

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

**Encapsulamento do óleo essencial da *Piper nigrum* sob
influência de temperatura e conservantes na estabilidade das
formulações para controle larvicida de *Anopheles aquasalis***

AYNÁ CAROLINE MARCIÃO VIEIRA

MANAUS

2020

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

**Encapsulamento do óleo essencial da *Piper nigrum* sob
influência de temperatura e conservantes na estabilidade das
formulações para controle larvicida de *Anopheles aquasalis***

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

Orientador: Prof. Dr. Edgar A. Sanches

MANAUS

2020

Ficha Catalográfica

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

V658i Vieira, Ayná Caroline Marcião
Influência da temperatura e conservantes no encapsulamento e estabilidade de formulações contendo óleo essencial da Piper nigrum para controle larvicida de Anopheles aquasalis / Ayná Caroline Marcião Vieira . 2020
86 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Biopolímeros. 2. Nanopartículas. 3. Encapsulamento. 4. Óleos essenciais. 5. Piper nigrum. I. Sanches, Edgar Aparecido. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

*Ao universo Deus de todas as coisas e à minha
família.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, aos meus pais Auxiliadora Vieira e Sergio Vieira, pelo amor incondicional, compreensão, companheirismo, confiança e força durante esses anos. Sem o amor deles nada seria possível.

Aos meus irmãos, pelo amor e compreensão, e meus familiares principalmente avós (em memória do meu avô João), tios e tias que, com amor, compreensão e ajuda, contribuíram para meu progresso.

Ao Gabriel Rodrigues, pelo amor, pela amizade, pela força e parceria. Sem você o caminho pareceria mais difícil e desanimador.

A todos os meus amigos, em especial aos amigos Carlos Castro e Higor Freitas pelas conversas inteligentes, pela força e pelas risadas através de seu bom humor e, principalmente, pela amizade.

A todos os amigos que fiz no PPGCEM, vocês alegraram meus dias na Universidade, sou muito grata por tê-los conhecido.

Ao Prof. Dr. Edgar A. Sanches pela orientação, ensinamentos, esclarecimentos, paciência, principalmente pela oportunidade e disposição em ajudar sempre.

Ao corpo técnico e aos professores dos laboratórios parceiros onde análises complementares foram realizadas.

Aos pesquisadores da FMT-AM, em especial, Dr. Grafe Pontes e Dra Silvia Justiniano pela parceria, disposição em ajudar, ensinar, e por agregarem conhecimento a esta pesquisa.

Aos discentes da FMT-AM que me ajudaram nessa pesquisa, em especial ao discente Ramon Linhares pela disposição em ajudar sempre e agregar conhecimento.

Ao Professor Walter Castro por sempre ter compartilhado comigo seus ensinamentos no estágio e durante toda a minha vida acadêmica, e pela disposição em ajudar sempre.

A todos os professores do Departamento de Engenharia de Materiais pelos ensinamentos. Sem eles a Pós-Graduação seria apenas um sonho.

A todos os professores do PPGCEM, pelos ensinamentos e disposição em ajudar.

A todos meus colegas do laboratório NANOPOL e corpo técnico, em especial ao Doutorando Sidney Azevedo. Suas instruções e conhecimento possibilitaram meu desenvolvimento profissional no laboratório.

A FAPEAM, pelo apoio financeiro concedido através do Edital Universal Amazonas 2019.

A todos, que de forma direta ou indireta agregaram conhecimento e valor a esta pesquisa, valores durante o mestrado e também para a vida.

“Somos escravos do tempo e amantes da eternidade”

Hearts in Atlantis

RESUMO

Bioativos alternativos de baixa toxicidade para controlar pragas urbanas estão sendo comumente empregados em pesquisas. Com o problema da substituição de pesticidas, estudos têm utilizado extratos de plantas com propriedades capazes de eliminar pragas urbanas desde o seu estágio larval. Dessa forma, esta pesquisa teve como objetivo desenvolver formulações de partículas poliméricas carregadas de óleo essencial de *Piper nigrum* para aplicação biolarvicida, considerando a influência da temperatura (35 °C) e conservantes. Análises de estabilidade foram realizadas para a caracterização das formulações a 35 °C sob curto (120 dias) e longo prazo (12 meses). As análises de estabilidade reportaram a formulação contendo o conservante NE como melhor desempenho a longo prazo. Os parâmetros de estabilidade indicaram que as formulações avaliadas por um curto período permaneceram estáveis por 120 dias (data de validade regular dos produtos em uso) e a longo prazo, por 5 meses. Nos ensaios larvicidas em condições de semi-campo com óleo essencial *in natura* foi observada a variação na mortalidade larval em diferentes concentrações. Nas primeiras 24 h, houve uma progressão linear entre os valores de mortalidade, tornando-se menos pronunciados após 48 h e mantendo-se constantes por 72 h. A partir dos valores selecionados no experimento de semi-campo, as DL₅₀ e DL₉₀ foram calculadas. Nas primeiras 24 h, a DL₅₀ e DL₉₀ registram valores de 229 µg.mL⁻¹ e 628 µg.mL⁻¹, respectivamente. Em 48 h, esses valores diminuíram para 166 µg.mL⁻¹ e 370 µg.mL⁻¹ e, finalmente, em 72 h, para 74 µg.mL⁻¹ e 356 µg.mL⁻¹. As partículas contendo óleo essencial mostraram que em 48 h as concentrações de 300 e 500 µg.mL⁻¹ atingiram mortalidade superior a 90%, corroborando aos resultados da liberação controlada. Portanto, acredita-se contribuir com essa pesquisa através do desenvolvimento de uma formulação efetiva e de baixa toxicidade com propriedades larvicidas frente a anofelinos.

