, 2018).

Os componentes das espécies do gênero *Ruta* são de grande interesse na química medicinal, pois esses compostos apresentam uma ampla gama de atividades biológicas (RATHEESH et al., 2010), sendo utilizada em tratamento de diversas patologias humanas, possuindo potencial para o controle alternativo de fitopatógenos por apresentar fitoalexinas em sua composição (REIS, 2013).

Este vegetal, ainda possui mais de 120 classes de produtos naturais, entre os quais, cumarinas, furanocumarinas, alcaloides, flavonoides, triterpenos, ácidos fenólicos, taninos e também óleos essenciais (KUZOVKINA et al., 2004). Dentre estes compostos, a presença de cumarinas, furanocumarinas e alcaloides estão relacionadas com as principais atividades biológicas descritas para a espécie (STASHENKO et al., 2000). Em especial, as furanocumarinas exercem propriedades fisiológicas importantes nas espécies vegetais em que são encontradas, dentre as quais, proteger os tecidos contra a luz UV, insetos e diferentes patógenos. Os mecanismos envolvidos para estas atividades envolvem a geração de singletos de oxigênio e ânion superóxido na presença de luz ultravioleta, a ligação irreversível destes compostos às proteínas, e ainda, a formação de adutos covalentes com lipídeos insaturados (ZOBEL, 1989).

Os principais constituintes químicos de *Ruta graveolens*, segundo Rodrigues e Gonzaga (2001), são:

Óleo essencial de 0,2 a 0,7% (metilnonilcetona; metilheptilcetonas 90%; de metilnonilcarbinol 10%; álcoois, ésteres, fenóis; compostos terpênicos); alcalóides de 0,4 a 1,4% (arborinina, graveolina (rutanina), alfa-fagarina; derivados furocumarínicos (bergapteno, xantoxina, psoraleno; compostos flavônicos (Rutina).

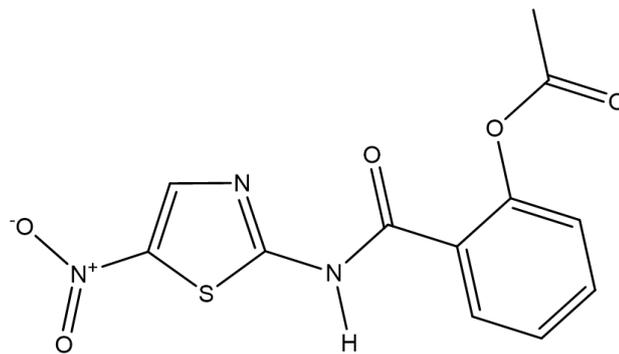
No óleo essencial das folhas frescas da *Ruta graveolens* foram identificados quatro compostos pertencentes à classe das metilcetonas, 2-nonanona, 2-decanona, 2-undecanona e 2-dodecanona. Além destes compostos foram identificados os ésteres, acetato de octila, ftalato de etila e acetato de pentadecanila (ORLANDA, 2011).

4.7 Nitazoxanida

A nitazoxanida é um fármaco antiparasitário de amplo espectro pertencente à classe dos nitrotiazóis. No Brasil, encontra-se disponível na forma de comprimidos revestidos e pó para suspensão oral, sob nome comercial de Annita[®], (MALESUIK, 2010).

Nitazoxanida é um derivado nitrotiazólico (FIGURA 5) sintetizado em 1974 e indicado, principalmente, no tratamento de infecções causadas pelos protozoários *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* (ANDRADE et al., 2011; DRUGBANK, 2018).

Figura 5: Estrutura química da nitazoxanida.



Nitazoxanida

Fonte: (O autor, 2018).

O mecanismo de ação da nitazoxanida em bactérias, protozoários e helmintos consiste no bloqueio da oxidação do piruvato, através da inibição da reação de transferência de elétrons dependente da enzima piruvato-ferredoxina oxireductase (PFOR). A interrupção na oxidação do piruvato, durante a glicólise, afeta a geração de energia na forma de ATP (HOFFMAN et. Al., 2007; MCCOLL, 2010).

Do ponto de vista químico, a nitazoxanida dá suporte para uma nova classe de medicamentos chamados tiazolides inibindo a replicação de uma ampla gama de vírus de RNA e DNA, incluindo a dengue e a febre amarela (ROSSIGNOL, 2014)

Entretanto, neste caso, a ação antiviral do fármaco é diferente do mecanismo de ação contra bactérias, protozoários e helmintos. A ação antiviral consiste na

ativação da proteína-quinase ativada por RNA de cadeia dupla (PKR), que leva a indução da síntese de interferon, mediador da imunidade celular antiviral, bloqueando a habilidade de replicação do vírus (ANDERSON; CURRAN, 2007; ELAZAR et al., 2008).

5 METODOLOGIA

A escolha dos compostos para utilização na indução do crescimento e para o controle da viabilidade das larvas de *Ae. aegypti* foi realizada de acordo com estudos prévios, obtidos no Laboratório de Químico/Biotecnologia de Biomassas (LQBB) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Ecoville (UTFPR), local de desenvolvimento deste trabalho.

5.1 Obtenção das larvas

As larvas “Rockfeller” de *A. aegypti* foram cedidas pelo Prof. Dr. Mario Antonio Navarro da Silva, do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), e os ovos da cepa Rockfeller de *Ae. aegypti* foram obtidos no Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil).

5.2 Obtenção dos produtos para crescimento e controle do *Ae. aegypti*

Para o desenvolvimento da metodologia de indução do crescimento das larvas de *Aedes aegypti* foram utilizadas três variedades de leite, e água de coco verde. Todos os insumos foram adquiridos em estabelecimentos comerciais, no município de Curitiba – PR, sendo os leites, em embalagens longa vida de 1 L, adquiridos em supermercados; e os exemplares de coco verde (*Cocos nucifera*) foram adquiridos no Mercado Público Municipal de Curitiba.

Para a realização dos testes de controle da viabilidade das larvas de *Aedes aegypti*, os exemplares de *Ruta graveolens* foram adquiridos em uma floricultura localizada no bairro Campo Comprido, município de Curitiba – PR. E, o medicamento Annita[®] 500 mg (nitazoxanida) foi adquirido em uma farmácia localizada bairro Ecoville, também, município de Curitiba – PR.

5.3 Fontes alimentares para acelerar o desenvolvimento de larvas recém-eclodidas de *Ae. Aegypti*

Para os tratamentos com leite de vaca foram utilizados os leites, Ninho[®] Integral, Ninho[®] Leve e Ninho[®] Zero Lactose (Nestlé Brasil), todos enriquecidos com ferro, zinco, e vitaminas A, C e D. Para cada laticínio foram coletadas três frações de 10 mL (triplicata), estas foram transferidas para placas de petri, previamente pesadas, e então submetidas à aquecimento de 45°C em estufa de circulação de ar, Nova Ética modelo 400/4ND, até evaporação da fase líquida para determinação do peso médio de sólidos totais.

A água de coco foi extraída no momento do uso, e desta foram coletadas três frações de 10 mL (triplicata), as quais foram transferidas para placas de petri previamente pesadas. Em seguida, as amostras foram levadas à estufa de circulação de ar, 45°C, até evaporação da fase líquida, para determinação do peso médio de sólidos totais. O teor de açúcares foi determinado através do método de Lane-Eynon, também conhecido como método de Fehling (SPQ, 2018).

A concentração normalizada dos leites foi calculada a partir do peso de sólidos totais. A partir de resultados prévios de análise, o leite Ninho[®] Leve foi submetido

ao processo de precipitação isoelétrica da caseína, com o intuito de verificar diferenças na indução da velocidade do crescimento devido à presença ou não desta proteína. Para realização desse processo, foi adicionado à 20 mL de leite, vagarosamente e sob monitoramento em peagâmetro, Sartorius modelo Docu-pHmeter, HCl 0,5 M até pH 4,7. Em seguida, a solução foi levada à centrifuga, Celme modelo LS-3 Plus, durante 15 minutos a 5.000 rpm (Força G = 2.235,7) para recuperação do precipitado. Este foi reconstituído em volume para 20 mL e pH 7,63, através da adição de água destilada e NaOH, respectivamente.

5.3.1 Teste nutricional para crescimento do *Ae. aegypti*

Para eclosão dos ovos de *Aedes aegypti*, as tiras de papel de filtro seco, contendo entre 2000 a 3000 ovos (FIGURA 6), foram transferidos para um Becker de 2 L com água potável, previamente declorada e oxigenada. Em seguida foram acondicionados em incubadora BOD, modelo SL-224, a 25 °C +/- 0,5 °C com ciclos de 12 h escuro / claro até a eclosão.

Após 24 de incubação foram selecionadas um total de 420 larvas em primeiro instar, separadas em grupos de 20 larvas, afim de verificar o crescimento até outros instares, pupa ou a fase adulta (alada). Em cada recipiente teste foi adicionado o respectivo volume de leite e água de coco, conforme descrito na tabela 3, afim de se obter a concentração final de 1,4 mg.mL⁻¹ e 5,5 mg.mL⁻¹ em 70mL de água, respectivamente. Para monitoramento dos testes foram utilizados dois controles, em um deles, as larvas foram incubadas apenas com água potável declorada e oxigenada e no outro, as larvas foram incubadas com a água de eclosão dos ovos, chamada de água de colônia. Em cada recipiente, testes e controles, foram adicionadas 20 larvas em primeiro instar. Todo o experimento foi realizado em triplicatas (FIGURA 7). O desenvolvimento larval ao longo dos quatro instares, estágio de pupa e emergência de adultos foram monitorados e registrados diariamente.

Figura 6: Papel filtro com ovos da cepa Rockefeller de *Ae. aegypti*.



Fonte: (O autor, 2018).

Figura 7: Recipiente contendo solução nutritiva.



Fonte: (O autor, 2018).

Tabela 3: Fontes alimentares utilizados nos ensaios de crescimento do *Ae. aegypti*.

Fonte Alimentar	Concentração de Sólidos Totais (mg.mL ⁻¹)	Volume em mililitros (mL)
Controle Água limpa	-	-
Controle Água de colônia	-	-
Água de coco	66,0	5,83
LN Zero Lactose	16,4	5,98
LN Zero Lactose – Precipitado Caseína	16,4	5,98
LN Integral	22,6	4,34
LN Levinho	13,6	7,20

Fonte: (O autor, 2018).

