

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS

**Encapsulamento do Óleo Essencial da *Lippia alba* em  
Nanopartículas de Poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) para Avaliação da  
Estabilidade e Atividade Larvicida contra o *Aedes aegypti***

JESSICA MONTENEGRO SANTANA DA SILVA

MANAUS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS

JESSICA MONTENEGRO SANTANA DA SILVA

**Encapsulamento do Óleo Essencial da *Lippia alba* em  
Nanopartículas de Poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) para Avaliação da  
Estabilidade e Atividade Larvicida contra o *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Edgar A. Sanches

MANAUS

2019

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586e

Silva, Jessica Montenegro Santana da  
Encapsulamento do Óleo Essencial da Lippia alba em  
Nanopartículas de Poli-e-caprolactona (PCL) para avaliação da  
Estabilidade e Atividade Larvívica contra o Aedes aegypti / Jessica  
Montenegro Santana da Silva. 2019  
70 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Edgar Aparecido Sanches  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Aedes aegypti. 2. Lippia alba. 3. Óleo essencial. 4.  
Nanoencapsulamento. I. Sanches, Edgar Aparecido II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a **Deus** por ter me proporcionado dois anos incríveis, cheios de bênçãos, oportunidades, descobertas, fé, amor, amigos e ainda, ter me permitido alcançar sonhos e objetivos neste período. Agradeço diariamente pela saúde, pela VIDA, pelo privilégio de abrir os olhos todas as manhãs e ter a chance de realizar todas as minhas tarefas.

Ao meu pai, **Josué** por todo o amor, dedicação, por ter me ensinado que a vida é para ser trilhada com dignidade, respeito ao próximo e humildade. Obrigada por sempre ter acreditado em mim, sem você, com certeza, o caminho até aqui seria mais difícil.

As minhas irmãs, **Beatriz e Rebeca** que estiveram ao meu lado durante esta caminhada.

Ao Prof. **Dr. Edgar A. Sanches**, pela oportunidade única de ter sido sua aluna, por ser paciente, amigo, que pegou muitas vezes na minha mão e me levou até o caminho certo, mas que também me deu vários puxões de orelha quando foi preciso. Obrigada por fazer parte de mais dois anos da minha vida.

Ao Prof. **Francisco Célio**, pela doação das folhas de *Lippia alba* necessárias para a realização deste trabalho.

A Prof. **Tatiane Pereira** pela disponibilidade do equipamento de DLS

Ao meu amigo **Sidney Azevedo**, por ter me ensinado que nada do que buscamos é alcançado sem muito esforço, suor e dedicação.

Aos meus amigos, **Laiane, Josiana e Maxvaldo** pela paciência e ajuda em toda a parte química para que este trabalho fosse concluído com sucesso.

Aos meus amigos de laboratório, **Sidney, Laiane, Josiana, Larissa, Maxvaldo, Bianca, Suzan e Matheus**, quantas amizades construídas e aprendizado adquirido!! Jamais esquecerei dos bons momentos que vivemos juntos.

A **FAPEAM**, pelo apoio financeiro

A todos aqueles que de maneira direta ou indireta, influenciaram meu caminhar e produção científica.

*Que os vossos esforços desafiem impossibilidades,  
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram  
conquistadas do que parecia impossível.*

*Charles Chaplin*

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver nanopartículas biodegradáveis de Poli-ε-caprolactona (PCL) para encapsulamento do óleo essencial da espécie *Lippia alba* utilizando dois tipos de conservantes (NE e benzoato de sódio). A intenção é formular sistemas de liberação controlada que possam agir como eficientes larvicidas frente ao *Aedes aegypti*. A análise cromatográfica (CG-EM) do óleo essencial *in natura* revelou uma composição majoritariamente monoterpênica constituída por Carvona (54,54%) e Limoneno (21,49%). O óleo essencial não apresentou atividade antioxidante frente ao radical DPPH, nem enzimática para a AChE. Testes larvicidas foram realizados com o óleo essencial *in natura* revelando CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> próximas a 106 e 130 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. O método de nanoprecipitação se mostrou eficiente, resultando em elevado percentual de encapsulamento do óleo essencial. Através das técnicas de AFM e DLS foi possível estimar o diâmetro médio das nanopartículas desenvolvidas, o qual foi estimado em torno de (136 ± 2) nm para as nanopartículas vazias e em torno de (266 ± 6) nm para aquelas com óleo essencial encapsulado. O valor do potencial zeta ficou em torno de -8,02 mV para pH = 4. Medidas de FTIR possibilitaram a identificação dos principais estiramentos das moléculas majoritárias, além da constatação qualitativa da eficiência de encapsulamento. Estudos de estabilidade foram realizados através do monitoramento do pH, condutividade elétrica e eficiência de encapsulamento ao longo do tempo. Foi observado que os sistemas avaliados (contendo 500 µg.mL<sup>-1</sup> de óleo essencial encapsulado e conservante NE ou benzoato de sódio) foram estáveis por 50 dias. Em contrapartida, o sistema contendo a mesma concentração de óleo e sem conservante permaneceu estável por 30 dias. Os ensaios de liberação controlada foram realizados em diferentes pH (4, 7 e 10), mostrando que a liberação é mais rápida em pH neutro e básico, pois estes causam desestabilização do sistema devido à sua aproximação com o ponto isoelétrico. Testes larvicidas foram realizados com o intuito de avaliar o efeito da formulação frente as larvas do *Aedes aegypti*. Observou-se que a CL<sub>90</sub> foi mantida nos ensaios larvicidas. No entanto, o tempo de mortalidade das larvas foi menor que aquele observado nas curvas de liberação. Esses dados sugerem uma possível ingestão das nanopartículas contendo óleo encapsulado, mostrando que a formulação desenvolvida representa uma alternativa eficaz de controle de larvas de *A. aegypti*.

**Palavras-chave:** *Aedes aegypti*. *Lippia alba*. Óleo essencial. Nanoencapsulação.

## ABSTRACT

The aim of this work was to develop biodegradable nanoparticles of Poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) to encapsulate the essential oil of *Lippia alba* species using two types of preservatives (NE and sodium benzoate). The intention is to formulate controlled release systems that can act as efficient larvicides against *Aedes aegypti*. The chromatographic analysis (GC-MS) of the essential oil *in natura* revealed a composition mainly monoterpenic constituted by Carvone (54,54%) and Limonene (21,49%). The essential oil presented no antioxidant activity against the DPPH radical, nor was enzymatic for AChE. Larvicidal tests were performed with *in natura* essential oil revealing CL<sub>50</sub> and CL<sub>90</sub> about 106 and 130  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. The nanoprecipitation method was efficient, resulting in a high percentage of encapsulation of the essential oil. Through the AFM and DLS techniques, it was possible to estimate the average diameter of the developed nanoparticles, which was estimated around  $(136 \pm 2)$  nm for empty nanoparticles and around  $(266 \pm 6)$  nm for those with encapsulated essential oil. The value of the zeta potential was around -8.02 mV for pH = 4. FTIR measures allowed the identification of the main stretches of the majority molecules, besides the qualitative verification of the encapsulation efficiency. Stability studies were performed by monitoring pH, electrical conductivity and encapsulation efficiency over time. It was observed that the evaluated systems (containing 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of encapsulated essential oil and NE preservative or sodium benzoate) were stable for 50 days. In contrast, the system containing the same concentration of oil and without preservatives remained stable for 30 days. The controlled release assays were performed at different pHs (4, 7 and 10), showing that the release was faster at neutral and basic pH because they cause destabilization of the system due to its approximation with the isoelectric point. Larvicidal tests were carried out with the purpose of evaluating the effect of the formulation against larvae of *A. aegypti*. It was observed that CL<sub>90</sub> was maintained in the larvicidal assays. However, the mortality time of the larvae was smaller than that observed in the release curves. These data suggest a possible ingestion of nanoparticles containing encapsulated oil, showing that the proposed formulation is an effective alternative for *A. aegypti* larvae control.

**Keywords:** *Aedes aegypti*. *Lippia alba*. Essential oil. Nanoencapsulation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mudança de fases que compõem o ciclo evolutivo do <i>Aedes aegypti</i> . ....	17
Figura 2: Distribuição mundial de <i>Lippia alba</i> . ....	21
Figura 3: <i>Lippia alba</i> . ....	21
Figura 4: Representação esquemática da preparação da formulação pela técnica de nanoprecipitação. ....	37
Figura 5 : Curva de calibração do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> . ....	39
Figura 6 : Cinética de extração das folhas de <i>Lippia alba</i> . ....	41
Figura 7: Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> . ....	43
Figura 8: Estruturas químicas presentes no óleo essencial de <i>Lippia alba</i> . ....	43
Figura 9: Imagens de topografia para (a) nanopartículas de PCL vazias e (b) nanopartículas carregadas com óleo essencial. ....	48
Figura 10: Espectro de FTIR do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> (curva vermelha), nanopartículas carregadas com óleo essencial (curva verde) e nanopartículas sem o óleo essencial (curva azul). ....	51
Figura 11: Monitoramento da eficiência de encapsulamento das formulações em função do tempo. ....	53
Figura 12: Liberação controlada do óleo essencial da <i>L. alba</i> . ....	55
Figura 13: Avaliação do pH ao longo do tempo para os sistemas avaliados. ....	57
Figura 14: Avaliação da condutividade elétrica dos sistemas avaliados. ....	59



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Interpretação dos mecanismos de liberação por difusão .....	31
Tabela 2: Concentrações utilizadas na preparação da formulação das nanopartículas .....	37
Tabela 3: Substâncias identificadas no óleo essencial da <i>Lippia alba</i> e seus respectivos percentuais .....	44
Tabela 4: Valores de CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> do óleo essencial de <i>Lippia alba in natura</i> contra larvas <i>Aedes aegypti</i> .....	46
Tabela 5: Tamanho médio das nanopartículas e potencial Zeta em diferentes pH .....	49
Tabela 6: Parâmetros da cinética de liberação <i>in vitro</i> de acordo com o modelo de Korsmeyer-Peppas .....	56
Tabela 7: Ensaio de eficácia larvicida da formulação contendo conservante NE e em diferentes proporções água/formulação.....	61

## LISTA DE SIGLAS

AChE - Acetilcolinesterase

AChI -Iodeto de Acetilcolina

AFM - Microscopia de Força Atômica

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Bti -*Bacillus thuringiensis sorovar israelensis*

CAM - Centro de Apoio Multidisciplinar

CG-EM - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas

CI - Concentração Inibitória

CL - Concentração Letal

DENV 1 a 5 - Dengue vírus sorotipos 1 a 5

DLS –Dynamic Light Scattering

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrihydrazyl

DP - Desvio Padrão

EE - Eficiência de Encapsulamento

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FTIR - Espectroscopia na Região Infravermelho com Transformada de Fourier

HCl - Ácido clorídrico

IHC – International Conference on Harmonisation

LCS-UCI - Limite de Confiança Superior - Limite de Confiança Inferior

LMD-CSAS - Laboratório de Malária e Dengue

NE - Fenoxietanol/2-metil-2H-isotiazolin-3-ona

PCL – Poli- $\epsilon$ -caprolactona

PDI – Índice de Polidispersão

TWEEN 80® - Monolaurato de polioxietilenosorbitano

WHO - World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1 Objetivos Gerais .....	16
2.2 Objetivos Específicos .....	16
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
3.1 O vetor <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	17
3.2 Óleos essenciais .....	19
3.3 <i>Lippia alba</i> .....	21
3.3.1 Variação química da espécie <i>Lippia alba</i> .....	22
3.3.2 Propriedades biológicas do óleo essencial da <i>Lippia alba</i> .....	23
3.4 Nanotecnologia .....	24
3.4.5 Modelos de liberação controlada .....	29
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
4.1 Óleo essencial .....	32
4.1.1 Coleta e identificação do material vegetal.....	32
4.1.2 Extração de óleo essencial .....	32
4.1.3 Determinação das propriedades físicas do óleo essencial .....	32
4.1.4 Identificação química e quantificação dos componentes do óleo essencial da <i>Lippia alba</i> por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG/EM) .	33
4.1.5 Atividade antioxidante do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrizil hidrazil) ...	34

4.1.6 Ensaio enzimático inibitório de acetilcolinesterase (AChE) .....	34
4.1.7 Bioensaio Larvicida do óleo <i>in natura</i> .....	34
4.2 Desenvolvimento das nanopartículas encapsulantes .....	35
4.2.1 Síntese das nanopartículas pelo método de nanoprecipitação .....	36
4.2.2 Microscopia de Força Atômica (AFM) .....	37
4.2.3 DLS e Potencial Zeta .....	38
4.2.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	38
4.2.5 Eficiência de encapsulamento para sistemas abertos.....	38
4.2.6 Liberação controlada do óleo essencial nanoencapsulado.....	39
4.2.7 Estudo de estabilidade .....	40
4.2.8 Eficiência larvicida da formulação .....	40
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
5.1 Caracterização do óleo essencial da <i>L. alba</i> .....	41
5.1.1 Determinação das propriedades físicas.....	41
5.1.2 Determinação dos constituintes químicos do óleo essencial .....	42
5.1.3 Atividade antioxidante do radical DPPH· (2,2-difenil-1-picrilil hidrazil)..	45
5.1.4 Ensaio inibitório de acetilcolinesterase (AChE).....	45
5.1.5 Bioensaio Larvicida do óleo <i>in natura</i> .....	46
5.2 Caracterização das nanopartículas poliméricas .....	47
5.2.1 Microscopia de Força Atômica (AFM) .....	47
5.2.3 Análise de DLS e Potencial Zeta .....	49

5.2.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	50
5.2.5 Eficiência de encapsulamento para sistemas abertos.....	52
5.2.6 Liberação controlada do óleo essencial nanoencapsulado.....	54
5.3 Estabilidade das formulações .....	56
5.4 Bioensaio larvicida da formulação contendo o óleo essencial encapsulado....	60
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>64</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças virais humanas transmitidas pelo vetor *Aedes aegypti*, como dengue, zika e chikungunha, vêm causando sérios problemas de saúde pública, principalmente em países subdesenvolvidos. Ainda não foram desenvolvidos medicamentos para o tratamento e nenhuma vacina eficaz para uso humano. Torna-se necessário, portanto, a busca por produtos alternativos, principalmente aqueles baseados em recursos naturais explorados de forma sustentável e com uso de nanotecnologia, visando o controle da densidade populacional das larvas, uma vez que o uso contínuo de inseticidas químicos vem causando resistência desses mosquitos.

Uma alternativa aos agrotóxicos convencionais tem sido o uso de óleos essenciais produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, os quais possuem substâncias capazes de agir por repelência, inibição de alimentação, deformidades e mortalidade de microorganismos em diversas fases. Por isso, a procura por ativos naturais vem se intensificado, visando o controle alternativo de microorganismos, tornando-os potencialmente apropriados para uso em programas de manejo integrado de pragas, além de apresentar baixíssima toxicidade e possibilidade de resistência de pragas (COSTA *et al.*, 2005).

O gênero *Lippia* é amplamente conhecido e estudado por apresentar componentes químicos variados, contendo metabólitos especiais que despertam a curiosidade de vários pesquisadores. A *Lippia alba*, conhecida popularmente como “erva-cidreira”, é uma planta extensivamente utilizada como alternativa terapêutica. Devido ao seu amplo potencial farmacológico, esta espécie vem sendo objeto de pesquisa em diferentes áreas, além do constante interesse comercial originado pela diversidade de seus componentes químicos (JULIÃO *et al.*, 2003). No entanto, devido à elevada instabilidade dos óleos essenciais frente à fotodegradação e volatilidade, uma das alternativas para preservar suas propriedades ativas até o momento de sua exposição ao meio se dá através de técnicas de encapsulamento. Esta técnica permite proteger e compartimentalizar o agente ativo no interior de nano/micropartículas que atuam como materiais de parede, aumentando a estabilidade química das substâncias e prolongando o tempo de atividade.

Durante o processo de liberação controlada, a exposição do princípio ativo pode acontecer pelo rompimento do material de parede, atingindo o meio externo. Neste ponto, é muito importante conhecer as concentrações letais do ativo encapsulado para que esta

concentração mínima seja liberada no momento de exposição, garantindo a eficácia da formulação desenvolvida (SOPPIMATH; AMINABHAVI; KULKARNI, 2001).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo extrair, identificar e quantificar os constituintes químicos do óleo essencial da erva cidreira coletados na região do Amazonas, afim de avaliar seu potencial bioativo frente às larvas testadas. Além disso, foi desenvolvido um sistema adequado de nanopartículas polimérica biodegradáveis baseadas em poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) para servir como carreador do óleo essencial, protegendo-o do meio externo até o momento de sua liberação. Visando o maior tempo de estabilidade do sistema, foram testados dois conservantes (NE e benzoato de sódio). Adicionalmente, alguns parâmetros de estabilidade como eficiência de encapsulamento, pH, turbidez e condutividade elétrica também foram avaliados ao longo do tempo para determinar qual o sistema que mantém suas propriedades físicas por mais tempo. Por fim, o sistema mais estável foi testado contra as larvas do *Aedes aegypti* para avaliarmos a eficácia da formulação final desenvolvida.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver nanopartículas poliméricas biodegradáveis para servirem de carreadores do óleo essencial da espécie *Lippia alba* visando o combate de larvas do *Aedes aegypti* através da liberação controlada do ativo natural.

### 2.2 Objetivos Específicos

- i.** Extrair o óleo essencial das folhas da *Lippia alba* por hidrodestilação;
- ii.** Caracterizar as propriedades físicas do óleo essencial *in natura*, como índice de refração, densidade, rendimento e cinética de extração;
- iii.** Determinar a composição química do óleo essencial através da análise de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM);
- iv.** Avaliar as atividades antioxidante (DPPH) e enzimática (AChE) do óleo essencial;
- v.** Estimar as concentrações letais CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> do óleo essencial *in natura* frente as larvas do *Aedes aegypti*;
- vi.** Desenvolver um sistema de nanopartículas poliméricas biodegradáveis apropriado para encapsular o óleo essencial;
- vii.** Caracterizar morfologicamente as nanopartículas através da técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM) e determinar a distribuição de tamanhos dos diâmetros, índice de polidispersividade e potencial zeta;
- viii.** Utilizar a técnica de FTIR para caracterizar as formulações sob o ponto de vista da estrutura molecular e também para avaliar qualitativamente a eficiência de encapsulamento do óleo essencial;
- ix.** Realizar testes de estabilidade a 25°C do sistema contendo o óleo essencial encapsulado (eficiência de encapsulamento, pH, turbidez e condutividade elétrica) utilizando diferentes conservantes;
- x.** Avaliar a eficácia da formulação desenvolvida frente às larvas de *Aedes aegypti*.