Palavras-chave: Biopolímeros. Nanopartículas. Encapsulamento. Óleos Essenciais. *Piper nigrum*.

ABSTRACT

Alternative low toxicity bioactives to control urban pests are being commonly used in research. With the problem of pesticide substitution, studies can use plant extracts with characteristics capable of eliminating urban pests from their larval stage. Thus, this research aimed to develop formulations of polymeric nanoparticles loaded with *Piper nigrum* essential oil that include larvicidal application, considering the influence of temperature (35° C) and preservatives. Stability analyzes were performed to characterize formulations at 35 ° C under short (120 days) and long term (12 months). The reported stability statistics include the preservative NE as the best long-term performance. The stability parameters indicated that the formulations evaluated for a short period remain stable for 120 days (data of regular validity of the products in use) and a long term, for 5 months. In the larvicidal bioassays under semi-field conditions using the *in natura* essential oil, a variation in larval mortality was observed at different concentrations. In the first 24 h, there was a linear progress among the mortality values, becoming less pronounced after 48 h and remaining constant for 72 h. From the values selected in the semi-field experiment, the LD₅₀ and DL₉₀ were calculated. In the first 24 h, the DL₅₀ and DL₉₀ recorded values of 229 µg.mL⁻¹ and 628 µg.mL⁻¹, respectively. After 48 h, these values decrease to 166 µg.mL⁻¹ and 370 µg.mL⁻¹ and, finally, in 72 h, to 74 µg.mL⁻¹ and 356 µg.mL⁻¹. The encapsulated essential oil resulted in mortality above 90 % after 48 h, corroborating the results of controlled activation. Therefore, this research may contribute to the development of an effective and low toxicity controlling agent with larvicidal properties against *A. aquasalis*.

Keywords: Polymers. Particles. Encapsulation. Essencial oils. *Piper nigrum*.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Tipos de nanopartículas orgânicas: (a) Nanopartícula polimérica orgânica em formato micelar e (b) Nanopartícula lipídica. Fonte: BEJARANO et. al. (2018). Adaptado.	12
Figura 2 – Formação de nanopartículas de gelatina. Fonte: KHAN e SCHNEIDER (2013). Adaptado.	13
Figura 3 – Fórmula química estrutural da gelatina. Fonte: YASMIN et. al. (2017).....	13
Figura 4 – Pimenta do reino (<i>Piper nigrum</i>): óleo, grão e planta. Fonte: Aromatic.co.uk.	16
Figura 5 – Níveis de substância liberada no organismo em relação ao tempo de liberação. Fonte: LIECHTY et al. (2010).	17
Figura 6 – Representação do princípio ativo inserido no núcleo da nanopartícula (a) e princípio ativo disposto na superfície da nanoesfera. Fonte: A autora.	18
Figura 7 – Mecanismos de liberação de ativos de NPs poliméricas: (A) difusão através de poros preenchidos por água, (B) difusão através da matriz polimérica, (C) bombeamento osmótico e (D) erosão. Fonte: KAMALY et al. (2016).	19
Figura 8 – Fase do ciclo de vida dos Anophelinos. Fonte:: Williams (2013).	20
Figura 9 – Mosquito da espécie <i>Anophles aquasalis</i> . Fonte: Fiocruz (2012).	21
Figura 10 – Etapas da metodologia adotada neste estudo. Fonte: A autora.	23
Figura 11 – Sistema para extração por hidrodestilação. Fonte: A autora.....	24
Figura 12 – Síntese de nanopartículas com PCL e Gelatina. Fonte: A autora.	25
Figura 13 – Nanopartículas contendo OEPN constituída por bicamada de PCL e gelatina. Fonte: A autora.	26
Figura 14 – Curva de calibração do óleo essencial. Fonte: A autora.	29
Figura 15 – Bioensaio larvicida utilizando OE de <i>P. nigrum in natura</i> . Fonte: A autora..	32
Figura 16 – Bioensaios com a formulação desenvolvida (a), <i>in vitro</i> (b), <i>in loco</i> (c), (d) e (e). Fonte: A autora.	34
Figura 17 – Gráfico da cinética de extração do óleo essencial. Fonte: A autora.	35