5.4 Obtenção do extrato etanol para controle de *Ae. aegypti*

5.4.1 Obtenção do extrato bruto etanol do fármaco

Os comprimidos de Annita[®], contendo 500 mg de nitazoxanida, fabricado pela empresa Farmoquímica S/A foram previamente pesados e, em seguida macerados em um gral de porcelana. Sequencialmente foram colocados em um tubo de ensaio com 10 mL de etanol absoluto e levados à centrifuga Celme, Modelo LS-3 Plus durante cinco minutos com velocidade de 5.000 rpm (Força G = 2.235,7). O processo foi repetido por quatro vezes. Após esta etapa, a solução foi transferida para uma placa de petri, previamente pesada, e esta foi levada à capela de exaustão de gases à temperatura ambiente, até evaporação do solvente. O extrato seco obtido foi solubilizado em etanol na concentração final de 2,5 mg.mL⁻¹ e armazenado em refrigerador até sua utilização.

5.4.2 Preparo do extrato etanol bruto e frações de *R. graveolens*

As partes botânicas de *Ruta graveolens* (caule, flores, folhas e raiz) foram secas em estufa de circulação de ar, e em seguida trituradas em moedor tipo industrial, modelo LQ003 - Vithory. O material botânico seco e triturado (0,558 kg) foi submetido à maceração com uma mistura etanol:H₂O (90:10, v/v) na proporção de 2 partes de solvente para 1 parte do material. O béquer, contendo a mistura de solvente e material botânico, foi levado a chapa de aquecimento até fervura (78 °C). Após a

ebulição, foi imediatamente filtrado a vácuo com auxílio de Kitassato e funil de Buchner com papel de filtro duplo. A solução foi transferida a uma placa de petri devidamente pesada e levada para a capela de exaustão de gases para evaporação do solvente. Uma parte do extrato bruto obtido de *R. graveolens* (400 mg) foi solubilizado em etanol (99,5%) na concentração final de 50 mg.ml⁻¹ para posterior monitoramento por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e avaliação da atividade larvicida; outra parte do extrato bruto (45 g) foi ressuscendido com uma mistura etanol:H₂O (1:2, v/v) e particionado com solventes de polaridades crescentes (hexano, CH₂Cl₂ e AcOEt). Através deste processo obtiveram-se as frações: Hexano (Rg-H), diclorometano (Rg-D), acetato de etila (Rg-Ae) e, por fim o material remanescente denominado de fração aquosa (Rg-Aq), as quais, foram rotaevaporadas, liofilizadas e ressuscendidas em etanol (99,5%) na concentração final de 25 mg.ml⁻¹ para posterior monitoramento por CCDA e avaliação da atividade larvicida.

As placas cromatográficas foram reveladas sob exposição à luz ultravioleta (UV), nos comprimentos de onda curto (254 nm) e longo (365 nm), seguido de aspersão com solução ácido sulfúrico 5% em etanol e vanilina sulfúrica 1% em etanol seguidos de aquecimento das placas por, aproximadamente, 1 minuto a 150 °C. A atividade larvicida está descrita na seção 5.5.

5.4.3 Fracionamento, identificação e determinação estrutural dos constituintes químicos de *R. graveolens*

5.4.3.1 Fracionamento do extrato bruto

As técnicas de fracionamento foram realizadas por cromatografia em coluna (CC), utilizando como fase estacionária sílica gel 60 com granulometria de 0,063-0,200 mm (70-230 mesh ASTM) da Merck®. Uma parte da fração Rg-Ae (2,0 g) foi submetida ao fracionamento através de CC [altura (h) x diâmetro (φ) = 15,0 x 1,5 cm] utilizando como fase estacionária sílica gel (0,063-0,200 mm, 100,0 g) e eluída com quantidades crescentes de AcOEt em hexano, seguida por eluição com AcOEt 100% e por último com quantidades crescentes de metanol em AcOEt, até a eluição com MeOH 100%. Foram recolhidas 21 frações de 10 mL cada, as quais foram submetidas

à análise por CCDA e reunidas em 8 subfrações de acordo com seus valores de Rf (TABELA 4), em seguida foram avaliadas quanto a atividade larvicida.

Tabela 4 : Fracionamento dos constituintes da fração diclorometano (Rg-D).

Grupos	Frações
I	1 – 6
II	7 - 9
III	10
IV	11 – 12
V	13 – 14
VI	15 – 16
VII	17 - 18
VIII	19 – 21

FONTE: (O autor, 2018).

As placas cromatográficas foram reveladas sob exposição à luz ultravioleta (UV), nos comprimentos de onda curto (254 nm) e longo (365 nm), seguido de aspersão com solução ácido sulfúrico 5% em etanol e vanilina sulfúrica 1% em etanol seguidos de aquecimento das placas por, aproximadamente, 1 minuto a 150 °C.

5.4.3.2 Identificação e determinação estrutural dos constituintes químicos

Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A elucidação estrutural foi realizada por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) com o auxílio dos espectros de RMN de ^1H , além dos mapas de correlação HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) e HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) para determinação dos valores de ^{13}C . Os espectros de RMN foram registrados no equipamento Bruker 400 MHz, operando a 9,4 Tesla (T). Os experimentos foram realizados no centro de RMN da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob responsabilidade do Prof. Dr. Andersson Barison. Utilizou-se aproximadamente 15 a 20 mg das amostras, solubilizadas em 600 μL de clorofórmio deuterado (CDCl_3) e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) da marca Cambridge Isotope Laboratories. A seleção dos solventes foi de acordo com a solubilidade apresentada pelas substâncias. O tetrametilsilano (TMS) foi usado como padrão de referência interna ($\delta = 0$ ppm); os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) e as constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz). Os

espectros foram manipulados no software Bruker TopSpin® 3.1 e o programa FOMSC3_rmn® foi utilizado para simular as multiplicidades dos acoplamentos.

Espectrometria de Massas (EM)

Os experimentos de ESI-EM e ESI-EM/EM foram conduzidos em um Espectrômetro de Massas híbrido do tipo quadrupolo-tempo-de-voo (Xevo™G2Q-TOF) de alta resolução, equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI), acoplado a um Cromatógrafo Líquido de Ultra Performance Acquity UPLC H-Class System, ambos da Waters Technologies. As amostras foram diluídas em uma mistura de solventes metanol:H₂O (90:10 v/v) e injetadas (10 µL) na concentração de 100 a 500 ng.mL⁻¹. Os parâmetros de análise foram ajustados manualmente no equipamento para estabilização do sinal e melhor ionização das substâncias. A voltagem do capilar foi ajustada em 3.000 V para os modos positivo e negativo, e a temperatura da fonte ajustada em 150 °C. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização com fluxo de 300 L.h⁻¹ e a pressão do gás de interface foi 50 L.h⁻¹. O tempo de aquisição dos espectros de massas (scan time) foi de um espectro por segundo, adquiridos com uma janela de massas de 100 a 1000 Da, durante dois minutos. A fonte de ionização foi operada nos modos positivo e negativo, utilizando-se como solvente de diluição a mistura acetonitrila:H₂O (70:30 v/v). A bomba seringa operou em velocidade de 4 µL.min⁻¹ e a concentração das amostras utilizada para análise foi de 100 a 500 ng.mL⁻¹.

A checagem do sinal dos analitos foi realizada através de análise por infusão direta no espectrômetro de massas nos modos positivo e negativo de ionização. Os dados serão processados no software MassLynx® 4.1 (Waters).

5.5 Determinação da CL₅₀ e avaliação da atividade larvicida

Os bioensaios para avaliação da atividade larvicida e determinação da CL₅₀³ foram realizados em triplicata, e conforme metodologia modificada (FIGURA 8) da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005), utilizando-se seis diferentes concentrações dos extratos de nitazoxanida (2,5 mg.mL⁻¹), *Ruta graveolens* (50 mg.mL⁻¹) e suas respectivas frações (Rg-H, Rg-D, Rg-Ae e Rg-Aq), todas em concentrações de 25 mg.mL⁻¹, conforme descritas na tabela 5, tabela 6 e tabela 7.

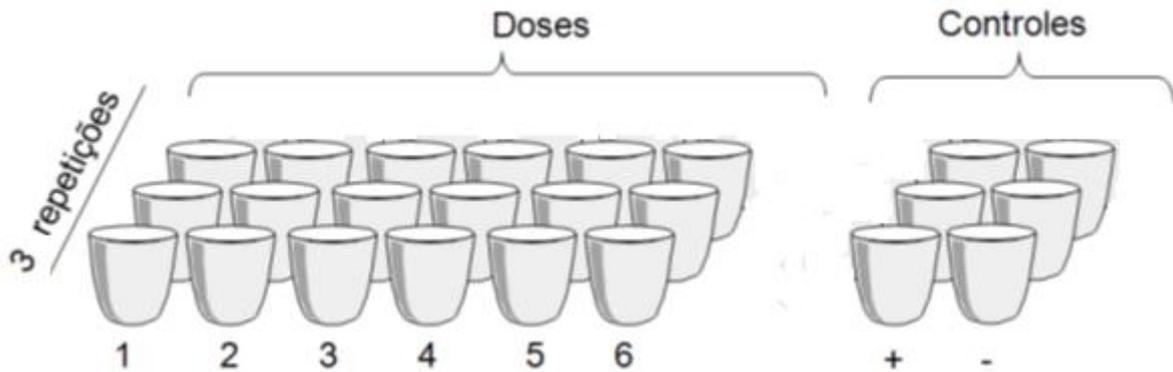
Em cada recipiente, com capacidade para 50 mL, foram adicionados, água declorada e oxigenada q.s.p 30 mL, os volumes de extratos para suas respectivas concentrações (TABELA 5, TABELA 6 e TABELA 7), e 10 larvas de *Aedes aegypti* em terceiro instar de desenvolvimento. Em seguida, os recipientes foram levados a incubadora do tipo B.O.D, modelo SL-224, à 25 °C com ciclos de fotoperíodo de 12 h. Após 24 horas de incubação realizou-se a contagem das larvas viáveis e não viáveis.

Como controle negativo foi utilizado uma solução hidroalcoólica na concentração de 0,66 % v/v, representando o veículo da formulação; e, como controle positivo foi utilizado o extrato bruto etanol de *Piper nigrum*, em uma concentração de três vezes o valor da CL₅₀ (CL₅₀= 1,84 mg.mL⁻¹). Ao final do experimento, as amostras bem como as larvas de *Aedes* restantes foram eliminadas em recipiente contendo hipoclorito de sódio.

A determinação dos valores de CL₅₀ para o extrato etanol bruto de nitazoxanida, bem como, para o extrato etanol bruto e frações de *Ruta graveolens* foram calculadas através do programa estatístico SPSS versão 17.0.