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Uma das principais vertentes de pesquisas atuais está relacionada ao combate/controlado de vetores de doenças utilizando metodologias que interrompam o ciclo de reprodução e, ao mesmo tempo, sejam menos agressivas ao homem e ao meio ambiente. Além disso, a inserção de nanotecnologia nessas metodologias tem se tornado um fator primordial para agregar valor e eficácia aos métodos desenvolvidos. Abaixo será abordada uma breve revisão bibliográfica sobre (i) o vetor *Aedes aegypti*, (ii) as características particulares da espécie *Lippia Alba*, (iii) óleos essenciais como possíveis alternativas no combate de pragas, e também uma breve introdução sobre (iv) o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas biodegradáveis.

#### 3.1 O vetor *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

Os países em desenvolvimento têm sofrido consideravelmente com as doenças transmitidas pelo vetor *A. aegypti*. O comportamento das espécies de mosquito é estritamente urbano e holometábolo, isto é, passa pelas seguintes fases: ovo, larva (quatro estágios), pupa e adultos. São encontradas em praticamente todas as regiões do mundo, apresentando ampla incidência nos climas tropicais e subtropicais, onde as condições climáticas contínuas permitem sua rápida proliferação e sobrevivência (FORATTINI, 1995). A Figura 1 ilustra o ciclo evolutivo do *A. aegypti*.



Figura 1: Mudança de fases que compõem o ciclo evolutivo do *Aedes aegypti*.  
FONTE: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/15830>, acesso em: 28 de março 2018.

Dentro da temática da entomologia médica, esses insetos são os que mais têm atraído a atenção da saúde pública no cenário mundial, pois são responsáveis pela transmissão de diversas doenças infecciosas à espécie humana, em especial, a dengue, febre amarela, febre chikungunya, zika, entre outras arboviroses (FORATTINI, 1995).

Atualmente, a dengue é a arbovirose mais importante do mundo, tendo como agente causador um arbovírus do gênero *Flavivirus* pertencente à família *Flaviviridae*. Hoje existem cinco sorotipos virais bem caracterizados, sendo que os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 são encontrados em maior abundância no Brasil nos últimos 15 anos; o DENV-4 é comumente encontrado na Costa Rica e Venezuela, e o sorotipo DENV-5 foi identificado em 2007 na Malásia, e até o momento não foi registrado no Brasil (MAMANI, 2014).

A dengue é considerada um dos maiores problemas no contexto da saúde pública a nível mundial e coloca em constante ameaça à saúde de milhões de pessoas que residem em áreas urbanas, suburbanas e rurais, especialmente nos países tropicais onde a temperatura e a umidade favorecem a proliferação do mosquito vetor. Por essa razão, existe nesses países uma grande necessidade de estudo e prevenção desta epidemia. Estudos têm provado que o clima influencia a distribuição do mosquito da dengue, sendo fortemente influenciada em períodos de estação chuvosa, aumentando nos períodos de maior precipitação e em climas quentes, nos quais a fêmea adulta digere o sangue mais rapidamente e se alimenta mais frequentemente, aumentando a intensidade da transmissão. Estas características fazem com que maior importância tenha sido dada à região Norte do Brasil, que vem registrando elevados índices das doenças causadas pelo *A. aegypti* nos últimos anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Segundo o Ministério da Saúde, dos 61 municípios do Amazonas, 11 estão em alerta para dengue, zika e chikungunya. Conforme a pesquisa, a capital do Amazonas, juntamente com as cidades de Humaitá e Itacoatiara estão entre os municípios em situação de alerta. No Amazonas, a maior parte dos criadouros encontrados estavam em depósito de água, seguido por depósitos de lixo domiciliar (AMAZONAS, 2018).

Diante deste fato, torna-se preocupante o aumento da ocorrência de grandes epidemias da doença no mundo, além de fatores como o saneamento básico precário e o crescimento desordenado das cidades que potencializam a proliferação dessa espécie de mosquitos (DONALÍSIO; GLASSER, 2002). Diversas pesquisas estão sendo realizadas na busca por novos métodos de controle contra o *A. aegypti*, pois não existe vacina para a doença, e a melhor

forma de combatê-la é atacando o próprio vetor, principalmente eliminando os locais onde ocorre oviposição e o desenvolvimento das larvas. Uma alternativa que vem sendo bastante estudada na última década tem sido o uso de plantas, as quais possuem ação inseticida, larvicida e repelente capazes de alterar o desenvolvimento do mosquito. Esse método de controle tem se mostrado eficaz, de menor impacto ao meio ambiente e à saúde humana (OLIVEIRA, 2008).

Há registros de diversos estudos de óleos de origem vegetal que apresentam atividade larvicida sobre o *A. aegypti* realizados pelo grupo de pesquisa NANOPOL (Laboratório de Polímeros Nanoestruturados), da UFAM. Trabalhos realizados por Silva *et al* (2018) testaram óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em nanopartículas de gelatina, dos quais apresentaram consideráveis taxas de mortalidade sobre as larvas em tempos de 24, 48 e 72 h. O óleo essencial das espécies de *Lippia origanoides* e *Licaria puchury-major* foram avaliados contra três pragas comumente encontradas em países tropicais e subtropicais, entre elas as larvas *A. aegypti*, mostrando que esses óleos essenciais também apresentam expressivas bioatividades (AZEVEDO *et al.*, 2018; MAR *et al.*, 2018).

### 3.2 Óleos essenciais

Óleos essenciais são compostos líquidos voláteis, provenientes do metabolismo secundário das plantas, e que exercem funções necessárias de autodefesa e de atração de polinizadores. São extraídos a partir de material vegetal e dotados de aroma intenso, coloração incolor ou ligeiramente amarelada. Podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências devido às suas características físico-químicas, como volatilidade, que os diferem dos óleos fixos. São solúveis em solventes orgânicos apolares e possuem uma solubilidade limitada em água, apresentando densidade inferior. São substâncias são instáveis à presença de ar, luz, calor, umidade e metais (SIMÕES *et al.*, 2003).

Denominam-se tricomas glandulares as “bolsas” onde os óleos essenciais ficam armazenados e, dependendo da família da planta, os óleos essenciais podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas. No caso da *Lippia alba*, Santos e colaboradores (2004) observaram que o óleo essencial está presente nos tricomas secretores capitados, nos tricomastectores simples e ainda nas células do parênquima. Deve-se ressaltar que a composição química de um óleo volátil, obtida de um mesmo órgão de uma mesma espécie

vegetal, pode variar consideravelmente influenciando no seu rendimento. Dentre estes fatores podemos destacar os climáticos, composição do solo, idade e desenvolvimento da planta, período e condições de armazenamento.

No geral, os óleos essenciais são formados por misturas complexas de mono e sesquiterpenos (10 e 15 átomos de carbono) de fenilpropanóides, acrescidos de moléculas menores, como álcoois, aldeídos e cetonas de cadeias curtas

A demanda por óleos essenciais está em franca ascensão por serem produtos em crescente valorização, sendo empregados em diversas áreas, como na indústria farmacêutica para adicionar sabor ou cheiro ou suprimir sabor menos desejável. Na indústria de alimentos vêm sendo usados como aromatizantes. Na indústria cosmética são empregados como fixadores para a composição de perfumes. No setor agrícola, no controle alternativo de pragas e doenças e na moda, são liberados durante a utilização das peças em couro, bolsas, cintos e roupas. Além disso, os óleos essenciais vêm sendo encapsulados nos mais diferentes tipos de micro/nanopartículas visando o estudo em diferentes aplicações tecnológicas.

No setor agrícola, por exemplo, o desenvolvimento de nanopartículas de quitosana carregadas com o óleo essencial de orégano tem apresentado eficiência fungicida no combate de agentes fúngicos como *Alternaria alternata*, substituindo o uso de fungicidas sintéticos. Esses fungicidas tradicionais vem causando grandes prejuízos nas frutas e vegetais frescos pós-colheita, resistência aos patógenos, bem como o acúmulo de resíduos químicos no solo e na água, além de efeitos cancerígenos na saúde humana (YILMAZ *et al.*, 2019).

Na área alimentícia o uso do nanoencapsulamento de compostos ativos, como o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, tem apresentado a capacidade antioxidante e antimicrobiana em carnes bovinas, estendendo a preservação de carne, diminuindo as substâncias indesejáveis e o uso de antioxidantes sintéticos, que vem sendo questionado devido ao seu potencial efeito colateral (HADIAN *et al.*, 2017).

### 3.3 *Lippia alba*

A espécie *Lippia alba* é uma planta medicinal originária da América do Sul e Central, mas também encontrada na Índia, Austrália e sul dos Estados Unidos (Figura 2) (ATTI-SERAFINI, 2002). No Brasil, essa espécie é amplamente distribuída e conhecida como falsa-melissa, erva-cidreira, erva-cidreira-brasileira, salva-limão, alecrim-do-campo, dentre outras (HENNEBELLE *et al.*, 2008).

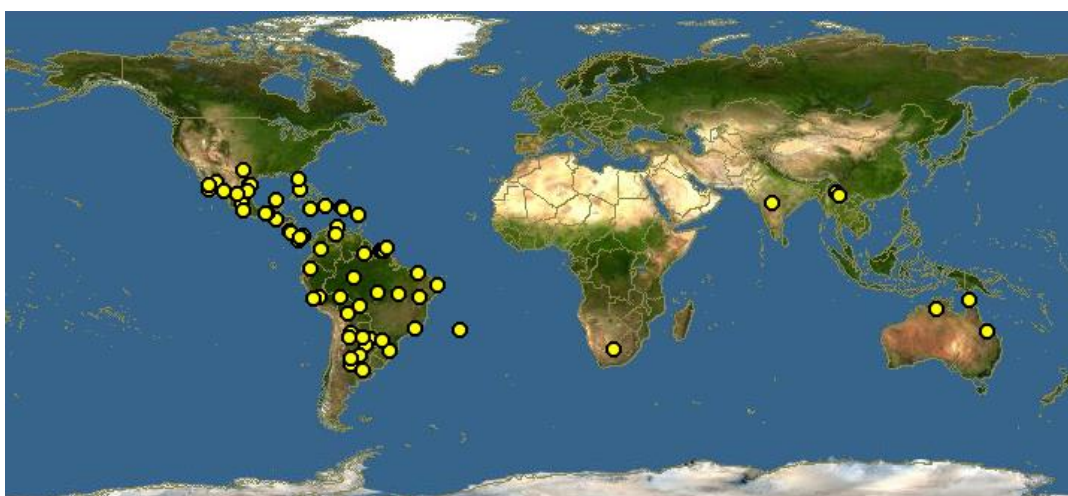


Figura 2: Distribuição mundial de *Lippia alba*.

FONTE: <http://www.discoverlife.org/> acesso em: 28 de março 2018.

A família Verbenaceae compreende aproximadamente 100 gêneros, dentre eles está o de *Lippia* descrito por Linnaeus em 1753, reunindo atualmente cerca de 200 espécies, podendo ser classificadas como herbáceas, subarbustivas e até árvores de pequeno porte, alcançando até 1,5 m de altura (Figura 3) (JOLY, 1987).



Figura 3: *Lippia alba*.

FONTE: HENNEBELLE *et al.*, 2008.

O óleo essencial produzido por essa espécie vem sendo utilizado em indústrias de químicos agrícolas e na medicina por apresentar propriedades sedativas, ansiolíticas, antiulcerosas, antifúngicas, antimicrobianas, antioxidantes, antiespasmódicas e anti-inflamatórias, além de ser utilizada em forma de chás, macerada, em compressas, banhos ou extratos alcoólicos (MOREIRA *et al.*, 2002). De acordo com a Central de Medicamentos (CEME), a *L. alba* é dita como uma das espécies mais utilizadas pela população brasileira devido às suas propriedades medicinais atribuídas aos óleos essenciais contidos em suas folhas (ATTI-SERAFINI, 2002).

Diversos autores têm mostrado através de análises de cromatografia gasosa que a constituição química do óleo essencial da *L. alba* pode ser alterada em função do local de cultivo. Estudos feitos por Gomes e colaboradores (1993) analisaram a composição química do óleo essencial da *L. alba* no estado do Paraná, sendo encontrados  $\gamma$ -terpineno (46,71%), p-cimeno (8,65%),  $\beta$ -cariofileno (7,23%), Mirceno (1,32%), Genarinal (0,69%) e Neral (0,39%). Na Colômbia, Stashenko e colaboradores (2003) analisaram métodos de extração dos óleos voláteis da *L. alba* e identificaram cerca de 39 componentes, sendo a Carvona (51,0%) o componente majoritário. Estudos também revelam que até plantas provenientes da mesma região apresentam composição química diferenciada, sugerindo que além de fatores ambientais, fatores genéticos podem alterar a composição final do óleo essencial (STASHENKO *et al.*, 2003).

### 3.3.1 Variação química da espécie *Lippia alba*

A composição do óleo essencial da *L. alba* é altamente variável, sugerindo a existência de quimiotipos cuja composição nem sempre é coincidente e, por essa razão, muitos autores tentaram classificar os quimiotipos da *L. alba* de acordo com os constituintes majoritários (HENNEBELLE *et al.*, 2008). Como resultado de várias análises morfológicas e químicas, pode-se descrever a existência de três quimiotipos para esta espécie, cada um com uma atividade biológica específica. O primeiro quimiotipo foi caracterizado por elevados teores de mirceno-citral, tendo ação calmante, analgésico e espasmolítico. Similarmente, o segundo quimiotipo limoneno-citral mostrou atividades ansiolíticas e espasmódicas. Por outro lado, o terceiro quimiotipo limoneno-carvona está relacionado com atividade mucolítica e com distúrbios gastrointestinais (YAMAMOTO *et al.*, 2008).

O uso adequado da espécie *L. alba* sugere aplicações promissoras e seu extensivo uso empírico vem despertando o interesse de pesquisadores em estabelecer explicações científicas para tais atividades farmacológicas, o que tem resultado na confirmação de algumas dessas atividades, bem como na detecção de outras propriedades importantes.

### 3.3.2 Propriedades biológicas do óleo essencial da *Lippia alba*

Os óleos essenciais, assim como outros extratos naturais de plantas, vêm sendo considerados como alternativas importantes sob o ponto de vista fitoquímico, particularmente devido à sua grande variabilidade na composição química. Além do uso de plantas medicinais para fins terapêuticos, estudos comprovam que a espécie *L. alba* possui grande potencial biocida. Peixoto *et al* (2015) avaliou o potencial do óleo essencial da *L. alba* sobre o carrapato da espécie *Rhipicephalus(Boophilus) microplus*, responsável por inúmeras perdas econômicas na pecuária bovina. Os autores observaram que os quimiotipos Citral, Carvona e Limoneno apresentaram efetiva atividade larvicida com  $CL_{50}=7,0$  mg/mL,  $CL_{50}=29,8$  mg/mL e  $CL_{50}=31,2$  mg/mL, respectivamente.

Através de análises químicas, um outro estudo realizado com o óleo essencial da *L. alba*, juntamente com um grupo de plantas medicinais brasileiras, reportou sua atividade contra o fungo *Candida albicans*, através da presença de compostos com conhecida atividade antimicrobiana, incluindo o 1,8-cineole, Geranial, Germacreno-D, Limoneno, Linalool e Mentol (DUARTE *et al.*, 2005). Em outras pesquisas relacionadas à atividade antimicrobiana, o óleo essencial da *L. alba* mostrou-se altamente efetivo contra uma bactéria gram-negativa *Aeromonas* frequentemente encontrada em muitas espécies de animais aquáticos (DE SOUZA *et al.*, 2017).

Através de diversas literaturas, são nítidas as vantagens da utilização de inseticidas naturais alternativos quando comparados ao emprego de produtos sintéticos, visto que são obtidos de recursos renováveis, rapidamente degradáveis e apresentam várias substâncias que atuam simultaneamente, fazendo com que o desenvolvimento de resistência das pragas a essas substâncias ocorra de forma lenta e, ainda, sua obtenção é geralmente de fácil acesso (SENA, 2008). Neste contexto, é oportuno investir no desenvolvimento de um produto biodegradável empregando nanotecnologia como uma ferramenta para obtenção de resultados compatíveis quanto à estabilidade, determinação das doses letais, avaliação da liberação controlada a partir

de encapsulamentos em nano/micropartículas, determinação de mecanismos de prolongamento da ação do ativo e redução de toxicidade.

### 3.4 Nanotecnologia

O emprego da nanotecnologia no desenvolvimento de produtos tem permitido ampliar suas aplicações nas mais variadas áreas da pesquisa, impactando diretamente o desenvolvimento tecnológico e econômico. O princípio dessa ciência é que os materiais na escala nanométrica podem apresentar propriedades químicas, físico-químicas e comportamentais diferentes daquelas em maior escala. Vale ressaltar que essas propriedades podem variar de acordo com o tamanho e a forma das partículas (DURAN; CAPPARELLI; MORAES, 2006).

#### 3.4.1 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas podem ser desenvolvidas para atuarem como sistemas carreadores de substâncias ativas. Essas substâncias ativas podem ser encapsuladas, adsorvidas ou dispersas nas mesmas. Dependendo da maneira como são produzidas, o termo nanopartícula pode ser dividido em nanocápsulas e nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural, sendo ambos sistemas carreadores (EL-SAY; EL-SAWY, 2017).

As nanocápsulas são constituídas por uma parede polimérica disposto ao redor de um núcleo oleoso, enquanto que as nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica onde o agente ativo pode estar disperso ou aderido, entretanto não apresenta núcleo oleoso em sua composição (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SOPPIRNATH; AMINABHAVI, 2001).

Estes sistemas funcionam como estratégias eficientes para transportar a substância ativa ao seu local de ação através da escolha de um carreador e da rota adequada, tendo como objetivos principais o de proteger o seu conteúdo de fatores ambientais (luz, umidade, oxigênio e interações com outros compostos), liberação controlada e sob estímulos, tais como mudança de pH, rompimento físico, intumescimento, dissolução etc. Além disso, o encapsulamento também pode mascarar o sabor e/ou odor desagradável e aumentar o tempo de atuação do



composto ativo, prolongando seu efeito. Neste caso, o tipo de nanopartícula e o local em que a substância ativa estará (adsorvido na superfície ou não) dependerão das características finais desejadas, como aplicação, tamanho, distribuição de tamanho, grau de biodegradação e compatibilidade do polímero com a substância ativa.