Figura 18 – Índice de refração do óleo essencial da <i>Piper nigrum</i> . Fonte: A autora.....	36
Figura 19 – Estrutura química dos constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de <i>Piper nigrum</i> (a) Sabineno, (b) Silvestreno e (c) <i>B-cariofileno</i> . Fonte: CHEMSPIDER (2019), adaptado.....	37
Figura 20 – Formulações contendo conservantes NE – 1, MI – 2, EDTA – 3, BZNa – 4, Ác. Cítrico – 5, Timol – 6, Sem conservante – 7. (a) sistemas avaliados sob 14 dias e (b) sistemas avaliados em 30 dias. Fonte: A autora.	40
Figura 21 – Avaliação dos parâmetros de estabilidade das formulações em função do tempo (dias) mediante a adição de conservantes: (a) pH, (b) condutividade elétrica, (c) turbidez e (d) Eficiência de Encapsulamento. Fonte: A autora.	41
Figura 22 – Análise dos parâmetros de estabilidade das formulações em função do tempo (120 dias) e análise de estabilidade de curta duração mediante a adição de conservantes: (a) pH, (b) condutividade elétrica, (c) turbidez e (d) Eficiência de Encapsulação. Fonte: A autora.	43
Figura 23 – Análise de cor sob curta duração, 24 h após síntese, respectivamente com conservantes NE e MI (a), e após 120 dias (b). Fonte: A autora.	44
Figura 24 – Análise dos parâmetros de estabilidade das formulações em função do tempo e análise de estabilidade de longa duração mediante a adição de conservantes: (a) pH, (b) condutividade elétrica, (c) turbidez e (d) Eficiência de Encapsulação. Fonte: A autora.	45
Figura 25 – Análise de cor sob Longa Duração após 24 h de síntese (a) com conservantes NE e MI, (b) após 8 meses e (c) após 12 meses. Fonte: A autora.	45
Figura 26 – Gráfico de medidas de Potencial Zeta da (a) formulação contendo conservante NE e (b) do nanossistema contendo conservante MI. Fonte: A autora.	48
Figura 27 – Distribuição de tamanho de partículas da formulação contendo o conservante NE. Fonte: A autora.	49
Figura 28 – (a) Deflexão, (b) Topografia das nanopartículas com óleo essencial no primeiro dia de análise, (c) após a síntese, (d) nanopartícula em aproximação em escala 180 nm e (e) dimensão de Vértice e Co-vértice e distribuição do diâmetro médio das partículas por ajuste Gaussiano. Fonte: A autora.	50
Figura 29 – Imagens de AFM de partículas após 60 dias carregadas com óleo essencial de <i>Piper nigrum</i> : (a) Topografia em 3D das nanopartículas e (c) Gráfico de distribuição do diâmetro médio das partículas por ajuste Gaussiano. Fonte: A autora.....	51

Figura 30 – Imagens de AFM de partículas vazias (a) Topografia em 3D das partículas e (c) Gráfico de distribuição do diâmetro médio das partículas representadas através de ajuste gaussiano.....	52
Figura 31 – (a) Partícula com OE da <i>Piper nigrum</i> mantida a 25 °C e (b) Topografia 3D das partículas contendo OE e mantidas a 25 °C.	53
Figura 32 – Espectros de FTIR das amostras NPV, NPOE e OEPN. Fonte: A autora.	54
Figura 33 – Termogravimetria (TG/dTG) das amostras NPV, NPOE e OE. Fonte: A autora.	55
Figura 34 – Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) das amostras NPV, NPOE e OE, com fluxo convencional exotérmico (picos) e endotérmico (vales). Fonte: A autora.	56
Figura 35 – Curvas de liberação controlada em diferentes pH para o sistema contendo conservante NE. Fonte: A autora.	58
Figura 36 – Mortalidade <i>versus</i> concentração. Bioensaio com óleo essencial <i>in natura</i> . (a) experiência <i>in loco</i> (semi-campo) e (b) experiência <i>in vitro</i> (laboratorial). Fonte: A autora.	59
Figura 37 – Aspecto das larvas mortas e suas respectivas concentrações: esquerda para direita 125, 250, 375, 454, 625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e controle. Fonte: A autora.	60
Figura 38 – Gráfico das mortalidades médias das larvas por concentrações de partículas carregadas com óleo essencial da <i>P. nigrum</i> (a) <i>in vitro</i> e (b) <i>in loco</i> , onde C corresponde ao Controle. Fonte: A autora.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações utilizadas para controle larvicida da formulação desenvolvida. Fonte: A autora.	33
Tabela 2 – Constituintes do óleo essencial da <i>Piper nigrum</i> . Fonte: A autora.	38
Tabela 3 – Análise de Potencial Zeta do sistema contendo conservante NE e MI. Fonte: A autora.	47
Tabela 4 – Média de tamanho hidrodinâmico de partículas e diâmetro médio da formulação contendo o conservante NE. Fonte: A autora.	49
Tabela 5 –Parâmetros da cinética de liberação <i>in vitro</i> do sistema contendo conservante NE. Fonte: A autora.	57
Tabela 6 -Atividade larvicida do óleo essencial da <i>P. nigrum</i> em larvas de <i>A. aquasalis</i> em ensaio <i>in loco</i> . Fonte: A autora.	61
Tabela 7 –Atividade larvicida das partículas carregadas com óleo essencial da <i>P. nigrum</i> em larvas de <i>A. aquasalis</i> . Ensaio <i>in vitro</i> e <i>in loco</i> . Fonte: A autora.	62

LISTA DE ABREVIATURAS

TG	Termogravimetria
dTG	Derivada Termogravimétrica
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
UV-VIS	Ultravioleta e Visível
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> (Microscopia de Força Atômica)
OE	Óleo Essencial
NPV	Nanopartícula Vazia
NPOE	Nanopartícula com Óleo Essencial
EE	Eficiência de Encapsulação
PDI	Índice de Polidispersão

LISTA DE SÍMBOLOS

S.cm ⁻¹	Siemens por centímetro
°C	Grau Celsius
µg.mL ⁻¹	Miligrama por mililitro
nm	Nanômetro
µm	Micrômetro
v/v	Volt por Volt
mL	Mililitro
h	Horas
Hz	Hertz
mg	Miligrama
min	Minuto
J/g	Joule por grama
cm	Centímetro
mS.cm ⁻¹	Milisiemens por centímetro
mV	Milivolt
L	Litro
NTU	Unidade de Turbidez Nefelométrica
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo Geral.....	11
2.2. Objetivos Específicos	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1. Nanopartículas orgânicas	12
3.1.1. Nanopartículas a base de gelatina	12
3.1.2. Nanopartículas de poli-ϵ-caprolactona (PCL)	14
3.2. Óleos Essenciais	15
3.3. <i>Piper nigrum</i>	15
3.4. Liberação controlada de substâncias.....	17
3.4.1. Mecanismos de liberação controlada	18
3.5. <i>Anopheles aquasalis</i> , a malária e o controle do vetor	20
4. METODOLOGIA	23
4.1. Extração e Caracterização do óleo essencial da <i>Piper nigrum</i>	23
4.2. Sistemas Nanoparticulados	25
4.2.1. Desenvolvimento das formulações	25
4.2.2. Estabilidade das formulações em diferentes conservantes	27
4.2.2.1. Avaliação do pH	28
4.2.2.2. Avaliação da Condutividade Elétrica	28
4.2.2.3. Análise da Turbidez	28
4.2.2.4. Eficiência de Encapsulamento	28
4.2.3. Liberação Controlada <i>in vitro</i>	29
4.2.4. Caracterização físico-química das formulações	30
4.2.4.1. Análise por AFM e distribuição do tamanho de partícula	30
4.2.4.2. Análise por FTIR	30