³ **CL₅₀ – Concentração Letal cinquenta:** é a concentração de um agente num meio que causa mortalidade em cinquenta por cento (50%) da população exposta, durante um determinado período de tempo (CETESB, 2018).

Figura 8: Esquema dos bioensaios com larvas de *Aedes aegypti*.



Fonte: Adaptado de (Fontana et al, 2017, p. 112).

Tabela 5: Concentrações para determinação da CL_{50} e atividade larvicida de nitazoxanida ($2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$).

Concentração em mg.mL^{-1}	Volume em microlitros (μL)
2	24
4	48
8	96
16	192
20	240
40	480

Fonte: (O autor, 2018).

Tabela 6: Concentrações para determinação da CL_{50} e atividade larvicida de *Ruta graveolens* (50 mg.mL^{-1}).

Concentração em mg.mL^{-1}	Volume em microlitros (μL)
15	9
30	18
45	27
60	36
75	45
100	60

Fonte: (O autor, 2018).

Tabela 7: Concentrações para determinação da CL_{50} e atividade larvicida das frações do extrato etanol bruto de *Ruta graveolens*.

Concentração em mg.mL^{-1}	Volume em microlitros (μL)			
	Rg-H (25 mg.mL^{-1})	Rg-D (25 mg.mL^{-1})	Rg-Ae (25 mg.mL^{-1})	Rg-Aq (25 mg.mL^{-1})
5	6	6	6	6
10	12	12	12	12
15	18	18	18	18
20	24	24	24	24
25	30	30	30	30
30	36	36	36	36

Fonte: (O autor, 2018).

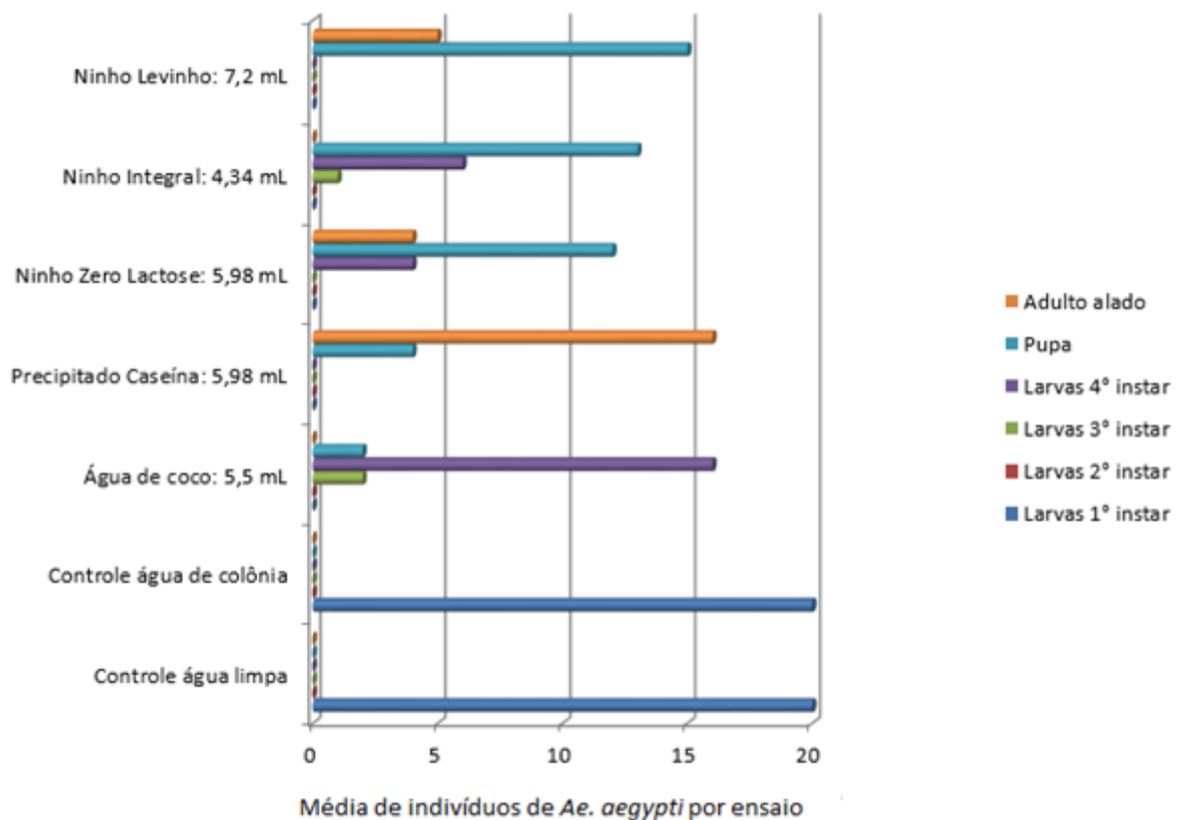
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Resultado do teste nutricional

A avaliação da concentração do teor de sólidos totais revelou que o teor de sólidos, para as amostras de leite longa vida, variou de 13,6 a 22,6 mg.mL⁻¹, conforme observado na tabela 3. Já, o teor de sólidos totais para água de coco foi de 66 mg.mL⁻¹, sendo uma média de 21 mg.mL⁻¹ resultante dos três açúcares livres (sacarose / frutose / glicose), o que está de acordo com os achados de outros autores (YONG et al, 2009).

Com base nestes resultados foi possível avaliar o impacto das substâncias nutritivas sobre o desenvolvimento das cepas de *Ae. aegypti* durante o sétimo dia após a eclosão, resumido na figura 9.

Figura 9: Monitoramento numérico de todas as formas de *Ae. aegypti* no dia 7 após a eclosão quando alimentado com os 4 tipos de leites, precipitado de caseína e água de coco.



Fonte: (O autor, 2018).

Os números obtidos demonstram o impacto destas soluções nutritivas na velocidade da ecdise da espécie em estudo. Dentre os nutrientes testados, o que apresentou melhor resultado foi o precipitado de caseína, completando o ciclo evolutivo a partir de larvas de primeiro instar até o adulto alado em sete dias. Neste período foram contabilizados 80% de adultos (alado) e 20% de pupação, finalizando em 100% de adultos na forma alada em poucas horas após o levantamento estatístico do sétimo dia.

Para os ensaios com os leites totais, o melhor resultado foi o leite Ninho® Levinho com um total de 25% da população na forma adulto (alado) e 20% no estágio de pupa; seguido pelo Ninho® Zero Lactose, que apresentou 20% da população na forma adulto (alado), 60% de pupação e 20% de larvas em estágio de 4º instar. Já o leite Ninho® Integral apresentou 65% de pupação, 30% de larvas no estágio de 4º instar e 5% de larvas no 3º instar.

Este resultado pode ser associado à quantidade e a qualidade das proteínas que cada fonte alimentar possui, visto que, proteínas são moléculas essenciais para os organismos animais. O resultado obtido com a utilização da caseína, uma fosfoproteína com alto valor nutricional, pode ser devido à presença de aminoácidos essenciais como o triptofano, arginina, lisina, fenilalanina, metionina, leucina, isoleucina e valina, os quais não podem ser produzidos pelos organismos, havendo a necessidade de ingestão externa (PIRES, et al., 2006).

As proteínas do leite como o caso da caseína, são absorvidas mais rapidamente que outras, fazendo com que as concentrações plasmáticas de muitos aminoácidos, atinjam altos valores de absorção logo após a sua ingestão (DANGIN et al., 2001).

Nos ensaios contendo leite total, apesar desta dieta fornecer ao organismo proteínas de elevada qualidade e em quantidade significativa, os resultados mostraram uma grande variação nos estágios do ciclo evolutivo de *Ae. aegypti*. Estes resultados demonstram que mais da metade da população da espécie se desenvolveu até o estágio de pupa, sendo que as outras parcelas da população se desenvolveram até a forma adulto (alado) e larvas de terceiro e quarto instar, sugerindo que a falta de gorduras monoinsaturadas (Ômega-9) e poli-insaturadas (Ômega-3 e Ômega- 6), presentes no leite Ninho® Levinho (TABELA 6), influenciaram negativamente a evolução do ciclo até a forma alada.

Tabela 8: Informações nutricionais dos Leite Ninho. 200 mL (1 copo).

Constituintes dos Leites	Ninho® Leivinho	Ninho® Zero Lactose	Ninho® Integral
Carboidratos	9,6 g	15 g, dos quais:	9,8 g
Açúcares****	-	9,3 g	-
Glicose****	-	4,4 g	-
Galactose****	-	4,3 g	-
Lactose****	-	0 g	-
Proteínas	6,4 g	4,7 g	6,4 g
Gorduras Totais	2,8 g	4,9 g	6,9 g
Gorduras Saturadas	1,6 g	não contém	3,9 g
Gorduras Trans	não contém	não contém	não contém
Gorduras Monoinsaturadas	0,6 g	não contém	não contém
Gorduras Polinsaturadas	0,1 g	não contém	não contém
Fibra Alimentar	0 mg	0 mg	0 g
Colesterol	12 mg	não contém	não contém
Sódio	126 mg	78 mg	126 mg
Cálcio	238 mg	168 mg	268 mg
Ferro	4,2 mg	5,2 mg	4,2 mg
Zinco	2,1 mg	2,4 mg	2,1 mg
Vitamina A	187 µg RE	225 µg RE	187 µg RE
Vitamina C	14 mg	117 mg	14 mg
Vitamina D	2,0 µg	1,8 µg	2,0 µg

Fonte: adaptado de (NESTLE, 2018).

As gorduras mono e poli-insaturadas, estão associadas à quantidade de gordura ingerida na alimentação, sendo um fator determinante sobre o efeito da ingestão dos ácidos graxos na formação das lipoproteínas (SANTOS et al., 2013).

Para o ensaio realizado com água de coco, verificou-se o aumento significativo do tamanho e a manutenção das larvas no quarto instar do ciclo evolutivo. Cerca de 80% da população avaliada permaneceu em quarto instar, obtendo apenas uma limitada taxa de formação de pupas (10%) e larvas de terceiro instar (10%). A água de coco é rica em eletrólitos, como sódio e potássio, que são os principais cátions do fluido extracelular, responsáveis pela regulação do tamanho do compartimento e no crescimento celular (WHITMIRE, 2002), portanto um dos fatores responsáveis pelo resultado observado nas larvas de *Ae. aegypti* pode ser o potencial que a água de coco tem em induzir o processo de osmose (MENEZES et al., 2001).