O nanoencapsulamento polimérico de compostos naturais, como os óleos essenciais, em geral, vem sendo desenvolvido por uma série de pesquisadores com o intuito de melhorar a estabilidade química, aumentar a atividade destas substâncias e reduzir a volatilização dos mesmos, melhorando seus potenciais biológicos. Neste contexto, pode ser citado um estudo feito por Abreu e colaboradores (2012), que encapsularam o óleo essencial da *Lippia sidoides* utilizando polímeros biodegradáveis para o desenvolvimento de um sistema a ser aplicado contra larvas de *A. aegypti*, apresentando maior eficácia quando comparado com os resultados obtidos para o óleo *in natura*.

#### 3.4.2 Matérias primas utilizadas como materiais de parede no desenvolvimento de nanopartículas

Basicamente, as nanopartículas poliméricas são constituídas por um material polimérico apropriado, tensoativo, substância ativa, além do solvente orgânico que é utilizado no processo de preparação para se obter a formação das partículas e, posteriormente, descartado. No caso de sistemas poliméricos biodegradáveis, o uso de um conservante apropriado também é indicado.

Existem vários tipos de materiais poliméricos utilizados no preparo de nanopartículas. Esses materiais vêm sendo amplamente investigados para possíveis aplicações em sistemas de liberação controlada. Os materiais de parede poliméricos podem ser naturais, tais como a quitosana, gelatina e amido e, dentre os sintéticos, podem ser citados os poliésteres alifáticos, polianidridos e poliortoésteres. Entretanto, os poliésteres alifáticos vem sendo muito utilizados devido à sua disponibilidade, biocompatibilidade, facilidade em incorporar uma ampla variedade de compostos bioativos e biodegradáveis, uma vez que a princípio não causam danos ou impactos ao meio ambiente, (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010a; SINHA *et al.*, 2004).

Os tensoativos, também chamados de surfactantes ou emulsificantes, são fundamentais para evitar agregação das nanopartículas após o preparo, como também durante o armazenamento por promoverem estabilização física e/ou química. São normalmente constituídos por grandes moléculas que apresentam simultaneamente segmentos hidrofóbicos (parte apolar) e hidrofílicos (parte polar), denominados de anfifílicos, promovendo a estabilidade da emulsão através da redução da tensão interfacial em função de sua adsorção na interface. Como resultado desta estrutura anfifílica, o grupo terminal polar das moléculas dos emulsificantes interagem com as moléculas de água, enquanto que o grupo apolar interage com o princípio ativo a ser encapsulado (LENZI et al., 2003).

Os tensoativos, além de atuarem na redução da tensão interfacial, favorecendo a estabilização, é responsável por manter um filme entre as fases (gotícula e a fase externa) exercendo uma barreira física que impede fenômenos como floculação e coalescência (BAIS *et al.*, 2005).

Para a escolha do solvente orgânico mais adequado, deve-se levar em consideração a menor toxicidade, a capacidade de solubilizar o princípio ativo e o polímero, já que alguns métodos exigem utilização de solventes orgânicos miscíveis em água e outros não. Na maioria dos casos, a acetona é o solvente de escolha. Outros solventes como o etanol e o acetato de etila podem ser escolhidos para dissolução do óleo ou do composto bioativo (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010a).

A inclusão de um conservante na formulação é um fator essencial na estabilização, uma vez que os constituintes da formulação, na presença de água, podem permitir a proliferação de uma variedade de microorganismos. Os conservantes impedirão o crescimento e multiplicação desses microorganismos, interferindo no metabolismo microbiano através de vários mecanismos (modificação da permeabilidade da membrana celular, liberação dos constituintes celulares, inibição do metabolismo celular etc.) (ANVISA, 2004).

Um conservante ideal não deve ser adicionado a um produto para mascarar qualquer deficiência nos processos de fabricação, e sim, ser uma parte integrante da formulação escolhida, apresentando uma concentração baixa, ter amplo espectro de atividade, ter atividade bactericida, não ser irritante, apresentar alta solubilidade em água e possuir compatibilidade com os demais componentes da formulação (ALLEN; LOYD; POPOVICH, 2013). No presente trabalho, por exemplo, o conservante NE (que é uma mistura de *Phenoxyethanol/2-Methyl-2H-*

*Isothiazolin-3-one*) é considerado um poderoso biocida usado em uma ampla gama de aplicações industriais, utilizado para controlar o crescimento microbiano em soluções aquosas. O benzoato de sódio geralmente é usado como conservante químico com propriedades fungicidas e bactericidas, prevenindo a degradação causada por esses microorganismos durante o armazenamento. Esses conservantes são reconhecidos como conservantes seguros pelo *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos (REN *et al.*, 2014).

### 3.4.3 Métodos de obtenção de nanopartículas

Embora muitas metodologias de síntese de nanopartículas poliméricas sejam reportadas na literatura, todas elas são baseadas em dois principais grupos: polimerização de monômeros dispersos e dispersão de polímeros pré-formados. Todavia, a dispersão de polímeros pré-formados é um dos métodos mais comumente aplicados para o preparo das nanopartículas poliméricas. Neste grupo há diversas técnicas, dentre as quais se destacam as que utilizam polímeros sintéticos, tais como emulsificação-evaporação do solvente (dupla emulsão evaporação do solvente), *salting-out*, emulsificação-difusão do solvente e nanoprecipitação.

O método da dupla emulsão é adequado para o nanoencapsulamento de ativos com caráter hidrofílico. O método constitui-se em duas etapas. Primeiramente acontece a homogeneização sob alta agitação de duas fases imiscíveis, a fase aquosa contendo um tensoativo disperso e a fase orgânica composta por polímero e ativo e dissolvido em solvente orgânico apolar. A mistura do polímero com o ativo solubilizado é emulsionada com a solução contendo o agente tensoativo formando então, uma emulsão do tipo óleo em água (O/A). A segunda etapa se dá pela evaporação do solvente orgânico realizada geralmente por rota-evaporação, ocorrendo a precipitação do polímero na fase externa aquosa e, conseqüentemente, a formação das nanopartículas.

Os métodos *salting-out* e emulsificação-difusão do solvente são bem semelhantes. No *salting-out*, o solvente orgânico deve ser hidromiscível em solução, como a acetona (SOUTO; SEVERINO; SANT, 2012). No entanto, na emulsificação-difusão do solvente, o solvente orgânico deve ser parcialmente miscível em água como, por exemplo, álcool benzílico (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010b). Sendo assim, o polímero e o ativo devem ser solubilizados sob vigorosa agitação neste solvente. Na fase aquosa, em ambos os métodos deve-

se conter um tensoativo para a estabilização da emulsão. Porém, no *salting-out*, esta fase deve-se apresentar saturada com um não-eletrólito como, por exemplo, a sacarose ou um eletrólito, como o cloreto de magnésio. Posteriormente, a emulsão é diluída em um volume adequado de água que permite a difusão do solvente para a fase orgânica, ocorrendo a precipitação do polímero e formação das nanopartículas. Para esta metodologia, ativos lipofílicos apresentam maiores percentuais de inclusão do que ativos hidrofílicos (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010a).

Em contrapartida, a técnica mais utilizada para encapsulamento de ativos é a de nanoprecipitação ou deslocamento do solvente. Esta técnica se baseia na precipitação do polímero pré-formado após a adição de uma solução orgânica polar do mesmo em um não solvente como a água. Procede-se a dispersão da fase orgânica na fase aquosa sob agitação magnética, ocorrendo uma emulsificação espontânea na formulação pela rápida difusão do solvente que, posteriormente, é eliminado através da evaporação sob pressão reduzida (FESSI *et al.*, 1989; SOPPIRNATH; AMINABHAVI, 2001).

#### 3.4.4 Mecanismos de liberação

Um sistema de liberação controlada é aquele em que o agente ativo é liberado independentemente de fatores externos e com uma cinética bem estabelecida. Os materiais poliméricos geralmente liberam o agente ativo através de alguns mecanismos de liberação que, na prática, podem atuar simultaneamente (LOPES; LOBO; COSTA, 2006). São eles:

- ✓ **Liberação controlada por difusão:** Este mecanismo está relacionado quando o agente ativo rodeado pelo material de parede, difunde-se lentamente através deste. A taxa de liberação depende das propriedades químicas do agente ativo e do material encapsulante, assim como, algumas propriedades físicas do material, como estrutura e porosidade (SANDER; BIZERRA; SILVA, 2015).
  
- ✓ **Liberação ativada por degradação/erosão:** No processo de erosão, o controle químico acontece através da degradação do material de parede, onde a taxa de liberação é dependente da escolha do mesmo (SANDER; BIZERRA; SILVA, 2015).

- ✓ **Ativação:** No mecanismo de ativação, há uma quebra das cadeias poliméricas pela clivagem de suas ligações intermoleculares, de forma que durante este processo de degradação acontece a liberação do agente ativo. Nos sistemas controlados por solvente existe a dispersão ou dissolução do agente ativo na matriz polimérica, a qual pode ser hidrofóbica ou hidrofílica. A liberação do agente ativo pode envolver processos de expansão do polímero, tornando o material mais plástico (SANDER; BIZERRA; SILVA, 2015). Vale ressaltar que, quando são utilizadas matrizes poliméricas hidrossolúveis, ocorre geralmente uma liberação do ativo de forma mais rápida.

#### 3.4.5 Modelos de liberação controlada

Através da investigação do perfil de liberação de agentes ativos em nanopartículas poliméricas foram propostos alguns modelos matemáticos para descrever as características de liberação. Existem vários modelos que representam perfis de liberação:

- ✓ **Ordem zero:** Baseia-se na liberação lenta do agente ativo a partir de matrizes sem que ocorra sua desagregação, ou seja, as formas não são modificadas (LOPES; LOBO; COSTA, 2006). Este modelo pode ser expresso pela seguinte equação:

$$Q_t = Q_0 + K_0 t$$

onde:

$Q_t$  é a quantidade do agente ativo liberado no tempo  $t$ ;

$Q_0$  é a quantidade inicial do agente ativo no meio de liberação;

$k_0$  é a constante de liberação de ordem zero expressa em unidades de concentração em função do tempo;

Num perfil de liberação de ordem zero, a velocidade de difusão do agente ativo do interior para o exterior da matriz polimérica é inferior que a respectiva velocidade de dissolução, formando uma solução saturada permitindo a cedência constante do agente ativo. Porém, a aplicação deste modelo apresenta diversas limitações devido aos poucos fatores de ajuste ao modelo (LOPES; LOBO; COSTA, 2006).

- ✓ **Primeira ordem:** A cinética de primeira ordem é caracterizada por apresentar a liberação do agente ativo de forma proporcional entre a quantidade interna e externa da matriz e também quando a matriz polimérica usada no sistema não sofre intumescimento (MANADAS *et al.*, 2002). Esse processo é representado pela seguinte equação:

$$\log Q_t = \log Q_0 + \frac{K_1 t}{2,303}$$

onde:

$Q_t$  é a quantidade do fármaco liberado no tempo  $t$ ;

$Q_0$  é a quantidade inicial do fármaco na solução;

$K_1$  é a constante de liberação de primeira ordem.

- ✓ **Higuchi:** A equação de Higuchi (1961) é empregada constantemente para representar a velocidade de liberação controlada do agente ativo a partir de sistemas matriciais como um processo de difusão baseada na lei de Fick. A equação de Higuchi é expressa como fração de massa liberada:

$$f_t = K_H t^{1/2}$$

onde:

$K_H$  corresponde à constante de liberação de Higuchi;

$f_t$  quantidade do agente ativo liberado.

A equação de Higuchi apresenta limitações fortes na interpretação dos mecanismos de liberação controlada, principalmente no uso desta relação em sistemas que apresentam a capacidade de intumescimento (Lopes *et al.*, 2005).

- ✓ **Korsmeyer-Peppas:** O modelo matemático elaborado por Korsmeyer-Peppas (1983) é relacionado com a liberação do agente ativo ao longo do tempo. É utilizada para descrever de forma simplificada os mecanismos de liberação onde ocorre uma difusão do agente ativo (transporte Fickiano) controlada pelo relaxamento das cadeias poliméricas (transporte de caso II) (RITGER; PEPPAS, 1987). Neste modelo a relação entre a velocidade de liberação e o tempo é expressa pela equação:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n$$

onde:

$K$  é a constante de difusão;

$n$  é o expoente de liberação que, de acordo com o valor numérico que assume, caracteriza o mecanismo de liberação do agente ativo;

$M_t$  é a quantidade do agente ativo liberada no tempo  $t$ ;

$M_\infty$  é a quantidade total do agente ativo em um tempo infinito;

$\frac{M_t}{M_\infty}$  é a fração do agente ativo liberado ao longo do tempo  $t$ .

Peppas (RITGER; PEPPAS, 1987) utilizou o valor de  $n$  para caracterizar os diferentes mecanismos de liberação como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Interpretação dos mecanismos de liberação por difusão

<b>Expoente de Liberação (n)</b>	<b>Mecanismo de difusão do agente ativo</b>	<b>Características</b>
$n = 0,43$	Difusão Fickiano ou Caso I	Quando o tempo de difusão é muito mais lenta que o tempo de relaxação da cadeia polimérica.
$n = 0,89$	Intumescimento do polímero ou Caso II	Quando o tempo de difusão é muito mais rápida comparado com o tempo de relaxação das cadeias, que ocorrem simultaneamente.
$0,43 < n < 0,89$	Difusão anômala (não Fickiano) tanto de difusão e relaxamento (erosão)	Ocorre quando os tempos de difusão e de relaxação das cadeias poliméricas são comparáveis.

Esse modelo geralmente é aplicado quando o mecanismo de liberação do agente ativo não é bem conhecido ou quando resulta da combinação de dois fenômenos aparentemente independentes (MANADAS *et al.*, 2002).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Óleo essencial

#### 4.1.1 Coleta e identificação do material vegetal

As folhas da espécie *L. alba* foram coletadas no Setor de Plantas Medicinais e Hortaliças da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), situada na Rodovia AM-010 de Manaus-Itacoatiara, no Km 30, sendo supervisionada pelo Dr. Francisco Célio Maia Chaves.

As plantas foram colhidas rente ao solo no mês de julho de 2017 às 10 h e mantidas na sombra para secagem até atingirem massa constante. Após a secagem foram armazenadas em sacos plásticos até o momento da extração do óleo essencial. As exsiccatas foram identificadas por meio de comparação com material vegetal existente na coleção do herbário do laboratório de Botânica - Embrapa, onde se encontram depositadas sob o nº 191732.

#### 4.1.2 Extração de óleo essencial

As folhas coletadas da espécie *L. alba* foram secas e extraídas para obtenção do óleo essencial no Laboratório de Polímeros Nanoestruturados - NANOPOL e submetidas à hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger modificado, durante 2h30min, a 100 °C, contadas a partir da observação da saída das primeiras gotas do óleo essencial. Em um balão de vidro com capacidade de 4 L foram adicionados 150 g de folhas secas trituradas e 1,5 L de água destilada. Após a extração, o volume do óleo essencial foi quantificado com o auxílio de uma micropipeta, armazenado em frasco âmbar e adicionado sulfato de sódio anidro para retirar as possíveis gotas de água presentes no óleo essencial. Em seguida, o óleo essencial foi mantido a -18°C até o momento das análises.

#### 4.1.3 Determinação das propriedades físicas do óleo essencial

Para a determinação da cinética de extração foi observada a variação do volume do óleo essencial obtido a cada 30 min com o intuito de avaliar e definir a condição operacional mais adequada em relação ao tempo de extração a ser utilizado nos experimentos.



A densidade relativa do óleo essencial foi estimada em temperatura ambiente utilizando dois tubos capilares lavados e secos. Um deles foi preenchido com água destilada ( $m_1$ ) e o outro com óleo essencial ( $m_2$ ), tendo suas massas determinadas. Outro tubo capilar permaneceu vazio ( $m$ ) para obter a diferença de massa dos tubos capilares cheios e vazios. O valor da densidade foi obtido de acordo com a equação:

$$d = \frac{(m_2 - m_1)}{(m_1 - m)}$$

O rendimento do óleo essencial foi expresso pela relação entre a massa do óleo obtido após o processo de extração e o material vegetal, sendo que valor final foi expresso em percentual (GIRARD, 2007).

O índice de refração, conforme sugerido pela Farmacopeia Brasileira (2010), foi obtido no Laboratório de Polímeros Nanoestruturados- NANOPOL utilizando um refratômetro da marca Atago Master Refractometer.

#### 4.1.4 Identificação química e quantificação dos componentes do óleo essencial da *Lippia alba* por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG/EM)

A identificação dos constituintes do óleo essencial da *L. alba* foi realizada no Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) - Central Analítica/UFAM. O óleo essencial foi submetido à Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM), em equipamento Thermo, modelo Trace GC Ultra, coluna capilar Tr-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m) utilizando hélio como gás de arraste a 1.0 mL.min<sup>-1</sup>. O volume injetado foi de 2  $\mu$ L de óleo puro diluído em 1 mL de acetato de etila. A temperatura foi de 250°C no injetor e a temperatura do forno foi programada em 40°C (4min), aumentando até 240°C, com acréscimo de 4°C a cada minuto e em seguida aumentando até 280°C a uma taxa de 10°C durante 2 min.

Os índices aritméticos foram calculados utilizando a Equação de van der Dool-Kratz, relacionando os tempos de retenção das substâncias presentes nos óleos essenciais com os tempos de retenção de uma série homóloga de *n*-alcanos alifáticos (C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub>) e por comparação do índice aritmético com dados da literatura (ADAMS, 2007). Além disso, a identificação dos constituintes químicos também foi realizada por comparações entre os espectros de massas experimentais e os existentes na biblioteca (NIST, 2016).

#### 4.1.5 Atividade antioxidante do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrizil hidrazil)

A capacidade sequestrante do radical livre DPPH<sup>•</sup> do óleo essencial foi avaliada usando o método DPPH (MOLYNEUX, 2004) e realizada no Laboratório de Polímeros Nanoestruturados-NANOPOL. Preparou-se uma solução metanólica DPPH (100 µM) e, a partir de uma concentração de 1 mg. mL<sup>-1</sup> do padrão Trolox, uma alíquota de 10 µL foi adicionada a microplaca com 190 µL do radical DPPH (100 µM). O padrão Trolox foi utilizado como controle positivo (1000 µg – 3,9 µg. mL<sup>-1</sup>). A mistura foi mantida no escuro a temperatura ambiente por 30 min com posterior leitura da absorbância em 515 nm utilizando um leitor de microplacas de 96 poços (Biotek, ELX 800). O resultado foi obtido por equivalência a Trolox através da relação absorbância *versus* concentração.