4.2.4.3.	Análise por TG/dTG e DSC.....	31
4.2.4.4.	Potencial Zeta e Tamanho de Partícula	31
4.2.5.	Bioensaio Larvicida.....	31
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5.1.	Caracterização do Óleo Essencial	35
5.1.1.	Cinética de extração e rendimento	35
5.1.2.	Determinação dos constituintes químicos do Óleo Essencial por CG/	36
5.2.	Estabilidade das Formulações.....	39
5.2.1.	Estabilidade das Formulações na Fase I.....	39
5.2.2.	Estabilidade das Formulações na Fase II utilizando os Conservantes NE e MI.....	42
5.2.3.	Estabilidade das Formulações na Fase II utilizando os Conservantes NE e MI....	44
5.3.	Caracterização físico-química das formulações.....	47
5.3.1.	Potencial Zeta e Tamanho de partícula	47
5.3.2.	Análise Topográfica por AFM e distribuição do tamanho de partícula	49
5.3.3.	Análise por FTIR.....	53
5.3.4.	Análise por TG/dTG e DSC.....	54
5.3.5.	Liberação Controlada <i>in vitro</i>	56
5.4.	Bioensaio larvicida.....	58
5.4.1.	Bioensaio larvicida com óleo essencial <i>in natura</i>	58
5.4.2.	Bioensaio larvicida com nanopartículas carregadas.....	62
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

O encapsulamento de ativos é uma técnica utilizada para encapsular substâncias, geralmente bioativos, visando promover a liberação controlada em um meio de dispersão. Tal técnica é comumente empregada nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e alimentícias (MOZAFARI et. al., 2006). Partículas poliméricas usadas como carreadores para o processo de liberação controlada, em sua maioria, são constituídas de polímeros biodegradáveis, com a finalidade de promover liberação gradual de uma determinada substância (SANGUANSRI e AUGUSTIN, 2006). A liberação controlada vem sendo estudada para melhorar o desempenho de ativos em determinados meios, e para conseguir garantir que o ativo seja disperso de forma eficaz e gradual (ASSIS et. al., 2012).

Devido à elevada instabilidade dos óleos essenciais frente à fotodegradação e volatilidade, uma das alternativas para preservar suas propriedades até o momento de sua exposição ao meio se dá através de técnicas de encapsulação de substâncias ativas (RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2015). Esta técnica representa uma importante ferramenta para a proteção do ativo no interior das nanopartículas, e sua subsequente liberação segundo condições específicas. Ela vem sendo amplamente utilizada para a proteção de óleos essenciais, porém pode ser utilizada para proteger qualquer tipo de substância ativa, em diferentes estados físicos (EL ASBAHANI, et al. 2015).

O desenvolvimento dessas partículas encapsulantes envolve uma série de parâmetros relacionados com as finalidades específicas de ação das substâncias encapsuladas e também dos mecanismos de liberação controlada, os quais muitas vezes podem estar relacionados com o tipo de carreador utilizado (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; RISCH; REINECCIUS, 1995). O nanoencapsulamento entra nesta pesquisa como uma importante ferramenta tecnológica para promover o aumento da estabilidade do óleo essencial da espécie *Piper nigrum*.

A motivação para este projeto surgiu da necessidade de desenvolver um bioinseticida alternativo visando o controle da espécie *Anopheles aquasalis* (um dos vetores da malária) por meio do encapsulamento do óleo essencial das sementes da espécie *Piper nigrum* (pimenta do reino) em nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona (PCL) e gelatina, com a finalidade de promover a liberação controlada do ativo. A malária é

uma doença causada pelo vetor *Anopheles aquasalis* de caracter infeccioso e de fase febril aguda (BAIA-DA-SILVA, et al. 2019), que causa febre alta, calafrios, sudorese excessiva e perda de apetite (SULEMAN , et al. 2019). Somente no ano de 2017 foi responsável por comprometer a saúde de aproximadamente 219 milhões pessoas, em 91 países. Essa doença ainda é considerada um problema, uma vez que se torna complexa a eliminação em massa dos vetores de *Anopheles* e dos parasitas do gênero *Plasmodium* quando o organismo é acometido pelo mesmo. No Brasil, entre 2012 e 2017 foram diagnosticados uma média de 200 mil casos anuais, o que abrange quase 50 % de todos os casos anuais da América Latina (BRAZ, et al. 2020). Atualmente são utilizados para o controle do vetor *Anopheles* inseticidas sintéticos de cinco classes distintas, os organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides e neonicotonoides. O desafio do uso de tais inseticidas, além de abranger questões ambientais, compreende a resistência adquirida pelos vetores, tornando-se um problema para o controle futuro de tais insetos (SOUZA, 2019).