Quando uma célula é colocada em uma solução hipotônica, ela rapidamente ganha água por osmose. Essas observações mostram que o volume celular é controlado pela diferença entre a concentração de solutos no interior da célula e do meio extracelular (KARP et al., 2005).

Outro fator nutricional a ser considerado sobre a água de coco, é a presença de aminoácidos, semelhantes aos encontrados no leite, porém com maior porcentagem de arginina, alanina, cistina e serina, e em menores proporções de outros aminoácidos (ARAGÃO, 2000); além, da grande variedade de nutrientes e co-nutrientes essenciais, que incluem a L-tirosina livre, que está associada a produção e síntese de melanina, um polímero associado à cutícula quitinosa, ao complexo de vitaminas B (B1, B2, B3, B5, B6 e B9), e a colina.

6.2 Determinação da CL₅₀ e da atividade larvívica dos extratos etanol brutos de nitazoxanida e *R. graveolens*

6.2.1 Nitazoxanida

Na realização dos bioensaios o extrato etanol de nitazoxanida apresentou atividade larvívica satisfatória contra as larvas de *Ae. aegypti*. Nos ensaios utilizando concentrações de 2 e 4 mg.L⁻¹ de extrato etanol de nitazoxanida apresentaram apenas 13,33 e 16,66% de mortalidade. No entanto a concentração de 8 mg.L⁻¹ apresentou 40% de mortalidade da população avaliada (TABELA 9), resultado próximo a CL₅₀.

Tabela 9: Mortalidade das larvas do mosquito *Ae. aegypti* após 24 h de exposição em diferentes concentrações de extrato etanol bruto de nitazoxanida 2,5 mg.mL⁻¹.

Dose (mg. mL ⁻¹)	Quantidade geral de indivíduos	Mortos	Vivos	Mortalidade (%)
2	30	4	26	13,33
4	30	5	25	16,66
8	30	12	18	40
16	30	27	3	90
20	30	28	2	93,33
40	30	30	0	100

Fonte: (O autor, 2018).

Em contrapartida, ainda segundo demonstrado na tabela 7 os ensaios contendo as dosagens de 12, 20 e 40 mg.L⁻¹ apresentaram mortalidade acima dos 90 a 100%, e o ensaio contendo a dosagem de 40 mg.L⁻¹ teve 100% de mortalidade.

Utilizando-se do programa estatístico SPSS versão 17.0, foi concluído que a CL₅₀ do fármaco ficou em 10 mg.mL⁻¹.

Através dos resultados dos bioensaios, sugere-se como resposta para atividade larvicida, o próprio mecanismo de ação do fármaco, o qual age bloqueando a oxidação do piruvato, através da inibição da reação de transferência de elétrons dependente da enzima piruvato-ferredoxina oxiredutase (PFOR). Essa interrupção durante a glicólise, afeta a geração de energia na forma de ATP (HOFFMAN et. Al., 2007; MCCOLL, 2010), visto que, o piruvato ou ácido pirúvico é um composto orgânico importante na ligação da glicólise ao restante da respiração celular.

Este mecanismo pode estar associado ao esgotamento das reservas de Ca²⁺ intracelular, sensível ao ATP, implicando no controle de enzimas quinases que atuam na função de fosforilação das proteínas PKR e eIF2 α . As consequências da mobilização de Ca²⁺ mediada pela nitazoxanida incluem a indução de estresse ao retículo endoplasmático (RE), bem como a perturbação da proteína N-glicosilação. O íon Ca²⁺ sendo necessário para a modificação pós-traducional de proteínas secretoras e membranares recém sintetizadas no RE (BROSTROM; BROSTROM, 2003) faz com que a nitazoxanida impeça a formação de glicano. Assim, é provável que a depleção de Ca²⁺ pelo RE mediada pela nitazoxanida perturbe a glicosilação da proteína (ASHIRU et al., 2014).

O retículo endoplasmático possui as características estruturais e funcionais esperadas de uma organela que suporta a integração e coordenação dos principais processos celulares. O Ca²⁺ sequestrado dentro do RE sustenta o processamento da proteína luminal enquanto fornece um reservatório do cátion para suportar o acoplamento estímulo-resposta no citosol. A liberação de Ca²⁺ ao RE é suficiente para prejudicar o processamento de proteínas promovendo o seu estresse, além de sinalizar a “resposta proteica desdobrada” (BROSTROM; BROSTROM, 2003). Como consequência a célula reduz as taxas de tradução proteica, ativando vias de sinalização para aumentar a transcrição de proteínas envolvida com o enovelamento proteico (MARTÍNEZ; CHRISPEELS, 2003), afetando a iniciação da tradução de mRNA e uma regulação positiva de longo prazo de chaperonas no RE. Neste sentido, algumas perspectivas são fornecidas em relação ao Ca²⁺ como fator integrador na

geração ou desvio de energia metabólica, impactando na adaptabilidade celular durante a exposição a estímulos de crescimento ou durante condições estressantes que exigem ajustes rápidos em ATP (BROSTROM; BROSTROM, 2003).

6.2.2 *Ruta graveolens*

Nas tabelas 10, 11, 12, 13 e 14 estão apresentados os resultados do potencial fitolarvicida do extrato etanol bruto de *R. graveolens* e suas respectivas frações, em diferentes concentrações frente às cepas de *Ae. aegypti*.

Na tabela 10, estão descritas as concentrações referentes à atividade larvicida de extrato etanol bruto de *R. graveolens*. A concentração de 15 mg.mL⁻¹ apresentou a menor atividade larvicida, matando, em média, três larvas, o que corresponde a 10% de mortalidade. A partir da concentração de 30 mg.mL⁻¹ de extrato etanol obtivemos 50% de mortalidade da espécie em estudo, dado confirmado como CL₅₀ utilizando-se do programa estatístico SPSS versão 17.0. Já, a partir da concentração de 45 mg.mL⁻¹ de extrato etanol de *R. graveolens*, a atividade larvicida foi constante, ocasionando a morte da grande maioria dos indivíduos testados, chegando a 100% com a concentração de 75 mg.mL⁻¹.

Os dados encontrados após os ensaios das quatro frações (diclorometano, hexano, acetato de etila e da fração aquosa) do extrato etanol bruto de *R. graveolens* (TABELAS 11, 12, 13 e 14) para as mortalidades de larvas de *A. aegypti* mostram que a fração diclorometano apresentou melhor atividade larvicida tendo como CL₅₀ 7,5 mg.mL⁻¹. Comparando os valores de CL₅₀, houve uma diminuição de 4 vezes no valor para a fração de diclorometano quando comparado ao extrato bruto etanol.

Devido à baixa concentração da CL₅₀ da fração de diclorometano, apresentando como melhor resultado entre as testadas, foi submetida a fracionamento por coluna para determinação de seus constituintes químicos.

Tabela 10: Mortalidade das larvas do mosquito *Ae. aegypti* após 24 h de exposição em diferentes concentrações de extrato etanol bruto de *Ruta graveolens*.

Dose (mg.mL ⁻¹)	Quantidade geral de indivíduos	Mortos	Vivos	Mortalidade (%)
15	30	3	27	10
30	30	15	15	50
45	30	26	4	86,66
60	30	29	1	96,66
75	30	30	0	100
100	30	30	0	100

Fonte: (O autor, 2018).

Tabela 11: Mortalidade das larvas do mosquito *Ae. aegypti* após 24 h de exposição em diferentes concentrações da fração hexano (Rg-H) do extrato etanol bruto de *Ruta graveolens*.

Dose (mg.mL ⁻¹)	Quantidade geral de indivíduos	Mortos	Vivos	Mortalidade (%)
5	30	0	30	0
10	30	0	30	0
15	30	2	28	6,67
20	30	2	28	6,67
25	30	6	24	20
30	30	11	19	36,67

Fonte: (O autor, 2018).

Tabela 12: Mortalidade das larvas do mosquito *Ae. aegypti* após 24 h de exposição em diferentes concentrações da fração diclorometano (Rg-D) do extrato etanol bruto de *Ruta graveolens*.

Dose (mg.mL ⁻¹)	Quantidade geral de indivíduos	Mortos	Vivos	Mortalidade (%)
5	30	12	18	40
10	30	18	12	60
15	30	24	6	80
20	30	26	4	86,67
25	30	30	0	100
30	30	30	0	100

Fonte: (O autor, 2018).

Tabela 13: Mortalidade das larvas do mosquito *Ae. aegypti* após 24 h de exposição em diferentes concentrações da fração acetato de etila (Rg-Ae) do extrato etanol bruto de *Ruta graveolens*.

Dose (mg.mL ⁻¹)	Quantidade geral de indivíduos	Mortos	Vivos	Mortalidade (%)
5	30	8	22	26,67
10	30	10	20	33,33
15	30	15	15	50
20	30	22	8	73,33
25	30	28	2	93,33
30	30	28	2	

Fonte: (O autor, 2018).

Tabela 14: Mortalidade das larvas do mosquito *Ae. aegypti* após 24 h de exposição em diferentes concentrações da fração aquosa (Rg-Aq) do extrato etanol bruto de *Ruta graveolens*.

Dose (mg.mL ⁻¹)	Quantidade geral de indivíduos	Mortos	Vivos	Mortalidade (%)
5	30	0	30	0
10	30	0	30	0
15	30	2	28	6,67
20	30	5	25	16,67
25	30	5	25	16,67
30	30	6	24	20

Fonte: (O autor, 2018).

Foram testadas quanto a atividade larvicida os grupos III e IV proveniente da fração diclorometano conforme tabelas 15 e 16.

O grupo III apresentou uma atividade larvicida de 60% quando os vetores foram expostos a uma concentração de 6 mg.mL⁻¹. Já o grupo IV, apresentou esta mesma taxa de mortalidade quando os vetores foram expostos à uma concentração de 8 mg.mL⁻¹, entretanto, ambos os grupos III e IV mostraram 100% de letalidade com a concentração de 20 mg.mL⁻¹.

Tabela 15: Mortalidade das larvas do mosquito *Ae. aegypti* após 24 h de exposição em diferentes concentrações do grupo III proveniente da fração diclorometano (Rg-D) do extrato etanol bruto de *Ruta graveolens*.

Dose (mg.mL ⁻¹)	Quantidade geral de indivíduos	Mortos	Vivos	Mortalidade (%)
3	30	9	21	30
6	30	18	12	60
8	30	26	4	86,67
10	30	27	3	90
12	30	27	3	90
20	30	30	0	100

Fonte: (O autor, 2018).