#### 4.1.6 Ensaio enzimático inibitório de acetilcolinesterase (AChE)

A inibição de AChE *in vitro* foi preparada pelo método espectrofotométrico descrito por Senol (2015) e realizada no Laboratório de Polímeros Nanoestruturados-NANOPOL. O óleo essencial foi testado em concentrações de 31,2; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg. mL<sup>-1</sup>. Em seguida, foram adicionados 150 µL de tampão de fosfato de sódio 0,1 mM (pH 8,0), 20 µL de DTNB 0,2 M, 20 µL de soluções de óleo essencial e 20 µL de solução de 0,2 M de AChE em microplaca de 96 poços a 25°C. Após 15 min foi adicionado um volume de 10 µL de AChI (0,2 M) para que a reação fosse iniciada. Utilizando um leitor de microplacas de 96 poços (Biotek, ELX 800) em 405 nm, foram realizadas leituras de absorbância no intervalo de 5 em 5 min, durante 0,5 h. O CI<sub>50</sub> foi calculado utilizando a taxa do ensaio inibitório AChE *versus* a concentração da amostra em 15 min. O ensaio foi realizado em triplicata e a neostigmina foi utilizada como controle positivo (31,250-1.000 µg. mL<sup>-1</sup>).

#### 4.1.7 Bioensaio Larvicida do óleo *in natura*

O bioensaio larvicida foi conduzido no Laboratório de Malária e Dengue/LMD-CSAS (INPA) para testar a concentração letal do óleo essencial *in natura* da *L. alba* (SILVA et al., 2018).

Grupos de 10 larvas no 3º estágio larval foram colocados em copos plásticos (100 mL) contendo inicialmente 1 mL de água destilada e 100 µL do alimento larval e 100 µL das concentrações larvicidas (150 a 70 mg. mL<sup>-1</sup>) do óleo essencial solubilizado em DMSO.

O experimento foi realizado em triplicata contendo cinco réplicas. DMSO (1 mL) e Bti (1 mg. mL<sup>-1</sup>) foram usados como controle negativo e positivo, respectivamente. Os dados foram analisados utilizando o programa POLOPC® (LeOra Software Berkeley, CA) para estimar os valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>, que representa a concentração letal, ou seja, a concentração larvicida necessária para matar 50% e 90% dos indivíduos da população com limite de confiança de 95%.

#### **4.2 Desenvolvimento das nanopartículas encapsulantes**

Existem diversas metodologias empregadas no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas biodegradáveis (CRUCHO; BARROS, 2017). O método utilizado neste trabalho foi o método de nanoprecipitação que, de acordo com Lassalle (2007), é uma técnica simples, de fácil realização e que tem sido amplamente utilizada na preparação de nanopartículas encapsulantes de diversos ativos (BRAMOSANTI *et al.*, 2017; GAONKAR *et al.*, 2017).

Uma vez escolhido o método de síntese das nanopartículas, uma atenção maior foi dada à formulação dos sistemas. Um dos polímeros utilizados para a síntese de nanopartículas foi a poli-ε-caprolactona (PCL) pelo fato de ser um poliéster biocompatível, biodegradável em meio biológico, custo relativamente baixo e comumente utilizado em sistemas de liberação controlada (VILLANOVA, JANAINA C. O; ORÉFICE, RODRIGO L.; CUNHA, 2010).

Fatores como capacidade de solubilização dos constituintes da fase orgânica, miscibilidade em água, segurança e toxicidade foram os critérios de escolha para a seleção do solvente orgânico mais adequado. O solvente orgânico escolhido foi a acetona por ser um dos solventes com baixo potencial tóxico segundo a classificação dos solventes residuais da *International conference on Harmonisation (IHC)*.

Oliveira (2008) utilizou como fase oleosa o óleo de copaíba, obtendo nanopartículas da ordem de 130 nm, utilizando apenas um agente tensoativo (Tween®80). Esta emulsão foi então submetida a testes de centrifugação, confirmando estudos feitos por Kanig (2001) que mostraram ser possível desenvolver formulações estáveis utilizando apenas um único tensoativo. Diante destas perspectivas, optou-se pela utilização de um tensoativo hidrofílico, o

Tween<sup>®</sup>80, que confere estabilização estérica entre as nanopartículas, reduzindo a possibilidade de coalescência, bem como pela superação da força da gravidade atuante nesses glóbulos pelo movimento browniano, evitando processos de instabilidade (TADROS *et al.*, 2004).

#### 4.2.1 Síntese das nanopartículas pelo método de nanoprecipitação

Para obtenção de nanopartículas por nanoprecipitação, a metodologia descrita por Christofoli *et al* (2015) foi utilizada, com algumas modificações. Toda a metodologia experimental foi realizada no Laboratório de Polímeros Nanoestruturados -NANOPOL.

A metodologia utilizada pode ser descrita em três etapas:

- a) Na primeira etapa foram preparados dois sistemas de nanopartículas, um sem o óleo essencial da *L. alba*, e outra contendo o óleo essencial encapsulado. Para a síntese das nanopartículas sem ativo, duas soluções foram preparadas, uma chamada de fase orgânica composta por poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) e um solvente orgânico (acetona) e outra, chamada de fase aquosa, composta do tensoativo não iônico (Tween<sup>®</sup>80) e água destilada.
- b) Na segunda etapa, a fase orgânica foi aquecida em 40°C até solubilização completa do polímero e, ao final da dissolução, a solução foi então resfriada à temperatura ambiente por 15 min, vertida na solução aquosa por gotejamento e seguida da evaporação do solvente por rotaevaporação. O ajuste do pH final do sistema com realizado utilizando-se uma solução de HCl 1M. Dois tipos de conservantes foram testados, NE (Fenoxietanol/2-metil-2H-isotiazolin-3-ona) e benzoato de sódio.
- c) Na terceira etapa, para encapsulamento do óleo essencial, o mesmo foi incorporado na solução aquosa seguindo o mesmo procedimento da etapa b, com agitação constante, até formar uma solução coloidal turva. A Figura 4 ilustra este método de preparação.

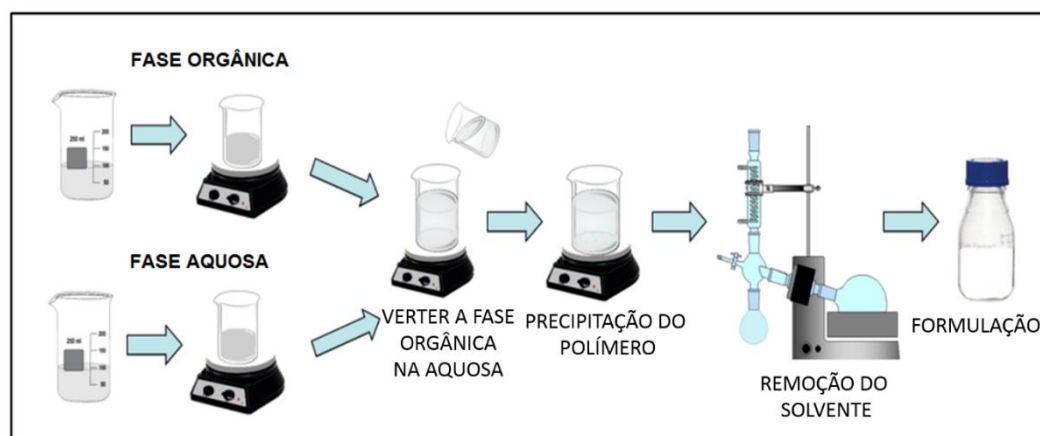


Figura 4: Representação esquemática da preparação da formulação pela técnica de nanoprecipitação.

As concentrações dos constituintes da formulação desenvolvida, bem como as condições experimentais, estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Concentrações utilizadas na preparação da formulação das nanopartículas

Fase	Componentes	Concentração
<b>Orgânica</b>	poli-ε-caprolactona	0,15 g
	óleo essencial	500 µg. mL <sup>-1</sup>
	acetona	15 mL
<b>Aquosa</b>	tween 80	0,05 g
	água destilada	30 mL

#### 4.2.2 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As topografias das nanopartículas vazias e carregadas com o óleo essencial foram obtidas no Laboratório de Óptica de Materiais – OPTIMA/UFAM, em um Microscópio de Força Atômica (Innova, Bruker), com área de (10 × 10) µg, operando em modo contato utilizando *cantilevers* de nitreto de silício. As medições foram realizadas em 296 ± 1K e 40 ± 1% de HR com 512 × 512 pixels a uma taxa de varredura de 1Hz. A distribuição dos diâmetros médios das nanopartículas foi estimada usando o programa ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

#### 4.2.3 DLS e Potencial Zeta

A distribuição dos diâmetros das nanopartículas e o índice de polidispersão (PDI) foram obtidos através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*), utilizando um equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK) disponível no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - UFAM. A formulação das nanopartículas vazias foi diluída em água mili-Q em uma proporção de 1:100 [v/v]. As leituras foram realizadas em triplicata e as medidas efetuadas sob ângulo de espalhamento de 90°. Neste mesmo equipamento os valores do potencial Zeta (em mV) foram determinados pela análise de mobilidade eletroforética em um intervalo de pH de 3 a 10, em triplicata, a 25 °C.

#### 4.2.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises para caracterização estrutural a nível molecular da formulação e avaliação qualitativa da eficiência de encapsulamento do óleo essencial da *L. alba* foram realizadas no centro de pesquisa HUB-Tecnologia e Inovação da Universidade Estadual do Amazonas-UEA em espectrofotômetro Shimadzu IR Prestige-21 com software IRsolution versão 1.6. no intervalo de 1000 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2.5 Eficiência de encapsulamento para sistemas abertos

A eficiência de encapsulamento do óleo essencial foi analisada por espectroscopia UV-vis (Global Trade Technology, modelo UV-5100) baseada em trabalhos anteriormente reportados, com algumas modificações (GHASEMISHAHRESTANI, 2015; SILVA *et al.*, 2018). Inicialmente foi realizada uma varredura com o óleo essencial *in natura* da *L. alba*, obtendo o pico máximo de absorção em  $\lambda = 328\text{nm}$ . A curva de calibração foi previamente desenvolvida com diferentes concentrações do ativo em metanol (1,9 a 1000  $\text{mg. mL}^{-1}$ ). As soluções foram analisadas em triplicata por espectroscopia de UV-vis e as médias das áreas dos picos referentes a cada concentração foram plotadas em um gráfico de absorbância *versus* concentração. A equação da reta e o coeficiente de correlação linear foram calculados pela análise da regressão linear para a obtenção da curva de calibração, como mostrado na Figura 5.

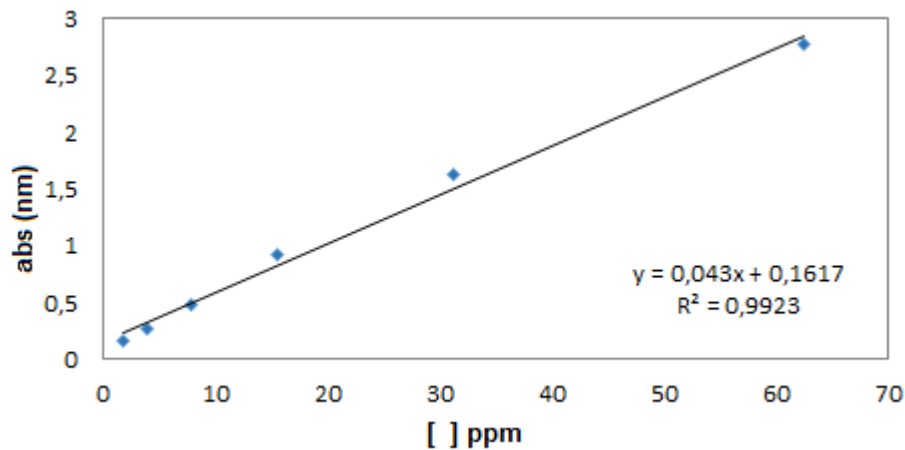


Figura 5 : Curva de calibração do óleo essencial de *Lippia alba*.  
 FONTE: Próprio autor.

Para o cálculo da eficiência de encapsulamento, as nanopartículas vazias e com óleo essencial encapsulado foram separadas por centrifugação (DAIKI, modelo DTR20.000) a 12000 rpm durante 20 min. O sobrenadante foi retirado e usado para determinar a quantidade de óleo essencial livre. A eficiência de encapsulamento (EE) foi calculada usando a fórmula:

$$EE (\%) = \frac{(\text{Concentração inicial do óleo essencial} - \text{Concentração do óleo livre})}{\text{Concentração inicial do óleo essencial}} \times 100$$

#### 4.2.6 Liberação controlada do óleo essencial nanoencapsulado

Estudos de liberação de óleo essencial *in vitro* foram realizados em membrana de diálise contendo 15 mL do sistema coloidal, e suspensa em água a 25°C em diferentes pHs (4, 7, 10). Porções de 2 mL foram retiradas em diferentes intervalos de tempo, e a concentração do óleo essencial nesta alíquota foi medida por absorbância usando um espectrofotômetro UV-vis. A quantidade de óleo essencial liberada foi determinada através da curva de calibração. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A partir dos dados de liberação obtidos, foi realizada a análise dos mecanismos envolvidos no processo de liberação, utilizando o modelo teórico descrito por Korsmeyer-Peppas do qual segue um comportamento anômalo.

#### 4.2.7 Estudo de estabilidade

Entendendo que partículas coloidais apresentam tendência para sofrerem agregação ou coalescência ao longo do tempo, mesmo utilizando-se de conservantes apropriados, procedeu-se a avaliação das nanopartículas carregadas com o óleo essencial a fim de avaliar a estabilidade física da formulação em função do tempo. No geral, é importante saber reconhecer quais parâmetros físicos estão relacionados à desestabilização do sistema coloidal, sabendo correlacionar as informações obtidas através de cada análise em particular.

A formulação foi armazenada a 25°C em uma incubadora Biochemical Oxygen Demand (B.O.D) da marca Solid Steel sendo os parâmetros pH e condutividade avaliados por 50 dias.

##### 4.2.7.1 Avaliação do pH

O valor do potencial Hidrogeniônico (pH) dos nanossistemas foi determinado inserindo-se o eletrodo (pHmetro KASVI) diretamente na amostra a 25°C, não sendo necessária diluição prévia devido à fluidez das emulsões (ANVISA, 2004).

##### 4.2.7.2 Avaliação da condutividade elétrica

Para determinar a condutividade elétrica, o eletrodo do condutivímetro (marca BEL ENGINEERING, modelo W12D) foi inserido diretamente nos nanossistemas, a 25°C.

#### 4.2.8 Eficiência larvicida da formulação

O bioensaio larvicida foi conduzido no Laboratório de Malária e Dengue / LMD-CSAS (INPA) com o objetivo de avaliar a proporção necessária para a mortalidade total das larvas em um determinado período de tempo.

O bioensaio com as nanopartículas contendo o óleo essencial encapsulado foi realizado apenas para a formulação mais estável, ou seja, aquela que apresentou maior eficiência de encapsulamento em função do tempo. Grupos de 10 larvas no 3º estágio larval foram colocadas em copos plásticos (100 mL) contendo inicialmente 10 mL da formulação e em seguida foram utilizadas diferentes proporções de água (pH=7)/formulação (1:1; 1:0,6; 1:0,4; 1:0,25; 1:0,1) em cada grupo larval. A formulação vazia (sem óleo essencial encapsulado) foi usada como controle negativo.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta sessão será dividida em cinco etapas distintas: (i) os resultados encontrados em relação ao estudo do óleo essencial *in natura* da *L. alba*, assim como a sua eficácia frente as larvas de *A. aegypti*, (ii) o desenvolvimento e caracterização das nanopartículas poliméricas e incorporação do óleo essencial, (iii) a avaliação da estabilidade das nanopartículas, (iv) o ensaio de eficácia das nanopartículas contendo o óleo essencial encapsulado frente as larvas de *A. aegypti*.

### 5.1 Caracterização do óleo essencial da *L. alba*

#### 5.1.1 Determinação das propriedades físicas

A Figura 6 mostra a cinética de extração do óleo essencial utilizada para encontrar o tempo ideal de hidrodestilação em função do volume de óleo extraído.

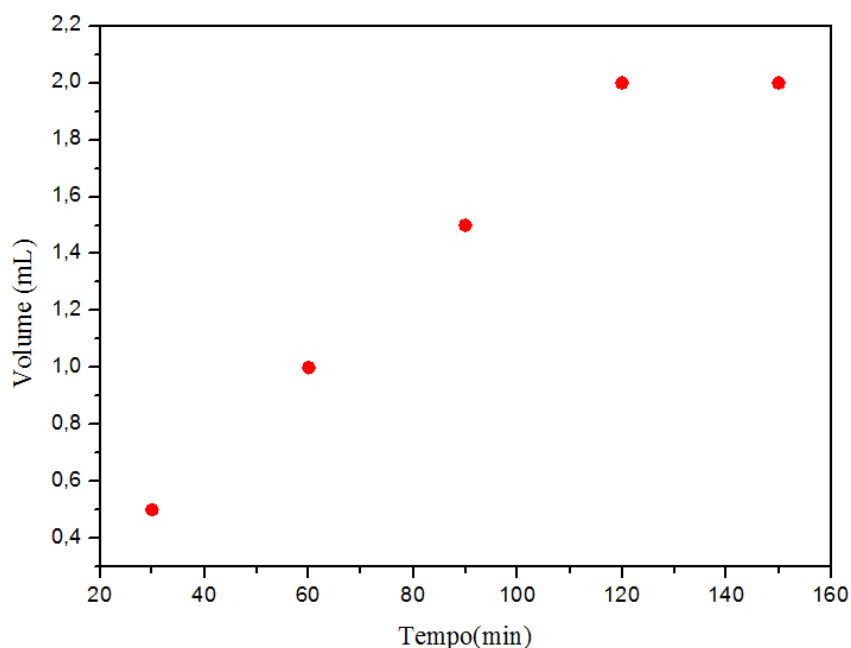


Figura 6 : Cinética de extração das folhas de *Lippia alba*.