A primeira etapa desta pesquisa foi baseada no desenvolvimento de formulações adequadas e com Eficiência de Encapsulamento (EE) elevada. A análise da estabilidade das formulações desenvolvidas foi realizada através da incorporação de seis diferentes conservantes, a 35 °C, a fim de definir a formulação de maior estabilidade em função do tempo. As formulações foram inicialmente submetidas a testes de manipulação constante para selecionar aquelas que apresentaram maior estabilidade em função do tempo. Em um segundo momento, as formulações mais estáveis foram submetidas a novas caracterizações físicas, químicas e morfológicas, visando à avaliação de sua estabilidade em condições de estocagem, ou prateleira. Dentre os parâmetros avaliados em função do tempo e temperatura, destacamos a EE, pH, turbidez, propriedades organolépticas e condutividade elétrica, contribuindo de forma concreta para o entendimento de suas propriedades físico-químicas e para a proposição de aplicações em nanotecnologia. Após a seleção da formulação mais estável, foram realizados testes *in vitro* de liberação controlada afim de entender o mecanismo de liberação do óleo essencial. Por fim, a formulação foi testada em larvas de *Anopheles aquasalis* para avaliar seu potencial larvicida.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar a estabilidade de formulações baseadas no encapsulamento do óleo essencial da espécie *Piper nigrum*, mantidas a 35 °C, e submetidas à incorporação de diferentes conservantes, aplicadas ao controle de larvas de *Anopheles aquasalis*.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar físico-quimicamente o óleo essencial de *Piper nigrum*;
- Desenvolver sistemas de nanopartículas poliméricas biodegradáveis baseados em poli- ϵ -caprolactona (PCL) e a Gelatina;
- Estimar o tamanho das nanopartículas pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS);
- Analisar topograficamente as nanopartículas através da Microscopia de Força Atômica (AFM);
- Avaliar a estabilidade das formulações em condições de manipulação constante e em prateleira através dos parâmetros Eficiência de Encapsulamento, pH, turbidez e condutividade elétrica;
- Avaliar a cinética de liberação do óleo essencial em diferentes pH;
- Realizar bioensaios larvicidas *in vitro* e *in loco* com larvas de *A. aquasalis*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Nanopartículas orgânicas

As nanopartículas ou nanocápsulas orgânicas geralmente são constituídas de material polimérico ou lipídico, e são sintetizadas a partir de emulsões coloidais no intervalo de 100 a 300 nm. É observado por meio de técnicas de microscopia que as nanopartículas apresentam um invólucro membranoso cuja rugosidade influencia no tamanho real da partícula (FRANCO, 2013; BEJARANO *et al.* 2018).

Materiais de núcleo são as substâncias envolvidas pela nanocápsula, e podem ser diversificados entre os mais variados princípios ativos, desde substâncias medicamentosas a produtos cosméticos (FRANCO, 2013). A **Figura 1** mostra alguns tipos de nanopartículas orgânicas.

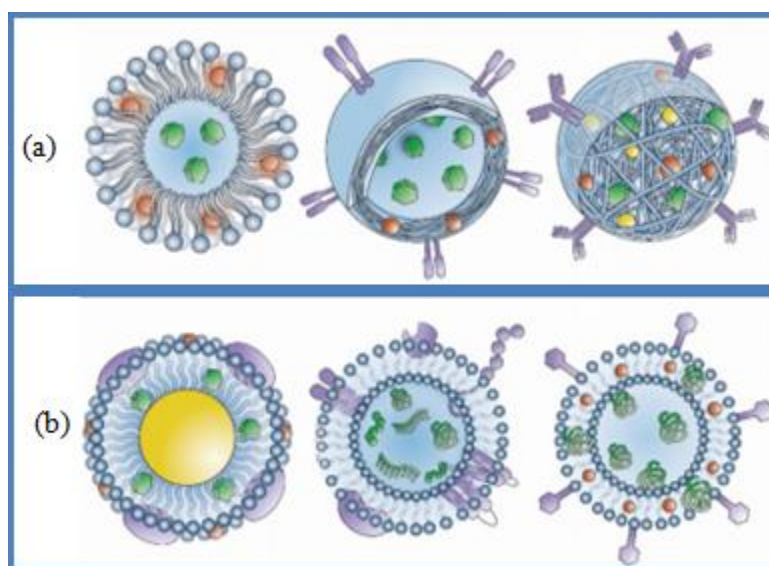


Figura 1 - Tipos de nanopartículas orgânicas: (a) Nanopartícula polimérica orgânica em formato micelar e (b) Nanopartícula lipídica. Fonte: BEJARANO *et al.* (2018). Adaptado.

3.1.1. Nanopartículas a base de gelatina

A nanopartícula de gelatina apresenta um diâmetro real e um diâmetro hidrodinâmico, ou seja, a área circular representa o perímetro real da partícula e, portanto, possui um diâmetro real. Porém, o diâmetro hidrodinâmico é a composição do diâmetro real mais a distância entre os grupos representados em azul e branco, como mostra a **Figura 2**.