Tabela 16: Mortalidade das larvas do mosquito *Ae. aegypti* após 24 h de exposição em diferentes concentrações do grupo IV proveniente da fração diclorometano (Rg-D) do extrato etanol bruto de *Ruta graveolens*.

Dose (mg.mL ⁻¹)	Quantidade geral de indivíduos	Mortos	Vivos	Mortalidade (%)
3	30	10	20	33,33
6	30	15	15	50
8	30	18	12	60
10	30	18	12	60
12	30	21	9	70
20	30	30	0	100

Fonte: (O autor, 2018).

Em síntese, foi determinado as CL_{50} em 5 mg.mL^{-1} para o grupo III e 6 mg.mL^{-1} para o grupo IV. Quando comparado as frações com o extrato bruto de *R. graveolens* verifica-se que o grupo III obteve diminuição da CL_{50} em 6 vezes e diminuição de 5 vezes comparando ao grupo IV.

A partir dos resultados obtidos do grupo III, este foi submetido a análise de RMN e espectrometria de massas para identificação dos compostos presentes.

6.2.2.1 Identificação e determinação estrutural do composto Rg-D1

O Grupo III (TABELA 15 e 16) foi analisado por RMN uni e bidimensionais, sendo possível identificar a substância **Rg-D1**. O conjunto de dados obtidos mediante os espectros de RMN de ^1H do grupo III está descrito na TABELA 17. Os sinais observados no espectro de RMN de ^1H (FIGURA 11) revelaram a presença de um anel furano α,β -substituído, sendo facilmente reconhecido através de um duplete em $\delta_{\text{H}} 7,67$ (1H; *d*; $J = 2,5$ Hz; H-2') e um duplo-duplete em $\delta_{\text{H}} 6,81$ (1H; *dd*; $J = 2,5$ e $0,9$ Hz; H-3'). A constante de acoplamento, $J = 0,9$, deste último hidrogênio é observada quando C-8 se encontra hidrogenado, devido a um acoplamento a longa distância (5J) deste com H-3'. A presença de um simpleto em $\delta_{\text{H}} 7,67$ (1H; *s*; H-4), sobreposto ao duplete no mesmo deslocamento, indica uma substituição na posição C-3, a qual foi confirmada pela presença de outro simpleto, com integração para seis hidrogênios, referente à presença de duas metilas, em $\delta_{\text{H}} 1,51$ (6H; *s*). Além deste, observou-se também a presença de um duplete em $\delta_{\text{H}} 5,10$ (1H; *d*, $J = 7,3$ e $1,0$ Hz; H13b); e um duplo-duplete em $\delta_{\text{H}} 6,21$ (1H; *dd*, $J = 17,1$ e $11,2$ Hz; H-12). O hidrogênio (H13a) aparece como um simpleto em $\delta_{\text{H}} 5,13$.

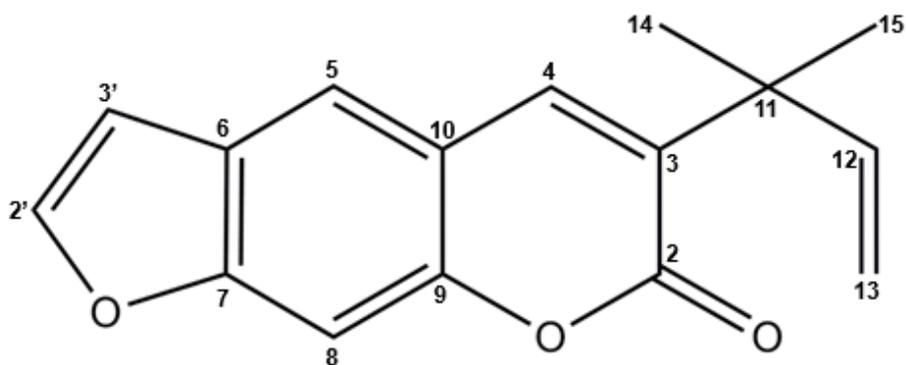
As atribuições dos valores de ^{13}C foram realizadas com o auxílio dos experimentos de correlação heteronuclear HSQC (FIGURA 12) e HMBC (FIGURA 13), onde foi possível evidenciar a presença de 16 átomos de carbono incluindo $\delta_{\text{C}} 40,6$; $\delta_{\text{C}} 145,5$; $\delta_{\text{C}} 112,3$ e $\delta_{\text{C}} 26,2$ referentes aos carbonos do grupo prenila C-11, C-12, C-13, C-14 e C-15, respectivamente. Nestes experimentos, também foi possível observar o acoplamento dos hidrogênios do anel furano em $\delta_{\text{H}} 7,67$ (H-2') e $\delta_{\text{H}} 6,81$ (H-3') com os carbonos em $\delta_{\text{C}} 146,7$ (C-2) e $\delta_{\text{C}} 106,4$ (C-3). Além destes, ainda foram observados o acoplamento dos hidrogênios aromáticos $\delta_{\text{H}} 7,64$ (H-5) e $\delta_{\text{H}} 7,43$ (H-8)

com os carbonos em δ_c 119,5 e δ_c 99,0, respectivamente. O outro hidrogênio em δ_H 7,67 (H-4) mostrou correlação direta com o carbono δ_c 138,3 (C-4). Ao carbono carbonílico foi atribuído o deslocamento em δ_c 160,0 (C-2), enquanto para o carbono C-9, vizinho ao oxigênio do anel quinolinona foi atribuído o deslocamento em δ_c 151,4.

As correlações a mais de uma ligação, entre hidrogênio e carbono, observadas no mapa de correlação HMBC (FIGURA 13) permitiram estabelecer a conectividade das ligações na estrutura. Estas correlações estão descritas na tabela YY.

Considerando-se os dados publicados na literatura (Quintanilla-Licea, et al., 2014) e a análise dos dados espectroscópicos de RMN 1D e 2D, o composto **Rg-D1** ($C_{16}H_{14}O_3$) foi elucidado como sendo a furanocumarina chalepensina (Figura 10). A fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_3$ foi confirmada com base nos dados observados no experimento (+)-ESI HR MS, em modo positivo de ionização (FIGURA 14), o qual apresentou o íon molecular de m/z 255,1053 $[M+H]^+$.

Figura 10: Estrutura química da chalepensina.

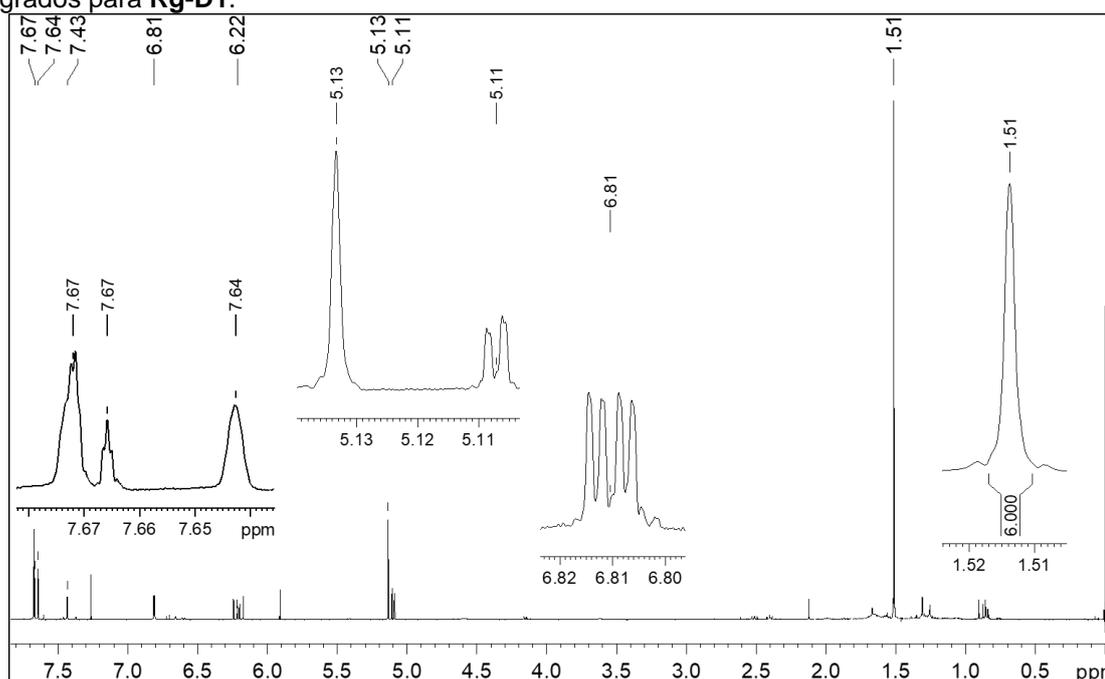


Fonte: (O autor, 2018).

Tabela 17 – Dados de RMN e ^1H , ^{13}C , HMBC de **Rg-D1** em comparação com literatura.

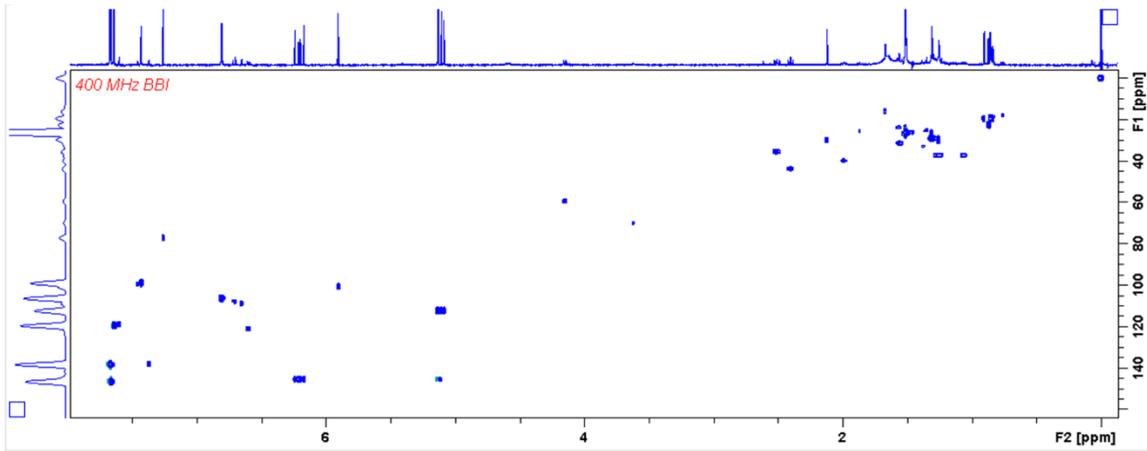
Posição	Rg-D1^a			Chalepentina^b	
	δ^{H}	δ^{C}	HMBC	δ^{H}	δ^{C}
	(mult, <i>J</i> em Hz)	(^{13}C)		(mult, <i>J</i> em Hz)	(^{13}C)
1	-	-	-	-	-
2	-	160,0	-	-	159,9
3	-	133,3	-	-	133,1
4	7,67 1H, s	138,3	2,5,9,11	7,68 1H, s	138,3
5	7,64 1H, s	119,5	3',4,8	7,65 1H, s	119,5
6	-	124,6	-	-	124,6
7	-	155,9	-	-	155,8
8	7,43 1H, s	99,0	5,6,7,9,10	7,43 1H, s	98,9
9	-	151,4	-	-	151,3
10	-	116,0	-	-	115,9
11	-	40,6	-	-	40,5
12	6,21 1H, <i>dd</i> (17,1; 11,2)	145,5	11,14,15	6,21 1H, <i>dd</i> (17,2; 11,0)	145,4
13a	5,13 1H, s	112,3	11,12	5,10 (1H, s)	112,3
13b	5,10 1H, <i>d</i> (7,3; 1,0)		11,12	5,07 <i>dd</i> (8,2; 1,0)	
14 e 15	1,51 6H, s	26,2	3,11,12,13,14,15	1,52 6H, s	26,2
1'	-	-	-	-	-
2'	7,67 1H, <i>d</i> (2,5)	146,7	3',6	7,67 1H, <i>d</i> (2,3)	146,6
3'	6,81 (1H, <i>dd</i>)	106,4	2',6,7	6,83 1H, <i>dd</i> (2,3; 0,9)	106,4