Verificou-se que o tempo de extração ideal foi de 120 min, tendo em vista que, após este período, não houve variação significativa do volume do óleo essencial extraído até o tempo máximo observado de 160 min. Outros trabalhos utilizando a mesma espécie e metodologia de

extração reportam que não houve alterações de rendimento no tempo de 120 min. Desta maneira, o tempo de extração encontrado neste trabalho é considerado ideal para extração dos componentes voláteis presentes neste óleo essencial.

A densidade do óleo essencial foi calculada em 0,936 g/cm<sup>3</sup>. O rendimento do óleo essencial após processo de hidrodestilação foi de 0,62% (m/m) de acordo com a quantidade de massa vegetal utilizada. Santos *et al* (2016) utilizou a mesma quantidade de folhas da mesma espécie e encontrou um rendimento de 0,21%, demonstrando que o rendimento pode variar significativamente devido aos fatores genéticos e ambientais.

O índice de refração foi de 1,492, estando dentro da faixa prevista por Farmacopeia brasileira (2010) (1,450 – 1,590).

#### 5.1.2 Determinação dos constituintes químicos do óleo essencial

O perfil cromatográfico (Figura 7) do óleo essencial da *L. alba* permitiu a identificação de 10 constituintes químicos, dos quais 82,9% são monoterpenos e 11,1% são sesquiterpenos. Como componentes majoritários foram encontrados Carvona (54,5%) e Limoneno (21,5%), permitindo classificá-la como quimiotipo III (limoneno-carvona). A Tabela 3 mostra os constituintes químicos identificados no óleo essencial da *L. alba* e seus respectivos percentuais, além de seus índices de retenção. A Figura 8 mostra as fórmulas estruturais dos constituintes identificados.

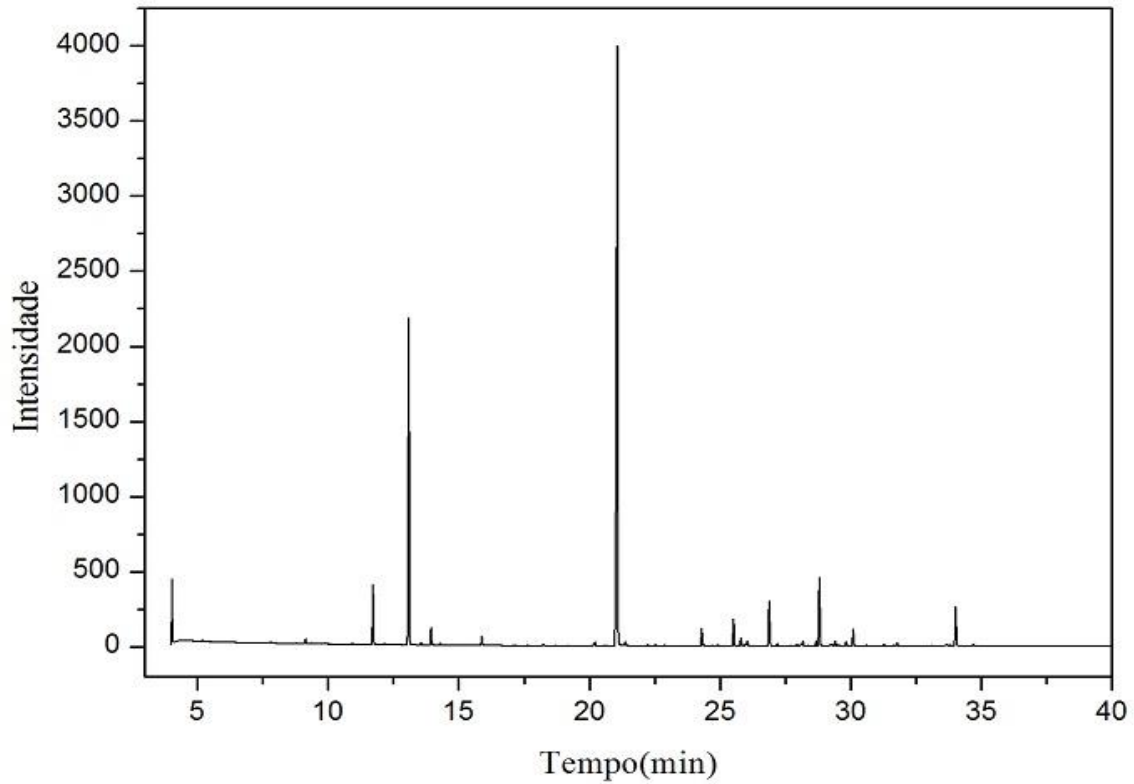


Figura 7: Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Lippia alba*.

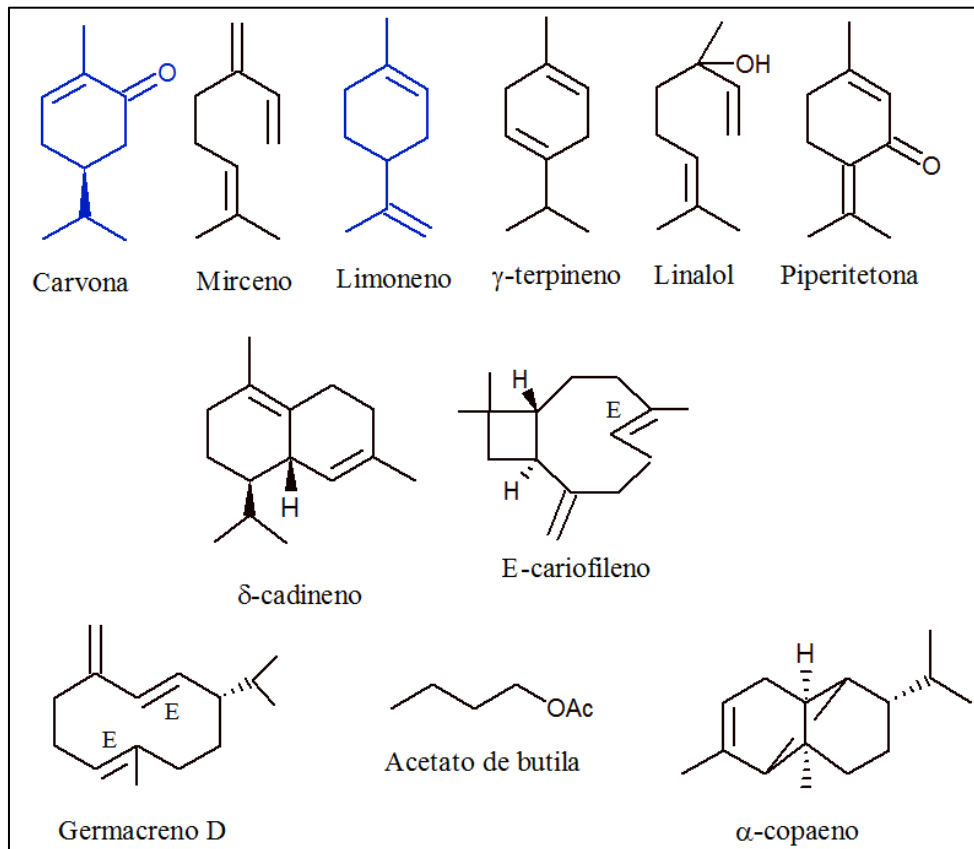


Figura 8: Estruturas químicas presentes no óleo essencial de *Lippia alba*.

Alguns trabalhos reportados mostram a constituição química do óleo essencial da *L. alba* semelhante a encontrada no presente trabalho, no entanto, mudanças quantitativas são observadas nas plantas de *L. alba* cultivadas em diferentes regiões apresentando variações na sua porcentagem (CASTRO; MING; MARQUES, 2002; SILVA *et al.*, 2006).

Tabela 3: Substâncias identificadas no óleo essencial da *Lippia alba* e seus respectivos percentuais

Picos	Constituintes	IA exp.	IA lit.	(%)
1	Acetato de butila	801	807	3,24
2	Mirceno	990	988	3.61
3	Limoneno	1026	1024	21.49
4	$\gamma$ -terpineno	1049	1054	1.06
5	Linalol	1100	1095	0.68
6	Carvona	1244	1239	54,54
7	Piperitetona	1340	1340	1,51
8	$\alpha$ - copaeno	1377	1374	1.86
9	E-cariofileno	1420	1417	3.25
10	Germacreno D	1483	1480	4.80
11	$\delta$ -cadineno	1525	1522	1.20
<b>Total</b>				<b>97,24</b>
Total de monoterpenos				82,89
Monoterpenos hidrocarbonetos				26,16
Monoterpenos oxigenados				56,73
Total de sesquiterpenos				11,11
Outros compostos				3,24

Segundo Gobbo-Neto (GOBBO-NETO; LOPES, 2007) variações qualitativas e quantitativas na composição química do óleo essencial podem estar sujeitas a diversos fatores tais como o local de plantio, condições de cultivo, variações climáticas, horário de colheita, demandas fisiológicas tais como reprodução, crescimento e defesa da planta. Por outro lado, essas variações podem ser causadas por diversidades no meio ambiente, como deficiência de nutrientes, luz, temperaturas extremas e a presença e/ou ausência de microrganismos patogênicos, apresentando variações significativas na constituição química do óleo essencial mesmo sendo plantas da mesma espécie.

Pino e Ortega (1996) caracterizaram o óleo essencial das folhas da *L. alba* coletadas na região de Guira de Melena (Cuba) e os principais constituintes identificados foram: Carvona (40,00%),  $\beta$ -guaieno (9,84%), Piperitenona (8,26%) e Limoneno (5,76%). Estudos realizados por Silva *et al* (2017) relataram a presença de três quimiotipos na região nordeste do Brasil (Ceará), dentre eles o quimiotipo III (limoneno-carvona) relatada em janeiro de 2014 apresentando como compostos majoritários Carvona (58.99%) e Limoneno (20.06%).

### 5.1.3 Atividade antioxidante do radical DPPH $\cdot$ (2,2-difenil-1-picrizil hidrazil)

Para determinar a capacidade sequestrante de radicais livres de uma amostra foi utilizado o método de DPPH $\cdot$ . O efeito da ação antioxidante do radical DPPH $\cdot$  é devido a sua habilidade de capturar hidrogênio (SHEKHAR; ANJU, 2014). O resultado alcançado após a determinação da atividade antioxidante do óleo essencial na concentração de 1 mg. mL<sup>-1</sup> não revelou valor significativo para o radical DPPH $\cdot$ , mesmo utilizando uma concentração maior. De maneira semelhante, Puertas-Mejía e colaboradores (2002) utilizaram uma concentração de 2,8.10<sup>5</sup> mg. mL<sup>-1</sup> de óleo essencial de *L. alba* apresentando uma baixa atividade, o que está relacionado aos componentes majoritários do óleo essencial de quimiotipo III (limoneno-carvona), que não apresentam grupos fenólicos e flavonóides, intimamente associados à sua atividade antioxidante. No entanto, pode ocorrer uma interação entre os compostos do próprio óleo que poderá resultar na “hidrogenação” do átomo de oxigênio formando um grupo hidroxila capaz de demonstrar atividade e, para que isso ocorra, é necessário que haja uma alta concentração da matriz, no caso o óleo essencial.

### 5.1.4 Ensaio inibitório de acetilcolinesterase (AChE)

A AChE é uma enzima chave do sistema nervoso de microorganismos, atuando no encerramento dos impulsos nervosos por catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. Com a inibição da AChE, aumenta-se o nível de acetilcolina nas sinapses ocasionando a morte

dos microorganismos (GUTIERRES *et al.*, 2014). Para o ensaio de acetilcolinesterase, o óleo essencial testado não apresentou valor significativo de atividade enzimática na concentração de 1 mg. mL<sup>-1</sup>. Segundo ABDELGALEIL *et al* monoterpenos como o Limoneno apresentam atividade inibitória da AChE enquanto que a Carvona tem fraca inibição. Sugere-se que, mesmo o óleo apresentando o composto Limoneno em sua composição, a presença da Carvona (representando mais de 50% da constituição química total do óleo estudado), não permitiu a inibição frente a AChE na concentração testada. Para que o óleo essencial estudado apresentasse atividade inibitória sobre a AChE, seria requerido altas concentrações para ser considerado um forte inibidor (LÓPEZ; PASCUAL-VILLALOBOS, 2010).

#### 5.1.5 Bioensaio Larvicida do óleo *in natura*

De acordo com Biasi e Deschamps, trabalhos estão sendo realizados com o objetivo de testar o efeito biocida dos óleos essenciais de diversas espécies aromáticas, inclusive do gênero *Lippia* sobre insetos. Através dos resultados obtidos a partir de ensaios laboratoriais descritos na Tabela 4, o óleo essencial de *L. alba in natura* pode ser considerado um agente alternativo eficaz no controle das larvas do *A. aegypti*.

Tabela 4: Valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> do óleo essencial de *Lippia alba in natura* contra larvas *Aedes aegypti*

Espécie	Tempo (h)	CL <sub>50</sub> ± DP (µg.mL <sup>-1</sup> )	(LCI-LCS)	CL <sub>90</sub> ± DP (µg.mL <sup>-1</sup> )	(LCI-LCS)
<i>Aedes aegypti</i>	72	105.9 ± 0.1	103.3 – 108.5	129.7 ± 0.1	125.5 – 135.1

Através dos bioensaios de dose foram encontrados os valores das concentrações letais CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> através da análise pelo programa POLOPC<sup>®</sup> (LeOra Software Berkeley, CA), respeitando o intervalo de confiança no nível de significância de 95%. A investigação de toxicidade larval demonstrou que o óleo essencial apresenta capacidade larvicida moderada com concentração letal considerável de (105.9 ± 0.1) e (129.7± 0.1) µg. mL<sup>-1</sup> para CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>, respectivamente.

Nos resultados apresentados anteriormente em relação à capacidade de sequestro de DPPH e atividade inibitória da AChE nas concentrações testadas, não foram observados valores

significativos que demonstram a eficiência deste óleo na atividade antioxidante e enzimática. No entanto, estudos realizados por Vera *et al* (2014) também reportam propriedades larvicidas e inseticidas do óleo essencial de *L. alba*.

Foi reportado um estudo sobre a Carvona (48.60%) e Limoneno (11.30%) isolados, realizado por Govindarajan *et al* (2012). Os autores verificaram um efeito tóxico significativo contra as larvas de *C. quinquefasciatus*, *A. aegypti* e *A. stephensi* obtendo valores de CL<sub>50</sub> de 19.33, 23.69, e 25.47 mg. mL<sup>-1</sup> para a Carvona isolada, e valores de CL<sub>50</sub> de 8.83, 12.01 e 14.07 mg. mL<sup>-1</sup> para o o Limoneno isolado.

Outro estudo realizado por Botas *et al* (2017) reporta que o constituinte Limoneno (25.7%), na sua forma isolada e retirado do óleo essencial da *Baccharis reticularia*, exibiu pronunciada propriedade larvicida contra o *A. aegypti*. Foi observada baixa mobilidade larval, superfície corporal enrugada, alterações na cabeça, tórax, sifão e nas cutículas do abdômen. Outros autores também confirmam pronunciadas atividades larvicidas e inseticidas do Limoneno isolado frente ao *A. aegypti*, *A. albopictus*, *Sitophilus oryzae*, entre outros.

A interação sinérgica entre os principais constituintes majoritários com os constituintes de menores concentrações do óleo essencial também pode ser uma alternativa para a mortalidade larvicida, aumentando a eficácia através de uma variedade de mecanismos, podendo agir por absorção através da cutícula (efeito de contato), sistema respiratório (fumigação) ou por ingestão através do sistema gastrointestinal (CANTRELL *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2012).

## **5.2 Caracterização das nanopartículas poliméricas**

### **5.2.1 Microscopia de Força Atômica (AFM)**

Foi possível verificar que ambos os tipos de nanopartículas (vazia e carregadas com o ativo) apresentam morfologia quase esférica e estão bem dispersas, como mostrado na Figura 9. O tamanho médio das nanopartículas vazias foi de  $136 \pm 2$  nm com índice de polidispersividade de 0,14. A distribuição do tamanho das nanopartículas carregadas com o óleo essencial apresentou tamanho médio de  $266 \pm 6$  nm com um índice de polidispersão de 0,22, sendo possível verificar o aumento do diâmetro médio das mesmas devido ao encapsulamento

do óleo essencial nas nanopartículas (YILMAZ *et al.*, 2019). Este resultado indicou que o óleo essencial pode ser encapsulado com sucesso na formulação e metodologia propostas.

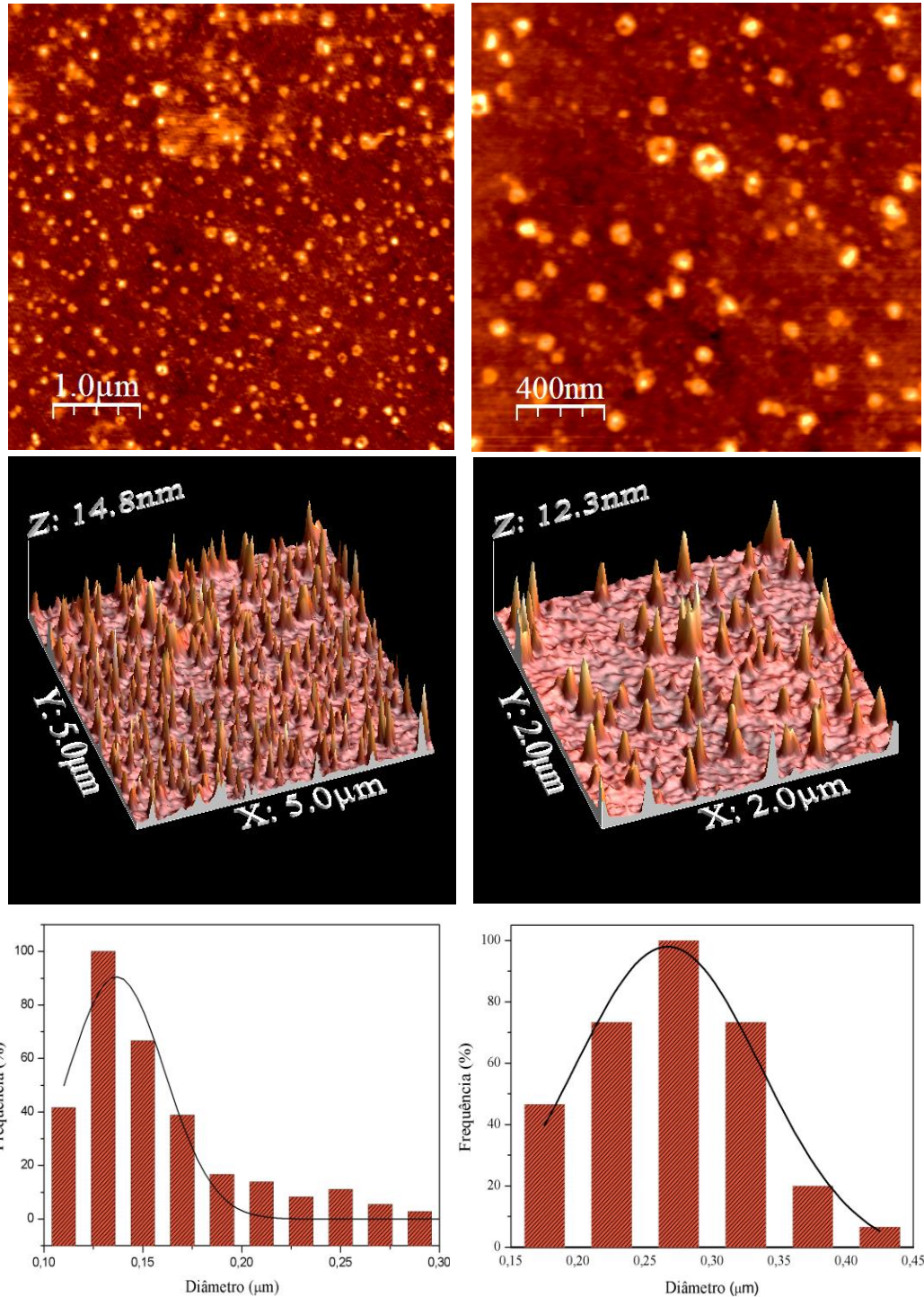


Figura 9: Imagens de topografia para (a) nanopartículas de PCL vazias e (b) nanopartículas carregadas com óleo essencial.