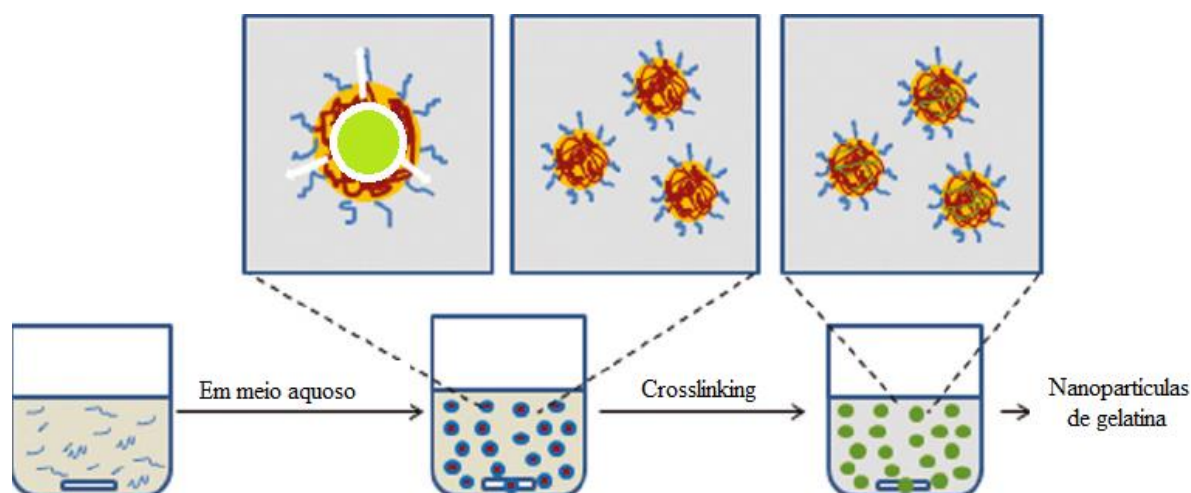


Figura 2 - Formação de nanopartículas de gelatina. Fonte: KHAN e SCHNEIDER (2013). Adaptado.

Quimicamente, a gelatina é composta por repetições de alaninas, glicina e prolina formando uma estrutura de tripla hélice contendo grupos amina, hidrocarbonetos e ácidos carboxílicos, como está exemplificado na **Figura 3**. A tripla-hélice é formada por grupos que variam de 300 a 4000 aminoácidos (KUMAR, 2005).

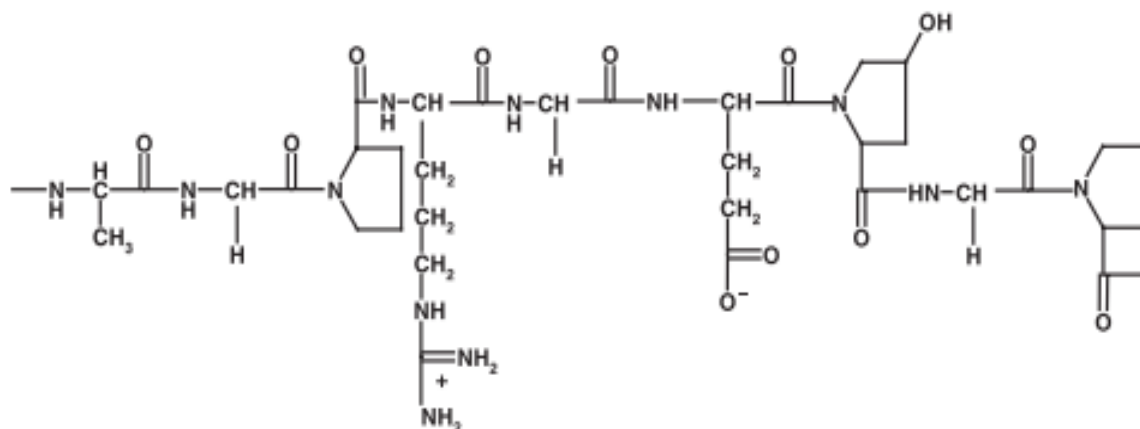


Figura 3 -Fórmula química estrutural da gelatina. Fonte: YASMIN et. al. (2017).

A gelatina vem sendo utilizada como carreador de diversas substâncias ativas, resultando no desenvolvimento de nanopartículas (NP) com aplicações em diversas áreas devido à sua biocompatibilidade e degradabilidade, como descrevem *Kaintura et al. (2015)*. Os autores desenvolveram um estudo baseado em encapsular proteínas do tipo albumina de soro bovino (BSA/HSA). Além de carreadoras de proteínas, as nanopartículas de gelatina abrangem aplicações na área médica como carreadoras no transporte de genes a tecidos, visando combater doenças como câncer e tuberculose

(YASMIN *et al.* 2017). A aplicação de NP de gelatina também se estende à indústria de cosméticos, onde são usadas como nanocápsulas para armazenar polifenóis e flavonóides para aplicação em filtros solares de ação prolongada (GRAZIOLA *et al.* 2016).

As nanopartículas de gelatina também podem ser modificadas por meio de produção iônica. Há vários métodos de produção que abrangem os tipos de gelatina A e B. Madkhali *et al.* (2018) ressaltam que não há ligações específicas para determinar a flexibilidade em relação à hidrólise do colágeno, fazendo com que a gelatina tenha várias posições no espaço das suas cadeias que são passíveis de rompimento. Essas rupturas dependem de fatores como pH e temperatura, tornando a hidrólise randômica, justificando a heterogeneidade molecular da gelatina. Kaintura *et al.* (2015) observaram que a EE de albumina por nanocápsulas de gelatina atingiu 90%, indicando eficiente proteção do ativo na nanopartícula.

3.1.2. Nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona (PCL)

Outro biopolímero comumente usado como carreador no desenvolvimento de nanopartículas é a poli- ϵ -caprolactona, também conhecida por PCL. Trata-se de um polímero biodegradável constituído por moléculas de poliésteres alifáticos de composição $C_6H_{10}O_2$, cuja densidade equivale a aproximadamente 114,14 g/mol. Foi sintetizado pela primeira vez em meados de 1930, através da polimerização do ϵ -caprolactona, apresentando temperatura de transição vítrea de $-60\text{ }^\circ\text{C}$ (PUBCHEM DATABASE, 2018). O PCL é um polímero semicristalino, biodegradável e de fácil processamento. Estudos de Cepeda *et al.* (2016) demonstraram que a versatilidade do PCL pode ser empregada à produção de membranas biopoliméricas que são capazes de liberar gradativamente o princípio ativo de forma que o PCL também pode ser sintetizado em fibras sobrepostas e semipermeáveis.