FONTE: O autor, 2018 - ^a: Experimento de RMN de ^1H , HSQC e HMBC (400 MHz, CDCl_3-d_6), utilizando TMS como referência interna. As atribuições de δ^{C} foram obtidas através da análise de espectros de HSQC e HMBC. ^b: Dados da literatura de acordo com (Quintanilia-Licea, et al., 2014).

Figura 11: Espectro 1 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do grupo III com os sinais integrados para **Rg-D1**.

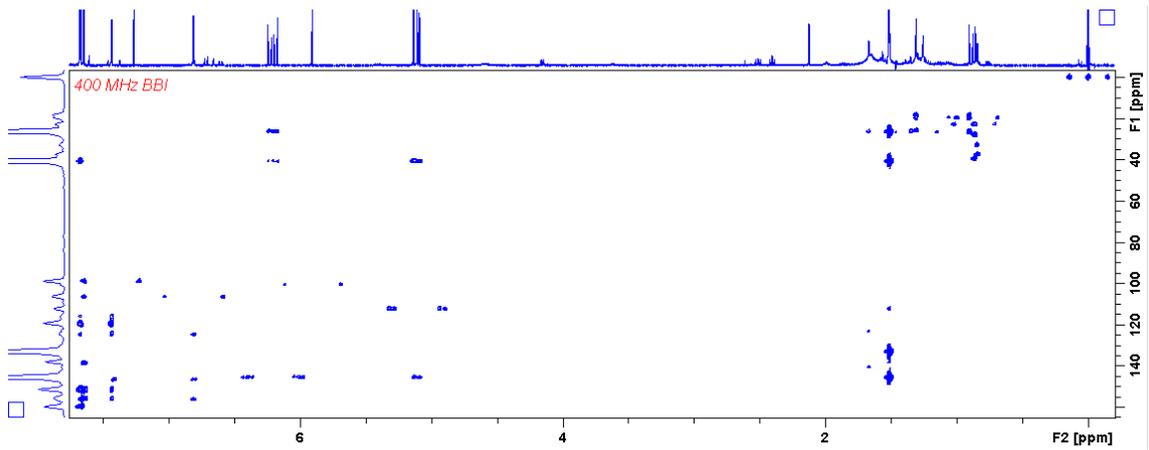
Fonte: (O autor, 2018).

Figura 12: Espectro 2 – Mapa de correlação de HSQC (400 MHz, CDCl₃) da substância **Rg-D1**.



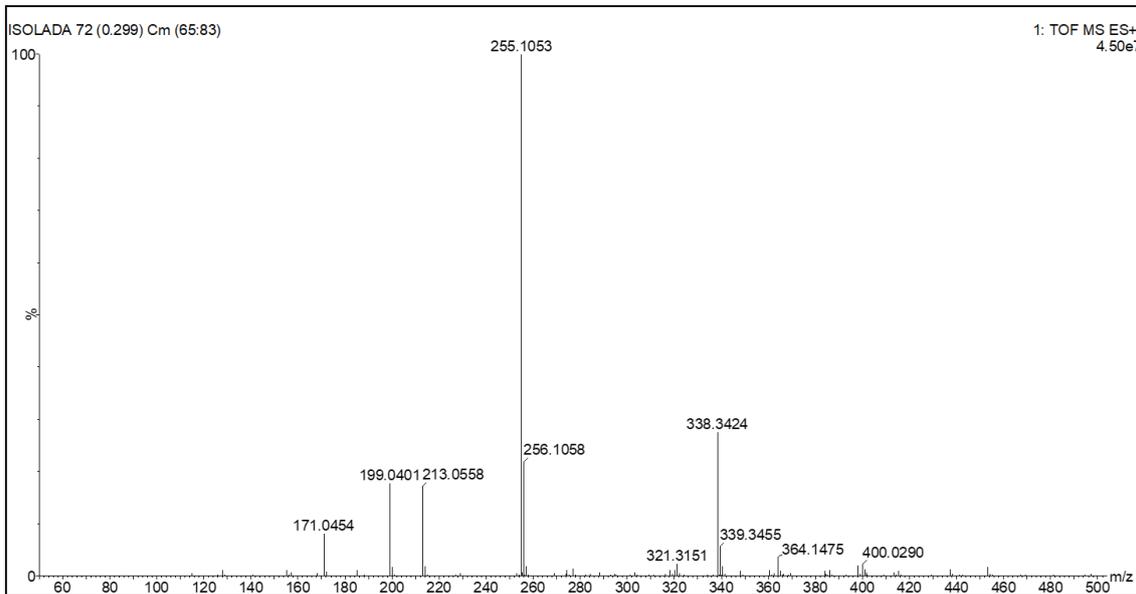
Fonte: (O autor, 2018).

Figura 13: Espectro 3 – Mapa de correlação de HMBC (400 MHz, CDCl₃) da substância **Rg-D1**.



Fonte: (O autor, 2018).

Figura 14: Espectro 4 - Experimento (+)-ESI HRMS do grupo III evidenciando o íon de m/z 255,1053 de **Rg-D1**.



Fonte: (O autor, 2018).

A partir da análise de RMN e espectrometria de massas, que auxiliaram na identificação da furanocumarina, denominado chalepentina, foi possível associar as atividades deste composto aos resultados dos bioensaios com *R. graveolens*. A chalepentina é um composto farmacologicamente ativo, o qual, exerce forte atividade aleloquímica e fitotóxica, além de efeitos citotóxicos em algumas linhagens celulares. A chalepentina também possui efeito inibidor baseado no mecanismo do citocromo P450 (UENG et al., 2011), cuja proteína localiza-se no retículo endoplasmático (MWENIFUMBO et al., 2008), sendo monoxigenases que catalisam muitas reações envolvidas na síntese de colesterol, esteróides e outros lipídios, além de hidrolizar as cumarinas (UENG et al., 2011).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos dados apresentados sobre a avaliação de crescimentos das cepas de *Ae aegypti*, conclui-se que os ensaios realizados apresentaram resultados satisfatórios em acelerar a ecdise do vetor em estudo.

O precipitado de caseína, por ser uma proteína de lenta absorção composta por aminoácidos essenciais, confere um importante valor nutritivo fornecendo um quadro nutricional satisfatório para a espécie em estudo quando se deseja acelerar o crescimento de larvas de primeiro instar até o adulto alado.

No que se refere aos ensaios utilizando como fonte nutricional as diferentes variedades de leite, pelo fato da dieta ser rica em proteínas e apresentar um perfil aminoacídico relevante, sendo composta por aminoácidos essenciais, foi observado um crescimento significativo do ciclo morfogênético em direção a pupação. A utilização desta fonte alimentar também apresentou taxas da forma alada do mosquito e larvas em quarto instar, além de uma pequena parcela de larvas de terceiro instar.

A utilização da água de coco, demonstrou potencial relevante para o desenvolvimento de larvas de quarto instar do *Ae. aegypti*. Provido de aminoácidos, enzimas e diversos sais minerais, a utilização da água de coco como fonte alimentar para a espécie em estudo demonstrou desenvolvimento satisfatório para atingir o tamanho larval necessário ao bioensaios.

Os ensaios de atividade larvicida realizados, demonstraram suscetibilidade das larvas de *Ae. aegypti* quando expostas ao extrato etanol do fármaco nitazoxanida e da espécie botânica *Ruta graveolens*.

A utilização do fármaco nitazoxanida (Annita[®]) como agente larvicida demonstrou resultado satisfatório, tendo sua CL₅₀ determinada na concentração de 10 mg.mL⁻¹. No entanto, ressalta-se que apesar do resultado apresentado ser relevante, é necessário avaliar com cautela o seu uso para tal fim. A utilização do medicamento pode ocasionar possíveis impactos ao meio ambiente, principalmente quando lançado nos recursos hídricos. Os seus efeitos ou presença no ambiente são ainda desconhecidos, além de ser um problema não legislado, pelo fato dos contaminantes emergentes não estarem incluindo em programas de monitoramento de rotina pelos órgãos ambientais e de saúde, e tampouco estarem inseridos em normativas ou legislações de controle ambiental.

Para a bioatividade em larvas de *Ae. aegypti* utilizando-se o extrato etanol bruto de *Ruta graveolens* a CL_{50} foi determinada como sendo a concentração de 30 mg.mL^{-1} . Os dados apresentados indicam que o extrato bruto etanol de *Ruta graveolens* exibe um potencial para o controle do vetor devido a seu composto denominado chalepensina, apresentando-se como uma alternativa promissora para a redução da infestação da espécie utilizada no presente estudo.

Desse modo, é possível propor a utilização da espécie botânica *Ruta graveolens* como uma alternativa aos produtos químicos sintéticos, visto que, a possibilidade de gerar impactos ambientais é menor, quando comparada a estes compostos.

Assim pode-se concluir que a aplicação prática do presente estudo poderá auxiliar na produção de mosquitos adultos em menor tempo do que seu ciclo de vida atual, sempre que houver uma maior demanda pela aquisição do *Ae. aegypti* para fins científicos.