### 5.2.3 Análise de DLS e Potencial Zeta

A análise por DLS também foi utilizada com o intuito de avaliar o diâmetro médio das nanopartículas. As nanopartículas vazias apresentaram tamanho médio entre 236 e 275 nm com índice de polidispersão de 0,2. Esses valores estão de acordo com os citados por Schaffazick (2003), que estabelece que partículas que apresentam diâmetros médios inferiores a 300 nm e índices de polidispersão iguais ou abaixo de 0,2 apresentam uniformidade e uma boa estabilidade na forma de sistema coloidal. Geralmente, quanto menor o tamanho das nanopartículas dispersas, maior a estabilidade do sistema (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O potencial zeta é um parâmetro importante a ser considerado em sistemas coloidais, sendo um indicativo de estabilidade do polímero formador das nanopartículas, pois está correlacionado com as cargas superficiais das mesmas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A Tabela 5 mostra a variação do potencial zeta em função do pH. Simultaneamente, esta análise também permitiu correlacionar esses valores com o tamanho das nanopartículas vazias.

Tabela 5: Tamanho médio das nanopartículas e potencial Zeta em diferentes pH

<b>pH</b>	<b>Potencial zeta (mV)</b>	<b>Tamanho de partículas (nm)</b>	<b>PDI</b>
3	-5,37 ± 0,06	244,0 ± 0,4	0,24
4	-8,02 ± 0,07	243 ± 5	0,18
5	-3,6 ± 0,2	236 ± 1	0,24
6	-2,8 ± 0,9	275 ± 4	0,34
7	-1,6 ± 0,1	252 ± 3	0,27
8	-1,5 ± 0,4	269 ± 2	0,34
9	-1,2 ± 0,2	227 ± 1	0,27
10	-0,9 ± 0,6	238 ± 3	0,24

Observa-se que o diâmetro médio das nanopartículas vazias determinados pela técnica de DLS apresentaram-se superiores àqueles obtidos pela técnica de AFM. Essa alteração pode se dar devido ao fato das análises feitas por DLS serem realizadas em função do pH. Além disso, antes de realizar-se as análises de AFM, as nanopartículas passaram por um processo de secagem, o qual também poderia ter influenciado no tamanho médio de seus diâmetros.

A análise do potencial zeta é um indicativo que determina que tipos de estabilidade ocorrem em sistemas coloidais. Na estabilidade estérica o emulsificante se junta à superfície das partículas, deixando-as estáveis; geralmente são observadas em sistemas coloidais com

baixo potencial zeta. Já a estabilidade eletrostática ocorre quando há repulsão entre as partículas devido à elevada carga superficial, dificultando a aglomeração do sistema coloidal (CAMPELO *et al.*, 2017).

Quanto maior for a repulsão de cargas entre dois glóbulos próximos, menor a sua interação e, portanto, menor a tendência à floculação e coalescência. Assim, valores iguais ou maiores a 30 mV (em módulo) são importantes para a estabilidade físico-química de uma solução coloidal, pois indica que a força repulsiva da dupla camada iônica é superior à força atrativa de van der Waals, evitando uma possível floculação (ROLAND *et al.*, 2003).

O valor de potencial zeta das nanopartículas vazias (Tabela 5) têm, em módulo, maior carga superficial em pH = 4, conferindo boa estabilidade das dispersões coloidais. O ponto onde o potencial zeta é zero é chamado de isoeletrico, isto é, o ponto no qual o sistema coloidal é menos estável, sendo verificado aproximadamente em pH = 10, significando que encontraríamos instabilidade entre valores de pH entre 5 e 10, gerando possíveis agregações do sistema em função das colisões com outras nanopartículas.

Os valores negativos do potencial zeta é devido à presença de radicais carbonílicos presentes na estrutura polimérica. É importante ressaltar que estas nanopartículas foram preparadas empregando-se tensoativo não iônico na formulação e, de acordo com a literatura, a cadeia hidrocarbônica do tensoativo interage com as regiões hidrofóbicas da parede polimérica, provocando a exposição dos radicais da cadeia do tensoativo com a fase aquosa. Isso pode induzir cargas negativas na superfície das nanopartículas, diminuindo o valor do potencial zeta e apresentando o mecanismo de estabilização por impedimento estérico. Desta forma, a estabilização eletrostática não é o principal mecanismo de estabilização do sistema desenvolvido (DA ROSA *et al.*, 2015).

#### 5.2.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR são importantes para a caracterização de sistemas encapsulados pois permite a verificação de possíveis interações entre o óleo e os carreadores. O óleo essencial, nos processos de encapsulamento, podem ser adsorvidos, dissolvidos ou dispersos quimicamente na matriz polimérica (CRUPI *et al.*, 2007; SPRICIGO *et al.*, 2008).

A Figura 10 mostra os espectros de FTIR do óleo essencial *in natura*, das nanopartículas vazias e das nanopartículas carregadas com óleo essencial da *L. alba*.

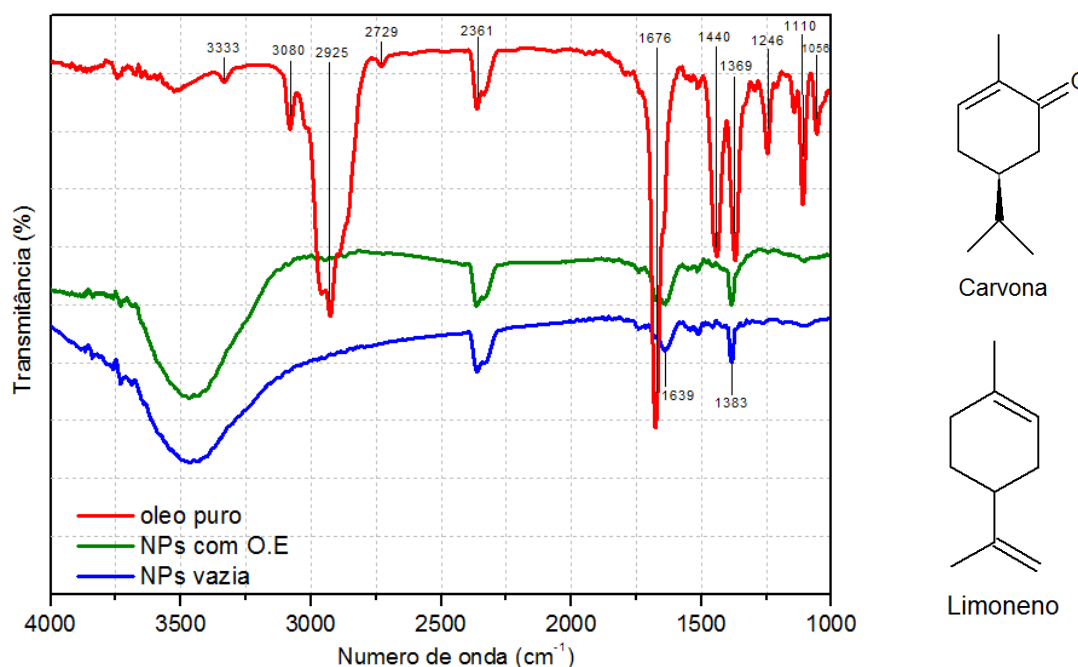


Figura 10: Espectro de FTIR do óleo essencial de *Lippia alba* (curva vermelha), nanopartículas carregadas com óleo essencial (curva verde) e nanopartículas sem o óleo essencial (curva azul).

No espectro do óleo essencial *in natura* (em vermelho) são observadas bandas em diversos comprimentos de onda, as quais estão relacionadas aos modos vibracionais das ligações moleculares dos constituintes químicos do óleo essencial. As bandas encontradas entre 1500 e 1000  $\text{cm}^{-1}$  são de complexas descrições. Pelo fato de os espectros representarem uma mistura de componentes, algumas bandas podem estar sobrepostas, o que dificulta a sua interpretação. Por outro lado, a riqueza de grupos funcionais presentes nas pequenas moléculas dos constituintes dos óleos essenciais traz dificuldades de interpretação de bandas. No entanto, foi possível encontrar bandas gerais, que descrevem os principais grupos funcionais presentes nos constituintes dos óleos essenciais. Devido ao elevado número de constituintes químicos, optamos por identificar os principais modos vibracionais encontrados nos constituintes majoritários, Carvona e Limoneno. Na região de 3333  $\text{cm}^{-1}$  é observado um estiramento da ligação  $\text{H}_2\text{C}=\text{R}$  presente no Limoneno, e em 3080  $\text{cm}^{-1}$  foi observada uma banda relacionada ao alongamento  $\text{C}-\text{H}$  de alcenos. Em 2925  $\text{cm}^{-1}$  foi localizada uma banda atribuída ao alongamento assimétrico ( $-\text{CH}_2$ ). Além disso, na região de 2729  $\text{cm}^{-1}$  observa-se uma banda fraca atribuída a estiramento  $\text{C}-\text{H}$  resultante de vibrações de alcenos, e uma banda em 1676  $\text{cm}^{-1}$

<sup>1</sup> devido ao estiramento de carbonila insaturada presente na Carvona. Nas regiões de 1440 e 1369  $\text{cm}^{-1}$  foi observada uma deformação angular  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$  relacionada aos carbonos primários ou secundários. Em 1246 e 1110  $\text{cm}^{-1}$  foram observadas bandas relacionadas à presença da ligação  $\text{C=O}$ , características de cetona (GUALDRÓN *et al.*, 2013; RAMAMOORTHY; RAJIV, 2014; ZHANG *et al.*, 2017).

Nos espectros correspondentes às nanopartículas vazias (em azul) e carregadas de óleo essencial (em verde) é possível observar perfis semelhantes. A banca localizada em 1639  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída aos grupos éster do PCL. Na região de 1383  $\text{cm}^{-1}$  foi localizada uma banda correspondente à deformação axial de  $\text{C-O}$ , e na região de 2361  $\text{cm}^{-1}$  foi encontrada uma banda atribuída a  $\text{CO}_2$  referente a interferência no equipamento de análise (GHORBANI *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2013).

O interessante nesta análise é a verificação de que as bandas estreitas e intensas características do óleo essencial observadas na Figura 10 não aparecem nos espectros das nanopartículas vazias e nem das carregadas, confirmando que o óleo essencial está encapsulado dentro das nanopartículas. Como a eficiência de encapsulamento foi elevada (conforme será mostrado adiante), o percentual de óleo essencial não encapsulado não foi suficiente para dar sinal de absorção durante a medida, ou foi rapidamente evaporado durante a coleta de dados, já que se trata de um óleo volátil constituído, em sua maioria, por monoterpenos. Vale ressaltar que a eficiência de encapsulamento foi confirmada momentos antes da análise de FTIR para garantir que tais medidas fossem feitas em sistemas estáveis. O interessante é que esta técnica de FTIR pode representar uma eficiente ferramenta qualitativa para a verificação do encapsulamento de ativos em nanopartículas. Por essa razão, ao analisar os espectros de FTIR das nanopartículas poliméricas contendo óleo essencial da *L. alba* e das nanopartículas vazias, foram observados perfis similares, ou seja, confirma-se qualitativamente o encapsulamento do bioativo.

#### 5.2.5 Eficiência de encapsulamento para sistemas abertos

O monitoramento da eficiência de encapsulamento foi realizada para todas as formulações até que o percentual de ativo atingisse 70% de eficiência, percentual considerado relativamente alto e representativo, conforme descreve Xing *et al* (2005). É importante ressaltar que a avaliação da eficiência de encapsulamento foi realizada ao longo do tempo para sistemas

abertos e mantidos a 25°C, ou seja, a solução armazenada em incubadora foi submetida às aberturas constantes do frasco, e exposição ao ar e à luz.

Para a formulação contendo o conservante NE foi observada a eficiência de encapsulamento inicial de ~100% e, para o sistema contendo o conservante benzoato de sódio houve uma eficiência de aproximadamente 95%, o que revela que o processo de encapsulamento realizado pelo método de nanoprecipitação foi altamente eficiente (Figura 11). Estudos realizados por Perez (2015) confirmam altas taxas de eficiência de encapsulamento em nanopartículas de PCL através do método de nanoprecipitação, com variação de 96 a 99% de eficiência. Assim como (GRILLO *et al.*, 2012), trabalhando com o mesmo polímero, obteve eficiência de encapsulamento de 98%. Desde modo, os resultados obtidos através da eficiência de encapsulamento estão dentro do esperado para a formulação proposta.

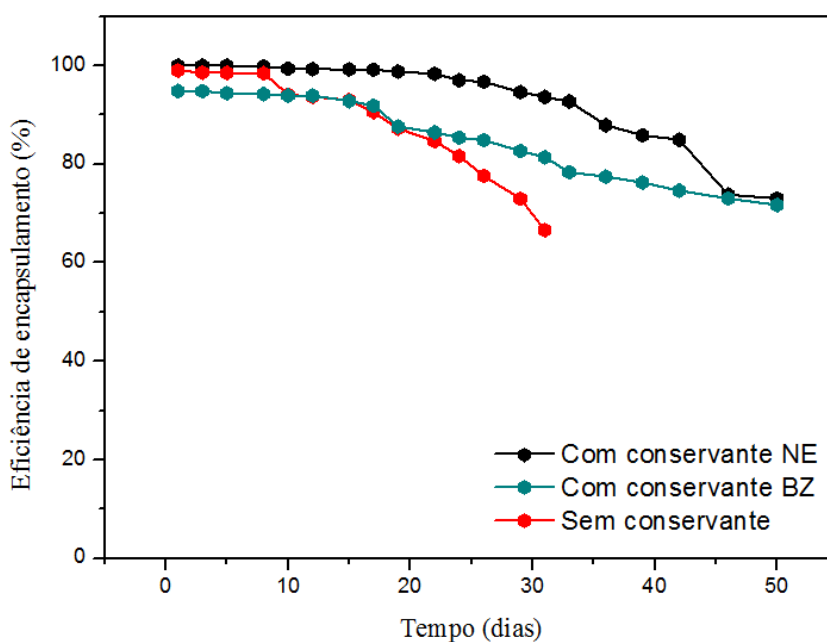


Figura 11: Monitoramento da eficiência de encapsulamento das formulações em função do tempo.

Para o sistema contendo o óleo essencial sem adição de conservante a eficiência de encapsulamento caiu consideravelmente em exatamente 30 dias, com uma eficiência final de 66%. Esse fato ocorreu devido à degradação das nanopartículas, já que a presença do oxigênio dentro do sistema pode favorecer a proliferação de microorganismos que ocorrem durante o armazenamento da formulação. Além disso, a avaliação da eficiência de encapsulamento para a formulação sem conservante foi interrompida em 30 dias também devido às alterações de suas propriedades organolépticas, como cor e odor.

Com a adição dos conservantes NE e benzoato de sódio, a formulação passou a apresentar estabilidade em tempo prolongado, de 30 dias (sem conservantes) para 50 dias (com conservante). É possível observar que a eficiência de encapsulamento para as formulações contendo os conservantes apresentaram comportamentos semelhantes de diminuição de eficiência de encapsulamento ao longo do tempo. Ambas as formulações, com NE e com benzoato de sódio, atingiram 70% de eficiência de encapsulamento simultaneamente, registrada após 50 dias de análise. Também é importante ressaltar que os conservantes utilizados não interferiram na estabilidade dos sistemas, e auxiliaram para que os mesmos tivessem seu tempo de estabilidade prolongado.

#### 5.2.6 Liberação controlada do óleo essencial nanoencapsulado

Diante da crescente poluição ambiental que temos vivenciado nos últimos anos, sabe-se que o pH da chuva “normal” é levemente ácido, em torno de 5,6 e esse valor decai, tornando o pH mais ácido quando a chuva entra em contato com óxidos de nitrogênio (NO e NO<sub>2</sub>) e de enxofre (SO<sub>2</sub>) liberados pela queima de combustível das indústrias e automóveis (LISBOA, 2007). Esses dados foram importantes para os ensaios de liberação controlada, uma vez que o vetor *A. aegypti* apresenta um ciclo de vida aquático que é influenciado pela qualidade dos reservatórios de água.

Este vetor costuma se reproduzir em reservatórios de águas limpas, ainda que possa se adaptar às novas circunstâncias impostas pelo homem como a poluição da água. Esse fato nos leva a propor a realização de um teste de liberação controlada para verificar como as nanopartículas liberam o óleo essencial ao longo do tempo, e em diferentes pH (4, 7, 10), simulando o pH das possíveis águas disponíveis para a reprodução do *A. aegypti*. O sistema escolhido para o ensaio de liberação controlada foi aquele com conservante NE. Essa escolha se deu ao fato de comportamentos continuados ao longo do tempo quando os parâmetros físicos pH e condutividade elétrica foram avaliados. Tais resultados serão mostrados nos próximos tópicos. A Figura 12 mostra as curvas de liberação controlada ajustadas ao modelo Korsmeyer-Peppas. A linha horizontal tracejada representa o valor de referência da CL<sub>90</sub> obtido no bioensaio larvicida do óleo essencial *in natura* para as larvas do *A. aegypti*.