O uso de PCL na indústria de fármacos e cosméticos como carreador de substâncias teve destaque no início do século XXI. Snehalatha, Venugopal e Saha (2008) trouxeram o polímero como agente encapsulante de fármacos como a dexametasona, muito utilizada pela sua aplicação imunossupressora, apresentando EE entre 82 e 89% (FRIEDRICH *et al.* 2008). Estudos recentes também mostram o PCL como agente encapsulante do óleo essencial da *Cymbopogon nardus* (citronela), e tal estudo foi

conduzido pela verificação da presença de óleo encapsulado através de estudos por FTIR, MEV, EE e potencial zeta, comprovando o eficiente encapsulamento do óleo essencial (KRINDGESJAHNO; MORISSO, 2018).

3.2. Óleos Essenciais

Os óleos obtidos de fontes vegetais podem ser do tipo fixo ou essencial. Os óleos fixos são constituídos majoritariamente por ésteres, gliceróis e ácidos graxos. No entanto, os óleos essenciais (OE) são misturas voláteis de compostos orgânicos, cujas principais características, como o sabor e os aromas da planta, são preservadas. A maior concentração dos constituintes químicos de uma espécie vegetal está contida no óleo essencial (TISSERAND; YOUNG, 2013). Na antiguidade os OE eram usados para fins terapêuticos e como cosméticos. No entanto, em meados do século XX, foram descobertos OE capazes de atuarem no campo da medicina, dando início a estudos aprofundados sobre o tema (MANION; WIDDER, 2017).

As técnicas mais comuns de extração de OE são por destilação. Essas técnicas variam de acordo com o solvente empregado, mas na maioria dos casos o solvente é a água. Manion e Widder (2017) ainda ressaltam que muitas espécies de plantas são usadas para extração de OE, e cada um deles possui componentes distintos com propriedades e aplicações específicas.

3.3. *Piper nigrum*

A *Piper nigrum* é uma planta da família *Piperaceae*, **Figura 4**, conhecida popularmente como pimenta do reino, pimenta preta e pimenta redonda. É utilizada principalmente na culinária e na medicina alternativa oriental para prevenir doenças. Cultivada na maioria das vezes em países tropicais, é uma das especiarias mais consumidas no mundo, sendo extraído aproximadamente 500.000 toneladas/ano (ABBASI *et al.* 2010; HAO *et al.* 2016).



Figura 4 - Pimenta do reino (*Piper nigrum*): óleo, grão e planta. Fonte: Aromatic.co.uk.

Além de ser usada como especiaria, a *P. nigrum* apresenta propriedades antimicóticas, antioxidantes, antiviral, antibacteriana, inseticida, imunossupressora, entre outras. Essa gama ampla de aplicação da pimenta do reino a torna atrativa comercialmente na indústria de fármacos, cosméticos e alimentícia (AHMAD, *et al.* 2010).

As nanoemulsões do OE da pimenta do reino são aplicadas principalmente ao combate de agentes microbianos, pois além de eficientes no combate e crescimento de bactérias, não oferecem riscos ao meio ambiente pela composição química (SWATHY *et al.* 2018). Os autores ressaltam que a formulação estável para utilização do óleo de pimenta do reino se dá por meio de Tween 80 na proporção 1 para 2, obtendo tamanho médio de partículas de 30 (\pm 2) nm. Além da aplicação em nanoemulsões, o OE da pimenta do reino desempenha função antioxidante em comparação a outras substâncias como hidroxianisolbutilado (BHA) e hidroxitoluenobutilado (BHT) que são agentes antioxidantes sintéticos utilizados principalmente na indústria alimentícia (KAPOOR *et al.* 2010). Outra aplicação relevante é a utilização de extratos da *P. nigrum* para carregamento de partículas de prata com ação antibacteriana para uso agrícola (PAULKUMAR *et al.* 2014).

3.4. Liberação controlada de substâncias

A ação de uma substância a longo prazo no organismo após administração é conhecida por liberação prolongada, ou liberação controlada. A liberação controlada pode ser verificada por meio da concentração da substância no organismo em função do tempo no qual é liberada. Substâncias liberadas totalmente na corrente sanguínea são classificadas como de liberação imediata. No entanto, a liberação prolongada permite que substâncias sejam liberadas entre um intervalo de tempo maior no qual há liberação crescente até atingir liberação máxima e depois decaimento progressivo da concentração na corrente sanguínea dentro desse intervalo de tempo maior, conforme ilustra a **Figura 5** (HIRAYAMA e UEKAMA, 1999).