Ajudará também a desenvolver metodologias eficientes e inovadoras para o controle do vetor em suas diferentes fases de desenvolvimento, oferecendo ao poder público e privado ferramentas eficazes para a redução de casos humanos de doenças provocadas por *arbovírus*.

Os resultados encontrados com este trabalho servem de base para futuros estudos, visando acelerar o ciclo do *Ae. aegypti* com a combinação de fontes alimentícias utilizando precipitado de caseína e água de coco. Sugere-se também, investigar a combinação dos extratos etanol de *Ruta graveolens* e nitazoxanida afim de verificar um possível efeito aditivo propiciando aumento da potencialização dos efeitos frente as cepas de *Ae. aegypti*.

REFERÊNCIAS

ACIOLE, S.D.G. **Avaliação da atividade Inseticida dos óleos essenciais das Plantas Amazônicas Annonaceae, Boraginaceae e de Mata Atlântica Myrtaceae como alternativa de controle às larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).** 2009. 86f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) - Universidade de Lisboa. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10451/1418>>. Acesso em: 25 maio. 2017.

AGAIS.COM. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal.** Disponível em: <http://www.agais.com/normas/riispoa/riispoa_titulo8a.pdf>. Acesso em: 24/6/2018.

ANDERSON, V. R.; CURRAN, M. P. **Nitazoxanide: a review of its use in the treatment of gastrointestinal infections.** *Drugs*, v. 67, n. 13, p. 1947-1967, 2007.

ANDRADE A.C, LEITE I.C.G, VIEIRA M.T, COIMBRA E.S, TIBIRIÇÁ S.H.C, RODRIGUES V. O. **Ensaio clínico randomizado controlado duplo-cego da nitazoxanida no tratamento do poliparasitismo intestinal.** *Cad Saúde Colet* 2011; 19: 139-46.

ANNITA: **Nitazoxanida.** Farm. Resp: Dra. Marcia Weiss I. Campos. CRF-RJ nº 4499. Rio de Janeiro: Farmoquímica S/A, [2015]. Bula de remédio.

ARAGÃO.W.M. **A importância do coqueiro-anão verde.** Petrolina: Embrapa , 2000. (Coletâneas Rumos & Debates). Disponível em: < <http://www.embrapa.br> >. Acesso em: 22/8/2018.

ASHIRU, O.; HOWE, J. D.; BUTTERS, T. D. **Nitazoxanide, an antiviral thiazolide, depletes ATP-sensitive intracellular Ca²⁺ stores.** *Virology*, v. 462–463, p. 135–148, 2014. Academic Press. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682214002293>>. Acesso em: 23/8/2018.

BARNETT, R. **Dengue.** *The Lancet*, v. 390, n. 10106, p. 1941, 2017. Elsevier. Disponível em: <<https://www-sciencedirect-com.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S014067361732651X?via%3Dihub>>. Acesso em: 19/5/2018.

BELCHIOR BRASIL, R.; NICOLAU, E. S.; CABRAL, J. F.; PEREIRA, M. A.; SILVA, D. **Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino.** *Ciência Animal*, v. 25, n. 2, p. 71–80, 2015. Disponível em: <http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo06_2015_2.pdf>. Acesso em: 24/6/2018.

BEZERRA, J. R. M. V.; RIGO, M.; RAYMUNDO, M. D. S.; BASTOS, R. G. **Introdução à tecnologia de leite e derivados.** , 2010. Disponível em: <<http://www2.unicentro.br/editora/files/2012/11/raniere.pdf>>. Acesso em: 24/6/2018.

BRASIL. **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas.** Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2001. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf>. Acesso em: 29 Junho. 2018.

BROSTROM, M. A.; BROSTROM, C. O. **Calcium dynamics and endoplasmic reticular function in the regulation of protein synthesis: implications for cell growth and adaptability.** Cell Calcium, v. 34, n. 4–5, p. 345–363, 2003. Churchill Livingstone. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143416003001271>>. Acesso em: 23/8/2018.

BUENO, V. .; ANDRADE, C. F. . **Avaliação preliminar de óleos essenciais de plantas como repelentes para *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae).** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 12, n. 2, p. 215–219, 2010. Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722010000200014&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 13 agosto. 2017.

CAMPOS, J. M.; OLIVEIRA, D. M. DE; DE, E. J.; FREITAS, A.; NETO, A. C. **Arboviroses de importância epidemiológica no Brasil Main arboviruses of epidemiological importance in Brazil.** , v. 1, n. 1, p. 36–48. Disponível em: <[https://repositorio.observatoriodocuidado.org/bitstream/handle/1486/1/Arboviroses de importância epidemiológica no Brasil.pdf](https://repositorio.observatoriodocuidado.org/bitstream/handle/1486/1/Arboviroses%20de%20importancia%20epidemiologica%20no%20Brasil.pdf)>. Acesso em: 24/8/2018.

CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS. Epidemiology | **Dengue** | CDC. .Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html>>. Acesso em: 21 agosto. 2017.

CETESB. **Informações ecotoxicológicas.** Disponível em: <http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ECO_HELP.htm>. Acesso em: 20 agosto. 2018.

COELHO. N. PORTAL DA SAÚDE. **Saúde pública novo guia de manejo clínico para chikungunia.** 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/27035-saude-publica-novo-guia-de-manejo-clinico-para-chikungunya>>. Acesso em: 21 outubro. 2017.

COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS. CONITEC. **Proposta de protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para chikungunya escopo**. 2017. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Protocolos/propostaEscopo_PCDT_Chikungunya_enquete.pdf>. Acesso em: 21outubro. 2017.

DANGIN, M.; BOIRIE, Y.; GARCIA-RODENAS, C.; et al. **The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention**. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, v. 280, n. 2, p. E340–E348, 2001. American Physiological Society Bethesda, MD . Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.2001.280.2.E340>>. Acesso em: 21/8/2018.

DRUGBANK. Disponível em <http://www.drugbank.ca/>. Acesso em: 27 junho. 2018.

DUTTA, T. K.; PARIJA, S. C.; DUTTA, J. K. **Emerging and Re-emerging Infectious Diseases**. 1 Edit ed. 2012.

ELAZAR, M. et al. **Nitazoxanide (NTZ) is an inducer of eIF2a and PKR phosphorylation**. Hepatology, v. 48, 2008.

FIOCRUZ. **LEISHMANIOSE**. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/leishmaniose>>. Acesso em: 24/8/2018.

FONTANA, J. D; et al. **O mosquito *aedes spp*: controle do vetor das Febres Dengue, Amarela e Chikungunya, Mayaro e do vírus Zika**. Curitiba: CRV, 2017. 180 p.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. **Dengue**. (2010). Disponível em:< http://www.funasa.gov.br/site/wp-content/uploads/2010/01/dengue_%20guia_vig_epid.pdf>. Acesso em: 05 maio. 2017.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. **Dengue. Instruções para pessoal de combate ao vetor. Manual de normas técnicas**. (2001). Disponível em: < http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf >. Acesso em: 07 maio. 2017.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários**. Química Nova, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, out. 2007.

GRZYBOWSKI, A. **A ação combinada de fitolarvicidas para o controle do vetor da febre da dengue, *Aedes aegypti***. 2011. 145f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná. Disponível em: <<http://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/26702?show=full>> Acesso em: 01 abril. 2017.

HARTMANN, T. **Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanism view**. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Netherland, v. 80, p. 177-188, mar. 1996.

HIGGS, S. and B.J. BEATY, **Natural cycles of vector-borne pathogens. *Biology of disease vectors***, 2005. 2: 167-185.
 HOFFMAN P.S, SISSON G, CROXEN M.A, WELCH K, HARMAN W.D, CREMADES N. et al. **Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni***. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 3:868-76.

HUANG, J.; LIU, X.; LAN, Q.; et al. **Proteomic profile of coconuts**. *European Food Research and Technology*, v. 242, n. 3, p. 449–455, 2016. Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00217-015-2556-1>>. Acesso em: 24/6/2018.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ (IOC/Fiocruz). **Módulo 1 | O Aedes e sua história | *Aedes aegypti* - Introdução aos aspectos científicos do vetor**. Disponível em: <<http://auladengue.ioc.fiocruz.br/?p=68>>. Acesso em: 06 maio. 2017a.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ (IOC/Fiocruz). **Módulo 2 | Biologia do *Aedes* / *Aedes aegypti***. Disponível em:< <http://auladengue.ioc.fiocruz.br/?p=72>>. Acesso em: 06 maio. 2017b.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ (IOC/Fiocruz). **Dengue, vírus e vetor**. Disponível em:< <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/sobreovirus.html>>. Acesso em: 06 maio. 2017c.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ (IOC/Fiocruz). **Módulo 5 | Estratégias de controle do vetor | *Aedes aegypti* - Introdução aos aspectos científicos do vetor**. Disponível em: <<http://auladengue.ioc.fiocruz.br/?p=86>>. Acesso em: 07 maio. 2017d.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ (IOC/Fiocruz). **Dengue**. <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/>. Acesso em: 29 junho. 2018.

JANSEN, C.C. e BEEBE, N.W. **The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next**. *Microbes and Infection* 12(4): 272-279, 2010.

KARP, G.; CESARIO, M. D.; WAKO, A. P.; et al. **Biologia celular e molecular : conceitos e experimentos**. Manole, 2005.

LIMA, E.P; et al. **Resistência do Aedes aegypti ao temefós em Municípios do Estado do Ceará**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 39, n. 3, p. 259–263, 2006. SBMT. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822006000300006&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 13 agosto. 2017.

LIMA, E. B. C.; SOUSA, C. N. S.; MENESES, L. N.; et al. **Cocos nucifera (L.) (Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 48, n. 11, p. 953–964, 2015. h. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2015001100953&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 24/6/2018.

MACIEL, M. .; et al. . **Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 12, n. 1, p. 105–112, 2010. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722010000100015&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 18 agosto. 2017.

MARTÍNEZ, I. M.; CHRISPHEELS, M. J. **Genomic analysis of the unfolded protein response in Arabidopsis shows its connection to important cellular processes**. The Plant cell, v. 15, n. 2, p. 561–76, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12566592>>. Acesso em: 25/8/2018.

MENEZES, W.; INGRID, A.; ISBERNER, V.; MÉRCIA DE OLIVEIRA, E.; ENA, C. **ÁGUA-DECOCO**. , 2001. Disponível em: <www.cpatc.embrapa.br>. Acesso em: 22/8/2018.