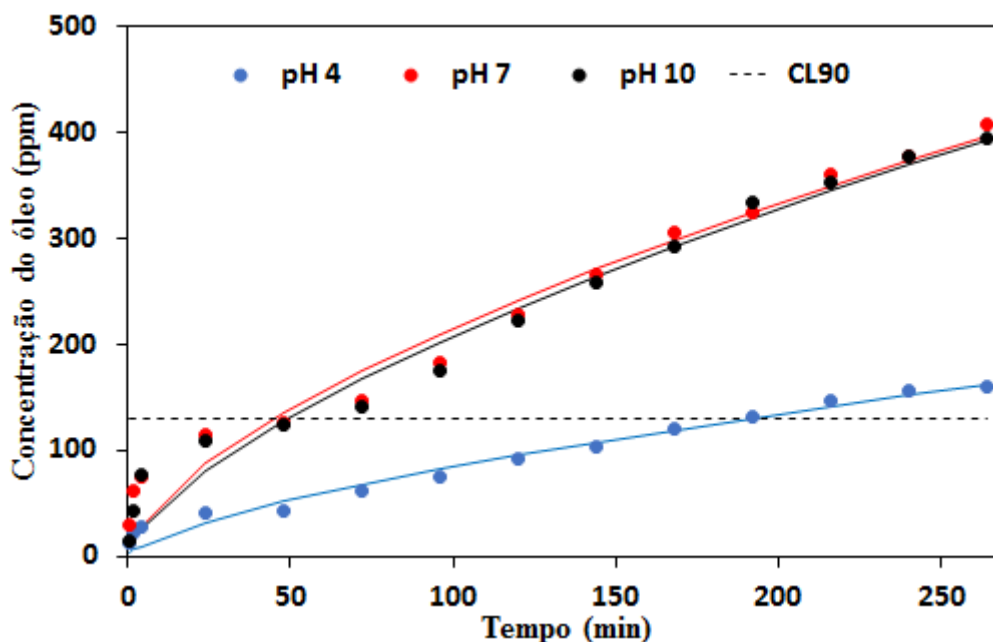


Figura 12: Liberação controlada do óleo essencial da *L. alba*.

A liberação do óleo essencial da *L. alba* foi avaliada por um período de 270 min. Como o desenvolvimento larval acontece entre 4 e 5 dias, seria interessante que a CL<sub>90</sub> fosse atingida dentro desse intervalo. A Figura 12 mostra que a CL<sub>90</sub> foi atingida em todos os ensaios de liberação controlada, independente do pH. No entanto, foi observada uma diferença significativa no tempo de liberação dessa concentração em relação ao pH = 4. Em pH neutro e básico, a CL<sub>90</sub> foi atingida após 50 min de liberação. No entanto, em pH ácido essa concentração foi atingida após 180 min.

Os perfis de liberação do óleo essencial em pH = 7 e pH = 10 são semelhantes, sendo rápido nos primeiros minutos e gradual após aproximadamente 25 min. O tempo máximo para que a concentração máxima de óleo essencial seja liberada das nanopartículas foi de 270 min, atingindo a concentração aproximada de 400 mg. mL<sup>-1</sup> em pH = 7 e pH = 10. Diferentemente, a concentração máxima de óleo essencial liberado em pH = 4 ficou em torno de 160 mg. mL<sup>-1</sup> após 270 min. Dessa forma, é possível observar que a liberação do óleo encapsulado é influenciada pelo pH do meio, sendo liberado de forma mais eficiente e rápida em pH neutro ou básico. De acordo com os dados de potencial zeta, foi observado que o pH de melhor estabilidade para o sistema é o ácido (pH = 4). Dessa forma, quando a formulação é submetida a esse pH não é observada uma desestabilização instantânea do sistema. No entanto, quando a formulação é submetida a pH neutro ou básico observa-se maior eficiência de liberação

provavelmente devido à desestabilização do sistema por estar mais próximo do ponto isoelétrico. Variados fatores podem induzir desestabilização devido às mudanças de pH. Como consequência podem ocorrer alterações nas forças de atração de Van der Waals e movimento browniano das nanopartículas. Além disso, quando um sistema começa a desestabilizar é possível observar fenômenos como floculação e coalescência (GOODWIN, 2004).

Os dados da cinética de liberação da formulação testada em diferentes valores de pH mostraram melhor adequação dos dados experimentais ao modelo de Korsmeyer-Peppas (KORSMEYER; PEPPAS, 1983). Após o ajuste das curvas ao modelo proposto, foram observados valores de  $n$  entre 0,63 e 0,67, os quais revelam que os sistemas liberam o óleo essencial pelo mecanismo de liberação de transporte anômalo (não Fickiano), tanto por mecanismo de difusão quanto por relaxamento das cadeias poliméricas. Os parâmetros obtidos pelo ajuste das curvas ao modelo de Korsmeyer-Peppas estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6: Parâmetros da cinética de liberação *in vitro* de acordo com o modelo de Korsmeyer-Peppas

parâmetros	pH 4	pH 7	pH 10
<b>K</b>	3,77	11,83	10,07
<b><i>n</i></b>	0,67	0,63	0,66
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9604	0,9604	0,9801

### 5.3 Estabilidade das formulações

O estudo de estabilidade preliminar de formulações não tem a intenção de estimar a vida útil do sistema, e sim auxiliar na triagem das mesmas. O teste de centrifugação em 13000 rpm comprovou a estabilidade preliminar da formulação, não sendo observada separação de fases ou formação de corpo de fundo nas nanoemulsões. No teste de centrifugação a força da gravidade age sobre o sistema fazendo com que as nanopartículas se movam no seu interior, simulando um aumento na força de gravidade, aumentando assim a mobilidade das nanopartículas e acelerando possíveis instabilidades, sendo observadas em forma de separação de fases, precipitação das nanopartículas e/ou coalescência (ANVISA, 2004).

Após a análise de estabilidade preliminar através do ensaio de centrifugação, estudos de estabilidade da formulação foram realizados a 25°C, sendo avaliados os parâmetros físicos pH e condutividade elétrica ao longo do tempo. Nesses ensaios de estabilidade foram monitorados



(i) o nanossistema vazio (sem óleo essencial encapsulado) e sem conservante, (ii) o nanossistema contendo óleo essencial encapsulado e conservante NE e (iii) o nanossistema contendo óleo essencial encapsulado e conservante benzoato de sódio. A finalidade de tal avaliação de estabilidade foi verificar possíveis alterações referentes à desestabilização dos sistemas, além de verificar qual a formulação mais estável ao longo do tempo para ser empregada no bioensaio de eficácia contra as larvas *A. aegypti*. Por essa razão os parâmetros físicos como pH e condutividade elétrica foram avaliados ao longo do tempo para que pudessem ser correlacionados aos dados de eficiência de encapsulamento afim de buscar indícios de como as formulações se desestabilizavam ao longo do tempo.

### 5.3.1 Avaliação do pH em função do tempo

O monitoramento do pH representa uma importante ferramenta para a avaliação da estabilidade de sistemas coloidais, uma vez que alterações em seu valor podem indicar a ocorrência de fenômenos que comprometem a qualidade do produto final. Além disso, essas mudanças de valores de pH também podem estar relacionadas à saída dos ativos encapsulados nas nanopartículas, indicando também a desestabilização da formulação. A Figura 13 mostra a variação de pH das formulações avaliadas.

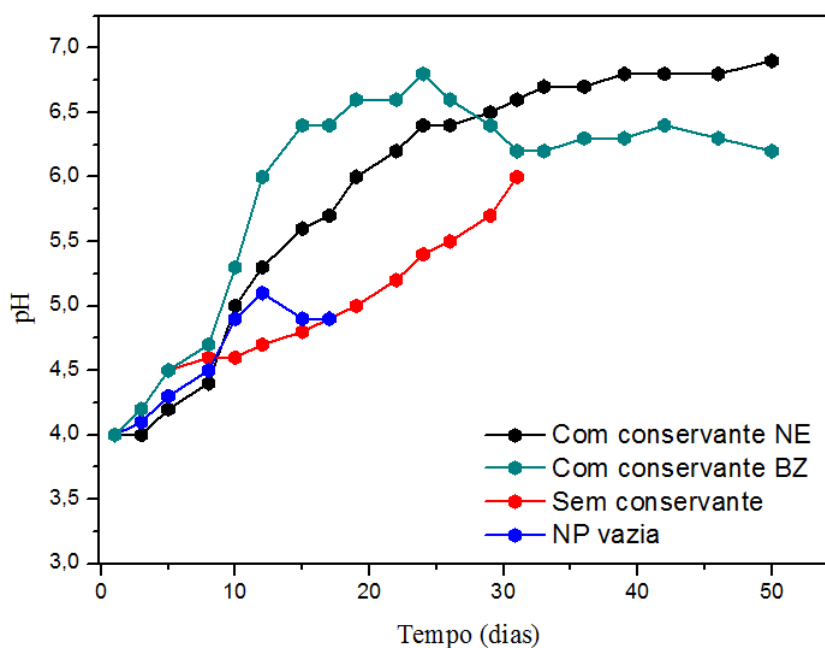


Figura 13: Avaliação do pH ao longo do tempo para os sistemas avaliados.

Todas as formulações foram inicialmente mantidas em  $\text{pH} = 4$ , de acordo com os dados obtidos por potencial zeta. Observou-se que os valores de  $\text{pH}$  das formulações foram aumentando ao longo do tempo.

Para a formulação vazia (sem óleo essencial e sem conservante), o aumento de  $\text{pH}$  chegou a 4,9 após 18 dias. A formulação sem conservante atingiu o  $\text{pH} = 6$ , estando estável por 30 dias. As formulações contendo conservantes também apresentaram aumento de  $\text{pH}$  em função do tempo, porém alcançaram uma estabilidade de 50 dias de estabilidade. Para a formulação contendo o conservante NE, as nanopartículas apresentaram  $\text{pH}$  inicial 4 e alcançou o  $\text{pH} = 6,9$  após 50 dias de avaliação. Para a formulação contendo o conservante benzoato de sódio, o  $\text{pH}$  inicial foi de 4 aumentando para  $\text{pH} 6,2$ . Além disso, a formulação contendo benzoato de sódio apresentou um comportamento de diminuição brusca de  $\text{pH}$  após 25 dias de análise. Embora ainda não se possa explicar com precisão esse comportamento, ele pode estar relacionado às interações entre os constituintes da formulação.

O aumento do  $\text{pH}$  ao longo do tempo é um indicativo de instabilidade da formulação. Correlacionando a variação do  $\text{pH}$  com a eficiência de encapsulamento, observamos que, enquanto a eficiência diminui, os valores de  $\text{pH}$  aumentam. Podemos atribuir esse fato à degradação polimérica, a qual pode se dar pela alteração na sua estrutura química, pelo relaxamento da cadeia polimérica, pelas quebras das unidades monoméricas ou ainda através da cisão aleatória de uma ligação em alguma posição ao longo da cadeia polimérica (degradação) (NOBES; MARCHESSAULT, 1999). Além disso, essa degradação faz com que o óleo essencial seja liberado das nanopartículas, diminuindo a eficiência de encapsulamento e alterando o  $\text{pH}$  da formulação. Por outro lado, o aumento do  $\text{pH}$  em função do tempo e a desestabilização das nanopartículas corroboram com os dados de potencial zeta, mostrando que a desestabilização dos sistemas tende a atingir o  $\text{pH}$  do ponto isoelétrico.

### 5.3.2 Avaliação da condutividade elétrica em função do tempo

Os valores da condutividade elétrica das formulações em função do tempo estão apresentados na Figura 14.

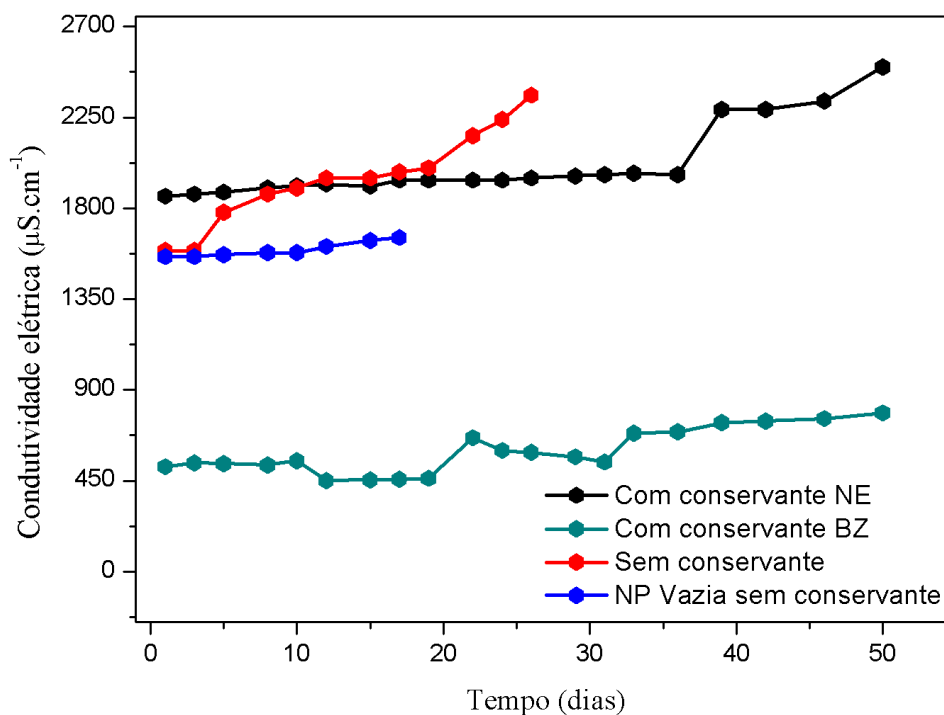


Figura 14: Avaliação da condutividade elétrica dos sistemas avaliados.

Após a adição dos conservantes, percebeu-se que as condutividades elétricas dos sistemas foram alteradas, no entanto, sem causar desestabilização dos mesmos em função da eficiência de encapsulamento. Os conservantes utilizados nas formulações podem ser considerados como orgânico (no caso do NE) e rico em ligações covalentes, e iônico (no caso do benzoato de sódio). Sabe-se que compostos iônicos se dissociam em cátion e ânion quando adicionados em água. Dessa forma, o benzoato de sódio se dissociou em solução, e os cátions provenientes deste conservante podem ter interagido quimicamente com os portadores de carga negativos disponíveis no sistema, fazendo com que a condutividade elétrica tenha diminuído para aproximadamente  $460 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Por outro lado, o sistema contendo o solvente NE apresentou condutividade inicial em torno de  $1890 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , a qual foi observada acima da condutividade inicial dos sistemas vazia e com óleo encapsulado sem conservante.

Todas as formulações avaliadas apresentaram aumento gradual da condutividade elétrica ao longo do tempo, com exceção da formulação vazia (sem óleo essencial). Acredita-se que o aumento da condutividade esteja relacionado à desestabilização do sistema e liberação do óleo essencial. De acordo com os dados de CG/EM, o óleo essencial da *Lipia alba* é rico em compostos contendo grupos eletronegativos aos quais, em solução, podem aumentar a condutividade elétrica.

Os ensaios de estabilidade relacionados à avaliação do pH e da condutividade elétrica em função do tempo mostraram que ambos os sistemas contendo os conservantes NE e benzoato de sódio apresentaram estabilidade e comportamentos próximos ao longo do tempo. Esses dados nos mostram que os dois conservantes poderiam ser utilizados nas formulações apresentadas, uma vez que a adição dos mesmos não ocasionou desestabilização de seus respectivos sistemas, além de contribuírem para o aumento da estabilidade ao longo do tempo. No entanto, o sistema contendo o conservante NE apresentou comportamentos continuados ao longo do tempo em função da eficiência de encapsulamento, pH e condutividade elétrica (diminuição brusca de valor de condutividade elétrica). Por esse motivo, essa formulação foi a escolhida para o ensaio de eficácia larvicida.

#### **5.4 Bioensaio larvicida da formulação contendo o óleo essencial encapsulado**

Estudos demonstram pronunciado potencial larvicida de óleos essenciais contra as larvas de *A. aegypti*. No entanto, devido à baixa solubilidade desses óleos em água, a sua aplicabilidade é limitada. Assim, o uso do micro/nanoencapsulamento representa uma alternativa tecnológica contra as larvas do *A. aegypti*, mantendo a eficácia biológica do óleo essencial e prolongando sua atividade (KANIS *et al.*, 2012).

A formulação contendo o óleo essencial da *L. alba* e conservante NE foi submetida ao bioensaio larvicida utilizando diferentes proporções de água/formulação, conforme mostra a Tabela 7. Foi possível avaliar a proporção necessária para a mortalidade total das larvas em um determinado período de tempo, e correlacionar esses dados com a concentração letal e ensaio de liberação. O valor da  $CL_{90}$  alcançado no bioensaio frente as larvas da *A. aegypti* foi encontrado em torno de 129,7 mg. mL<sup>-1</sup>. O ensaio de eficácia mostrou elevada atividade da formulação frente as larvas, uma vez que sua liberação ocorreu de forma progressiva e controlada, liberando a concentração necessária para a observação da mortalidade. Em todos os bioensaios, as nanopartículas vazias foram utilizadas como controle negativo e não ocasionaram mortalidade frente as larvas, indicando que o efeito observado nas formulações se deve realmente ao óleo essencial e não a qualquer outro composto presente na formulação.

Tabela 7: Ensaio de eficácia larvicida da formulação contendo conservante NE e em diferentes proporções água/formulação

Concentração (mg. mL <sup>-1</sup> )	24 h			48 h		
	Concentração (v/v)	M	T (%)	Concentração (v/v)	M	T (%)
500	Formulação sem diluição	10,0	100,0 ± 0,0	Formulação sem diluição	0,0	0,0 ± 0,0
250	1:1	10,0	100,0 ± 0,0	1:1	0,0	0,0 ± 0,0
125	1:0,6	8,7	87 ± 1	1:06	1,3	13 ± 1
62,5	1:0,25	7,7	77 ± 1	1:0,25	1,7	17 ± 1
31,2	1:0,4	1,7	17 ± 1	1:0,4	4,7	47 ± 2
15,6	1:0,1	0,3	3,0 ± 0,5	1:0,1	0,0	0,0 ± 0,0
--	Controle	0,0	0,0 ± 0,0	Controle	0,0	0,0 ± 0,0

M: número médio de larvas mortas obtido em triplicata; T(%): Percentual de larvas mortas.