MCCOLL, K.E. **Clinical practice. Helicobacter pylori infection**. The New England Journal of Medicine, v. 362, n. 17, p. 1597-1604, 2010.

MALESUIK, M. D. **Nitazoxanida: Desenvolvimento e validação de métodos**. 2010. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Farmácia Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/60790/000742777.pdf;jsessionid=F3D53637F77B9F66BDE7BBF8D7B1FCD8?sequence=1>>. Acesso em: 26/6/2018.

MÉLO, M.E.B.de. **Investigação da genotoxicidade de larvicidas biológicos e sintéticos utilizados para o controle de aedes aegypti**. 2009. 129f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, Pernambuco. Disponível em: <<http://www.cpqam.fiocruz.br/bibpdf/2009melo-meb.pdf>> Acesso em: 09 abril. 2017.

MENDONÇA, F. DE A.; SOUZA, A. V. E; DUTRA, D. DE A. **Saúde pública, urbanização e dengue no Brasil**. Sociedade & Natureza, v. 21, n. 3, p. 257–269, 2009. Sociedade & Natureza. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1982-45132009000300003&lng=pt&tlng=pt> Acesso em: 31 maio. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. (2005). Disponível em: <http://mosquito.saude.es.gov.br/Media/dengue/Arquivos/Guia_Vigilancia.pdf>. Acesso em: 06 maio. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Saúde pública novo guia de manejo clínico para chikungunya**. 2015 .Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/27035-saude-publica-novo-guia-de-manejo-clinico-para-chikungunya>>. Acesso em: 21 outubro. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Febre Amarela**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/descricao-da-doenca-febre-amarela>>. Acesso em: 14 maio. 2017a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação Epidemiológica / Dados**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-febre-amarela>>. Acesso em: 14 maio. 2017b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 23 de 2018**. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/06/Monitoramento-dos-casos-de-dengue-23-018.pdf>>. Acesso em: 19/9/2018.

MWENIFUMBO, J. C.; KOUDESI, N. AL; HO, M. K.; et al. **Novel and established CYP2A6 alleles impair in vivo nicotine metabolism in a population of Black African descent**. Human mutation, v. 29, n. 5, p. 679–88, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18360915>>. Acesso em: 23/8/2018.

NESTLE. **Ninho. Leites, Compostos Lácteos e Iogurtes | Nestlé**. Disponível em: <<https://www.nestle.com.br/marcas/ninho>>. Acesso em: 21/8/2018.

OCTÁVIO, A. V. **O Leite e seus derivados**. 2001. Disponível em: <[https://www.cca.ufscar.br/~vico/O LEITE E SEUS DERIVADOS.pdf](https://www.cca.ufscar.br/~vico/O%20LEITE%20E%20SEUS%20DERIVADOS.pdf)>. Acesso em: 24/6/2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. OMS | **Doença do vírus Zika**. .WHO, 2016. World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/pt/>>. Acesso em: 21 outubro. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Dengue**. <<http://www.who.int/topics/dengue/es/>>. Acesso em: 01 maio. 2017b.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. OPAS/OMS Brasil. **Pequenas bactérias podem ajudar a deter a propagação do vírus zika?** Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5325:pequenas-bacterias-podem-ajudar-a-deter-a-propagacao-do-virus-zika?&catid=1272:noticiasdtent&Itemid=816>. Acesso em: 01 maio. 2017.

ORLANDA, J. F. F. **Estudo da composição química e atividade biológica do óleo essencial de Ruta graveolens Linneau (Rutaceae)**. (2011). 122f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, Paraíba. Disponível em: <http://www.quimica.ufpb.br/posgrad/teses/Tese_Jose_Fabio.pdf>. Acesso em: 14 mai. 2017.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. DE A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. **QUALIDADE NUTRICIONAL E ESCORE QUÍMICO DE AMINOÁCIDOS DE DIFERENTES FONTES PROTEICAS**. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/cta/v26n1/28868.pdf>>. Acesso em: 21/8/2018.

PIZARRO, A. M. V. P. de. A. ***Menta x piperita L. e suas potencialidades no controlo do vetor do dengue (Aedes aegypti L.)*** Revisão. Revista de Fitoterapia, v. 13, n. 1, p. 33–47, 2013. Disponível em: <<http://www.fitoterapia.net>>. Acesso em: 09 abril. 2017.

PORTAL DA SAÚDE. **Descrição da Doença**. 2017a. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/descricao-da-doenca-zika>>. Acesso em: 21 outubro. 2017.

PORTAL DA SAÚDE. **Situação Epidemiológica - Dados**. 2017b .Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/1205-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/febre-do-mayaro/20950-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 21 outubro. 2017.

PORTAL DA SAÚDE. **Febre do Mayaro**. 2017c .Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/febre-do-mayaro>>. Acesso em: 21 outubro. 2017.

PUJANANDEZ, L. **Distinguishing dengue presentation**. *Science*, v. 357, n. 6354, p. 882.6-883, 2017. American Association for the Advancement of Science. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.357.6354.882-f>>. Acesso em: 19/5/2018.

QUINTANILLA-LICEA, R.; MATA-CÁRDENAS, B. D.; VARGAS-VILLARREAL, J.; et al. **Antiprotozoal activity against entamoeba histolytica of plants used in northeast mexican traditional medicine. bioactive compounds from lippia graveolens and ruta chalepensis.** *Molecules*, v. 19, n. 12, p. 21044–21065, 2014.

REFLORA. **Lista do Brasil - *Cocos nucifera* L.** .Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB80541>>. Acesso em: 24/6/2018.

ROBERTO, E.; PEDROSO, P. **Infecções emergentes e reemergentes.** , v. 19, n. 2, p. 140–150, 2009. Disponível em: <http://www.fmt.am.gov.br/layout2011/dam/h1n1/referencias/Infeccoes_emergentes_e_reemergentes.pdf>. Acesso em: 29 junho. 2018 .

RODRIGUES, V. G. S.; GONZAGA, D. S. DE O. M. **Arruda: (*Ruta graveolens* L.)** - Portal Embrapa. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/983816/arruda-ruta-graveolens-l>>. Acesso em: 23/1/2018.

ROSA, M. D. F.; ABREU, F. A. P. **Água-de-coco - Métodos de Conservação.** , v. 37, p. 36, 2000. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/422074/1/Dc037.pdf>>. Acesso em: 24/6/2018.

ROSSIGNOL, J.-F. **Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent.** *Antiviral Research*, v. 110, p. 94–103, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25108173>>. Acesso em: 23/8/2018.

SANTOS, R. D.; GAGLIARDI, A. C. M.; XAVIER, H. T.; et al. I **Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 100, n. 1, p. 1–40, 2013. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2013000900001>. Acesso em: 21/8/2018.

SHEWRY, P.R.; LUCAS, J.A. **Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens.** *Advances In Botanical Research Incorporating Advances In Plant Pathology*, v. 26, p. 135-192, 1997.

SIMON, F.; JAVELLE, E.; OLIVER, M.; LEPARC-GOFFART, I.; MARIMOUTOU, C. **Chikungunya Virus Infection.** *Current Infectious Disease Reports*, v. 13, n. 3, p. 218–228, 2011. Current Science Inc. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11908-011-0180-1>>. Acesso em: 19/5/2018.

SOARES, A.M.S.; MACHADO, O.L.T. **Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio.** *Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas*, v.1, p.9-19, 2007.

SPQ, S. P. D. Q. E. F. **REVISTA DE CHIMICA PURA E APPLICADA**. Disponível em: <<https://www.spq.pt/magazines/RCPApplicada/478/pdf>>. Acesso em: 10/9/2018.

STASHENKO, E. E.; ACOSTA, R.; MARTINEZ, J. R. **High-resolution gaschromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical-fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.)** J. Biochem. Biophys. Methods v. 43; p. 379–390, 2000.

UENG, Y.-F.; CHEN, C.-C.; CHUNG, Y.-T.; et al. **Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 (CYP)2A6 by chalepsin in recombinant systems, in human liver microsomes and in mice in vivo**. British Journal of Pharmacology, v. 163, n. 6, p. 1250, 2011. Wiley-Blackwell. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3144538/>>. Acesso em: 23/8/2018.

VASCONCELOS, P. F. DA C. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275–293, 2003. SBMT. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822003000200012&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 19/5/2018.

VALLE, D. MARTINS A.J. **Recomendação técnica sobre a interrupção do uso de inseticidas piretróides no controle do *Aedes aegypti* no Brasil**. Rio de Janeiro: IOC-FIOCRUZ, 2011. (nota técnica). Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/media/NotaTecnica%20%20IOC%20v1%20dengue%206%20set%202011.pdf>>. Acesso em: 07 maio. 2017.

VALLE, D. OLIVEIRA, R. L. **Considerações técnicas sobre a aplicação aérea de inseticidas em área urbana**. Rio de Janeiro: IOC-FIOCRUZ, 2016. (nota técnica). Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/media/NT04_2016_IOC_inseticida_aviao_dv_rlo_ppublicacao.pdf>. Acesso em: 06 maio. 2017.

VIEIRA, G. **Dengue, Vírus e vetor**. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/oportunista.html>>. Acesso em: 06 maio. 2017a.

VIEIRA, G. **Ciência para a Saúde da População Brasileira**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=336&sid=32>>. Acesso em: 06 maio. 2017b.

WHITMIRE, S. J. **Água, eletrólitos e equilíbrio ácido-base**. In: MAHAN, L. K.; SCOTT-STUMP, S. Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia. 10.ed. São Paulo: Roca, 2002.

WINK, M. **Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective**. Phytochemistry, Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 3-19, 2003.

XU, L.; STIGE, L. C.; CHAN, K.-S.; et al. **Climate variation drives dengue dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 1, p. 113–118, 2017. National Academy of Sciences. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27940911>>. Acesso em: 19/5/2018.

YONG, J. W. H.; GE, L.; NG, Y. F.; TAN, S. N. **The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (Cocos nucifera L.) Water**. *Molecules*, v. 14, n. 12, p. 5144–5164, 2009. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/14/12/5144/>>. Acesso em: 24/6/2018.

ZARA, L.S.A; et al. **Estratégias de controle do Aedes aegypti: uma revisão**. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, n. 2, p. 1–2, 2016. Disponível em: <http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000200391&scielo=S2237-96222016000200391>. Acesso em: 13 agosto. 2017.

ZOBEL A.M, BROWN SA. **Histochemical localization of furanocoumarins in Ruta graveolens shoots**. *Can J Bot* 1989;67:915-21. 33.