Os resultados avaliados demonstraram que a formulação sem diluição e a diluída na proporção 1:1 (250 mg. mL<sup>-1</sup>) resultaram em 100% de mortalidade larval após análise de 24 h. Esses dados corroboram com aqueles encontrados no ensaio larvicida do óleo essencial *in natura* uma vez que, tanto a formulação sem diluição quanto a diluída na proporção 1:1 (250 mg. mL<sup>-1</sup>) apresentam concentrações de óleo encapsulado superiores à CL<sub>90</sub>.

A diluição 1:0,6 resultou em 100% de mortalidade das larvas após 48 h. Uma vez que a concentração de óleo essencial na diluição 1:0,6 (125 mg. mL<sup>-1</sup>) está na faixa da CL<sub>90</sub>, foi possível observar maior percentual de mortalidade nas primeiras 24 h (87 ± 1)%, atingindo 100% de mortalidade em 48 h. Diluições abaixo de 1:0,6 não resultaram em 100% de mortalidade das larvas após 48 h. No entanto, a diluição 1:0,25 apresentou um expressivo potencial larvicida após 24 h de análise, chegando a quase 80%.

Esses dados possibilitaram a elucidação de importantes hipóteses acerca da mortalidade das larvas. A primeira delas está relacionada ao fato da obtenção da CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> somente após 72 h de análise. No entanto, a mortalidade das larvas foi verificada, para algumas concentrações, logo nas primeiras 24 h. Isso nos leva a pensar que a formulação contendo nanopartículas óleo essencial encapsulado pode apresentar diferentes mecanismos de interação com as larvas quando comparado com o mecanismo de interação das mesmas com o óleo essencial *in natura*. Podemos sugerir que tamanho das nanopartículas permitiu a entrada das mesmas através da membrana celular larval, interferindo nos processos fisiológicos por toxicidade. Isso pode ser constatado pois o valor da CL<sub>90</sub> foi comprovado no ensaio de eficácia, no entanto, o tempo de mortalidade foi consideravelmente diminuído (de 72 h no bioensaio do óleo essencial *in natura* para 24 h no bioensaio de eficácia da formulação contendo óleo essencial encapsulado). Alguns

autores relatam que a maioria das larvas ingerem maiores proporções de material orgânico particulado até em torno de 50  $\mu\text{m}$  (J *et al.*, 2012), permitindo a incorporação de bioativos em nanopartículas e facilitando a ingestão pelas larvas (EISENBERG; WASHBURN; SCHREIBER, 2000).

Os estudos com a aplicação de nanopartículas biodegradáveis para formulações de larvicida ainda é pouco explorado, porém, nesse trabalho pode-se observar que a toxicidade do óleo essencial da *L. alba* foi mantida após a sua encapsulação. Com base nesses estudos pode-se observar que o encapsulamento de compostos naturais e biodegradáveis se torna uma alternativa interessante para aplicação larvicida e por ser um método que não utiliza solventes nocivos ao ambiente. Finalmente, o ensaio de eficácia da formulação contendo óleo essencial encapsulado permitiu a proposição de uma aplicação para essa formulação. Como os resultados mostram que essa formulação pode ser diluída até a proporção 1:0,25 para a obtenção de eficácia larvicida em até 24 h, seria uma boa alternativa para o controle larvicida doméstico, podendo ser adicionado em pratos de vasos de plantas, canaletas externas, lixeiras etc.

## 6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi empregado um conjunto de técnicas para desenvolver uma formulação contendo o óleo essencial de *L. alba* encapsulado em nanopartículas produzidas a base de PCL para agirem como larvicidas frente o *A. aegypti*.

No processo de extração por hidrodestilação, o óleo essencial de *L. alba* apresentou um grande potencial em rendimento e densidade. Devido à sua abundância em diversas áreas do país, sua aplicação como larvicida poderia se tornar viável.

O resultado obtido na análise cromatográfica identificou como componentes majoritários do óleo essencial a Carvona e o Limoneno. Embora não se tenha encontrado ação antioxidante e enzimática do óleo essencial, ficou evidenciada sua ação larvicida. Esta propriedade larvicida deve-se muito provavelmente aos componentes majoritários da *L. alba* que, de acordo com a literatura, tem grande potencial larvicida, ou também por meio da sinergia entre os vários compostos do óleo essencial existente na planta.

A eficiência de encapsulamento para as formulações contendo os conservantes apresentaram comportamentos semelhantes ao longo do tempo. Ambas as formulações, com NE e com benzoato de sódio, atingiram 70% de eficiência de encapsulamento simultaneamente, registrada após 50 dias de análise. A liberação do óleo essencial da *L. alba* foi avaliada por um período de 270 min. O ensaio de eficácia mostrou elevada atividade da formulação frente as larvas, uma vez que sua liberação ocorreu de forma progressiva e controlada. Podemos sugerir que tamanho das nanopartículas permitiu a entrada das mesmas através da membrana celular larval, interferindo nos processos fisiológicos por toxicidade. Isso pode ser constatado pois o valor da  $CL_{90}$  foi comprovado no ensaio de eficácia, no entanto, o tempo de mortalidade foi consideravelmente diminuído (de 72 h no bioensaio do óleo essencial *in natura* para 24 h no bioensaio de eficácia da formulação contendo óleo essencial encapsulado). Com base nesses estudos pode-se observar que o encapsulamento de compostos naturais e biodegradáveis se torna uma alternativa interessante para aplicação larvicida, além da formulação proposta não apresentar componentes químicos nocivos ao ambiente. Como os resultados mostram que essa formulação pode ser diluída até a proporção 1:0,25 para a obtenção de eficácia larvicida em até 24 h, seria uma boa alternativa para o controle larvicida doméstico.

## 7. REFERÊNCIAS

ABREU, F. O. M. S. et al. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1277–1282, 2012.

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Allured Publishing Corporation, Carol Stream**, p. 1–804, 2007.

AGUIAR, D. L. UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO TECNOLOGIA ALTERNATIVA AOS INSETICIDAS SINTÉTICOS PARA O CONTROLE DO *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE). **Dissertação de Mestrado**, p. 57, 2011.

AGUIAR, J. S. et al. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 436–440, 2009.

ALLEN, J.; LOYD, V.; POPOVICH, N. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos de Ansel**. 9ª ed. São Paulo: Artmed, 2013.

AMAZONAS, G. **Amazonas tem 12 cidades em alerta ou risco para surto de dengue, zika e chikungunya**. Disponível em: <<https://g1.globo.com/am/amazonas/noticia/2018/12/12/amazonas-tem-12-cidades-em-alerta-ou-risco-para-surto-de-dengue-zika-e-chikungunya.ghtml>>. Acesso em: 6 mar. 2019.

ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos - séries temáticas**. 1ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária., 2004.

ATTI-SERAFINI, L. ATTI-SERAFINI, L. et al. Variation in essential oil yield and composition of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. grown in southern Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2002.

AZEVEDO, S. G. et al. Bioactivity of *Licaria puchury*-major Essential Oil Against *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. **Nat. Prod**, v. 12, p. 229–238, 2018.

BAIS, D. et al. Rheological characterization of polysaccharide–surfactant matrices for cosmetic O/W emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 290, n. 2, p. 546–556, 15 out. 2005.

BRAMOSANTI, M. et al. Microfluidic-assisted nanoprecipitation of antiviral-loaded polymeric nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 532, p. 369–376, nov. 2017.

CAMPELO, P. H. et al. Stability of lime essential oil emulsion prepared using biopolymers and ultrasound treatment. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 1, p. S564–S579, 2017.

CASTRO, D. M.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de folhas de *Lippia alba* (Mill.)N.E.Br. em diferentes épocas de colheita e partes do ramo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2002.

CHRISTOFOLI, M. et al. Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae) in *Bemisia tabaci* populations. **Industrial Crops and**



**Products**, v. 70, p. 301–308, 2015.

COSTA, J. G. M. et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 304–309, 2005.

CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering: C**, v. 80, p. 771–784, nov. 2017.

CRUPI, V. et al. UV-vis and FTIR-ATR spectroscopic techniques to study the inclusion complexes of genistein with-cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 110–117, 2007.

DA BOTAS, G. S. et al. *Baccharis reticularia* DC. and Limonene Nanoemulsions: Promising Larvicidal Agents for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1–14, 2017.

DA ROSA, C. G. et al. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 481, p. 337–344, 2015.

DA SILVA, A. C. C. et al. HS-SPME as an efficient tool for discriminating chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Quim. Nova**, v. 40, n. 1, p. 42–46, 2017.

DE SOUZA, R. C. et al. Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* against *Aeromonas* spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, p. 29–33, 1 dez. 2017.

DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M. Entomological Surveillance and Control of Dengue Fever Vectors. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 259–272, 2002.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305–311, 2005.

DURAN, N.; CAPPARELLI, M.; MORAES, C. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. 1ª ed. São Paulo: Artliber, 2006.

EISENBERG, J.; WASHBURN, J.; SCHREIBER, S. Generalist feeding behaviors of *Aedes sierrensis* larvae and their effects on protozoan populations. **Ecological Society of America**, v. 81, n. 4, p. 921–935, 2000.

EL-SAY, K. M.; EL-SAWY, H. S. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 528, n. 1–2, p. 675–691, 7 ago. 2017.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 55, 1989.

FORATTINI, O. P. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11, n. 1, p. 157–158, 1995.

FRANCISCO JB DOS SANTOS, A. D. L. et al. Composição e Atividade Biológica de Óleos Essenciais de *Lippia origanoides* HBK. **Journal de Essential Oil**, 2004.

GAONKAR, R. H. et al. Garcinol loaded vitamin E TPGS emulsified PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization, in vitro and in vivo studies. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 530, 3 dez. 2017.

GHAEMISHAHRESTANI, Z. Tunable Synthesis of Gelatin Nanoparticles Employing Tunable Synthesis of Gelatin Nanoparticles Mploying Sophorolipid and Plant Extract , a Promising Drug. **World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. May, p. 1365–1381, 2015.

GHORBANI, F. M. et al. PCL/chitosan/Zn-doped nHA electrospun nanocomposite scaffold promotes adipose derived stem cells adhesion and proliferation. **Carbohydrate Polymers**, v. 118, p. 133–142, 2015.

GIRARD, E. A. Volume, biomassa e rendimento de óleos essenciais do craveiro ( *Pimenta pseudocaryophyllus* ( GOMES ) landrum ). **Rev. Acad.**, n. 2, p. 147–165, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GOMES, E. C. et al. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, 1993.

GOVINDARAJAN, M. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. **Parasitology Research**, v. 110, n. 5, p. 2023–2032, 2012.

GRILLO, R. et al. Poly( $\epsilon$ -caprolactone)nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 231–232, p. 1–9, set. 2012.

GUALDRÓN, A. F. et al. Inhibitory effect of Eucalyptus and *Lippia Alba* essential oils on the corrosion of mild steel in hydrochloric acid. v. 4, n. 1, p. 143–158, 2013.

GUTIERRES, J. M. et al. Neuroprotective effect of anthocyanins on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia in rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 33, p. 88–97, 1 abr. 2014.

HADIAN, M. et al. Encapsulation of *Rosmarinus officinalis* essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antibacterial activity in beef cutlet against *Salmonella typhimurium* during refrigerated storage. **LWT**, v. 84, p. 394–401, 1 out. 2017.

HENNEBELLE, T. et al. Antioxidant and Neurosedative Properties of Polyphenols and Iridoids from *Lippia alba*. **Phytother.Res.**, v. 258, p. 256–258, 2008.

HIGUCHI T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 1–2, 1961.

J, S. S. et al. Larvicidal Potential of Biologically Synthesised Silver Nanoparticles against *Aedes Albopictus*. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 1, n. January 2012, p. 52–56, 2012.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 8<sup>a</sup> ed. São Paulo: nacional, 1987.

JULIÃO, L. S. et al. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (erva-cidreira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 36–38, 2003.

KANIG, L. L. ·HERBERT A. L. ·JOSEPH L. **Teoria e prática farmacêutica**. Lisboa: FUNDAÇÃO CALOUSTE GULBENKIAN, 2001.

KANIS, L. A. et al. Larvicidal activity of *Copaifera* sp. (Leguminosae) oleoresin microcapsules against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p. 1173–1178, 2012.

KIM, G. M. et al. Electrospinning of PCL/PVP blends for tissue engineering scaffolds. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 6, p. 1425–1442, 2013.

KORSMEYER, R.; PEPPAS, N. Macromolecular and modeling aspects of swelling controlled systems. In *Controlled Release Delivery Systems*, eds. p. 77–90, 1983.

LASSALLE, V.; FERREIRA, M. L. PLA nano- and microparticles for drug delivery: An overview of the methods of preparation. **Macromolecular Bioscience**, v. 7, n. 6, p. 767–783, 2007.

LENZI, M. K. et al. Semibatch Styrene Suspension Polymerization Processes. **J Appl Polym Sci**, v. 89, p. 3021–3038, 2003.

LISBOA, H. DE M. Efeitos causados pela poluição atmosférica- Cap 3. **Controle da Poluição Atmosférica**, 2007.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143–154, 2006.

LÓPEZ, M. D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 2, p. 284–288, 1 mar. 2010.

MAMANI, E. Nuevo serotipo 5 del virus dengue: necesidad de fortalecer la vigilancia molecular en Perú. **Revista peruana de medicina experimental y salud pública**, v. 31, n. 1, p. 169–180, 2014.

MANADAS, R. et al. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista brasileira de ciencias farmaceuticas**, v. 38, 2002.

MAR, J. M. et al. *Lippia organoides* essential oil: An efficient alternative to control *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. **Industrial Crops and Products**, v. 111, n. October 2017, p. 292–297, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 34 de 2018. v. 49, 2018.

MOLYNEUX, P. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. **Songklanakarín Journal of Science and Technology**, v. 26, n. December 2003, p. 211–219, 2004.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Pharmaceutical Nanotechnology Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113–142, 2010a.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Pharmaceutical Nanotechnology Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113–142, 2010b.

MOREIRA, R. DE C. T. et al. Abordagem Etnobotânica acerca do Uso de Plantas Medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta Farm. Bonaerense**, 2002.

NIST. **NIST Standard Reference Data**. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry>>.

NOBES, G. A. R.; MARCHESSAULT, R. H. Enzymology of the Synthesis and Degradation of Polyhydroxyalkanoates. **American Chemical Society**, 1999.

OLIVEIRA, B. R. DE. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de Carapa guianensis e Copaifera sp. e estudo da ação repelente frente a Aedes aegypti**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2008.

PEIXOTO, M. G. et al. Acaricidal activity of essential oils from Lippia alba genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against Rhipicephalus microplus. **Veterinary Parasitology**, v. 210, p. 118–122, 2015.

PERES, M. C. **Nanoencapsulamento do óleo essencial das folhas e frutos de Xylopia aromatica Lamm. e sua atividade frente a oviposição de bemisia tabaci (Genn.)**. [s.l.] Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, 2015.

PUERTAS-MEJÍA, M. et al. In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (Origanum vulgare L.) essential oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, n. 5, p. 380–384, 2002.

RAMAMOORTHY, M.; RAJIV, S. L-carvone-loaded nanofibrous membrane as a fragrance delivery system: Fabrication, characterization and in vitro study. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, n. 6, p. 334–339, 2014.

REN, L. et al. Determination of sodium benzoate in food products by fluorescence polarization immunoassay. **Talanta**, v. 121, p. 136–143, 1 abr. 2014.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 37–42, 1 jun. 1987.

ROLAND, I. et al. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, n. 1–2, p. 85–94, 2003.

SANDER, A.; BIZERRA, R.; SILVA, V. V. Caracterização de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos : Mecanismos e Aplicações. p. 4–6, 2015.

SANITÁRIA, A. N. DE V. **Farmacopeia Brasileira**. 5<sup>a</sup> ed. Brasília: Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

SANTOS, N. et al. Cytotoxic and Antimicrobial Constituents from the Essential Oil of *Lippia alba* (Verbenaceae). **Medicines**, v. 3, n. 3, p. 22, 2016.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 671–5, jul. 2012.

SENL, F. S.; ORHAN, I. E.; USTUN, O. In vitro cholinesterase inhibitory and antioxidant effect of selected coniferous tree species. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 4, p. 269–275, abr. 2015.

SHEKHAR, T. C.; ANJU, G. Antioxidant activity by DPPH radical scavenging method of *Ageratum conyzoides*. **American Journal of Ethnomedicine**, v. 1, n. 4, p. 244–249, 2014.

SILVA, L. S. et al. Encapsulation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* essential oils in gelatin nanoparticles: a possible sustainable control tool of *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. June, 2018.

SILVA, N. A. et al. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 52–55, 2006.

SINHA, V. R. et al. Poly-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1–23, 2004.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 20, 2001.

SOPPIRNATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M. Water transport and drug release study from cross-linked polyacrylamide grafted guar gum hydrogel microspheres for the controlled release application. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2001.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANT, M. H. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de Polímeros Pré-formados – Parte II. **Polímeros**, 2012.

SPRICIGO, R. et al. Efeitos sobre as Propriedades de Dissolução do Fármaco. **Am. J. Pharm**, v. 27, n. 5, p. 645–53, 2008.

STASHENKO, E. E. et al. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia verbenaceae. **Rev. Acad. Colomb. Cienc**, 2003.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, 2004.

VERA, S. S. et al. Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 113, n. 7, p. 2647–2654, 2014.

VILLANOVA, JANAINA C. O; ORÉFICE, RODRIGO L.; CUNHA, A. S. Polímeros em Medicamentos Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51–64, 2010.

XING, F. et al. Nanoencapsulation of capsaicin by complex coacervation of gelatin, acacia, and tannins. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 96, n. 6, p. 2225–2229, 2005.

YAMAMOTO, P. Y. et al. Performance of ginger grass (*Lippia alba*) for traits relates to the production of essential oil. **Sci. Agric.**, v. 65, n. 5, p. 481–489, 2008.

YILMAZ, M. T. et al. Electrospraying method for fabrication of essential oil loaded-chitosan nanoparticle delivery systems characterized by molecular, thermal, morphological and antifungal properties. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 52, p. 166–178, 2019.

ZHANG, S. et al. Preparation and structural characterization of corn starch–aroma compound inclusion complexes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 1, p. 182–190, 2017.