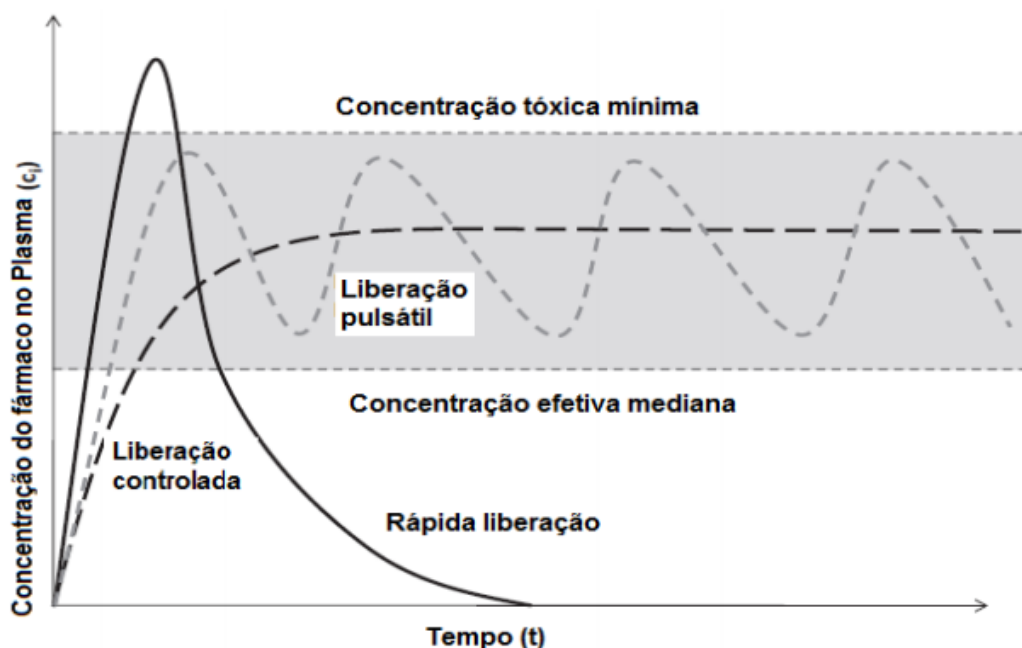


Figura 5 - Níveis de substância liberada no organismo em relação ao tempo de liberação. Fonte: LIECHTY *et al.* (2010).

A liberação modificada compreende um ajuste realizado para atender uma necessidade de liberação prolongada possibilitando melhor absorção da substância no organismo. O que a difere da liberação prolongada da modificada é a velocidade de liberação, o local de atuação e a duração da substância no organismo. Por fim, a liberação retardada, como o nome sugere, tem uma liberação mais lenta que os demais citados, geralmente no início da administração da substância (HIRAYAMA e UEKAMA, 1999).

Ummadi *et al.* (2013) consideraram que existem vantagens na liberação controlada de drogas por ingestão via oral, tais como redução da flutuação dos níveis da

substância no plasma sanguíneo e controle mais adequado das concentrações da substância no organismo, redução dos efeitos adversos, redução da frequência de dosagens e, por fim, redução do procedimento, uma vez que não há tantos desperdícios pelos resíduos de substâncias não absorvidas pelo organismo.

3.4.1. Mecanismos de liberação controlada

Os mecanismos de liberação controlada variam de acordo com os meios nos quais atuarão e, de acordo com [Bizerra e Silva \(2016\)](#), os depósitos dos princípios ativos a serem liberados podem ser constituídos geralmente por nanocápsulas e nanoesferas, como mostra a **Figura 6**. Complementando as afirmações desses autores, [Aouada et al. 2009](#) e [Sarkar e Singh \(2017\)](#) reportam a possibilidade de utilização de filmes fibrosos para selecionar a quantidade de princípio ativo a ser liberado, o que resulta em alguns modelos matemáticos a serem verificados para determinar se o sistema se comporta de forma estável.

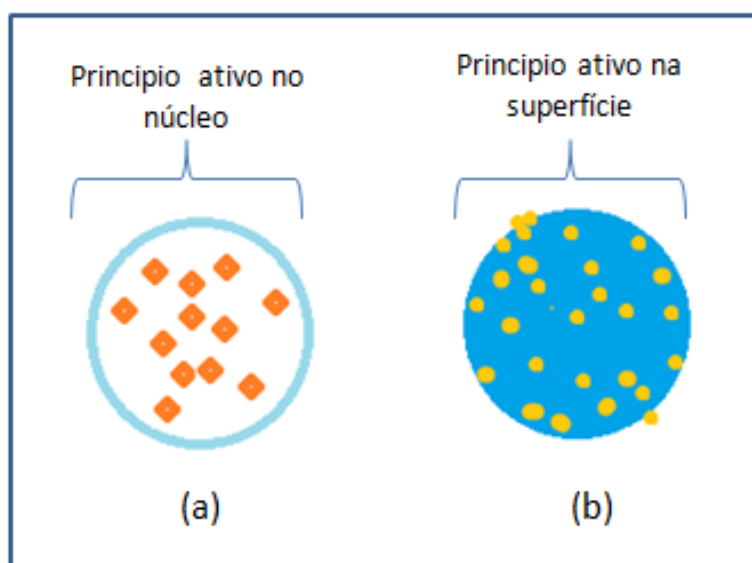


Figura 6 – Representação do princípio ativo inserido no núcleo da nanopartícula (a) e princípio ativo disposto na superfície da nanoesfera. Fonte: A autora.

Os clássicos mecanismos de liberação de ativos, de acordo com [Bizerra e Silva \(2016\)](#), [Gorrasiet al. \(2017\)](#) e [Kamalyet al. \(2016\)](#), são divididos em liberação por difusão por poros preenchidos por água, difusão por meio da matriz polimérica, bombardeamento osmótico e erosão (**Figura 7**).

Difusão por poros → Esse modelo descreve o movimento randômico dos

princípios ativos no núcleo da partícula através de um gradiente de concentração (GORRASI *et al.* 2017), onde em polímeros biodegradáveis a taxa de liberação ocorre pela difusão do ativo por poros ocasionados pela degradação parcial do carreador, e então as moléculas de água são absorvidas por esses poros estimulando o ativo a fluir do meio mais concentrado para o meio menos concentrado (KAMALY *et al.* 2016; SANTA e LÓPES, 2013), como ilustra a **Figura 7**.

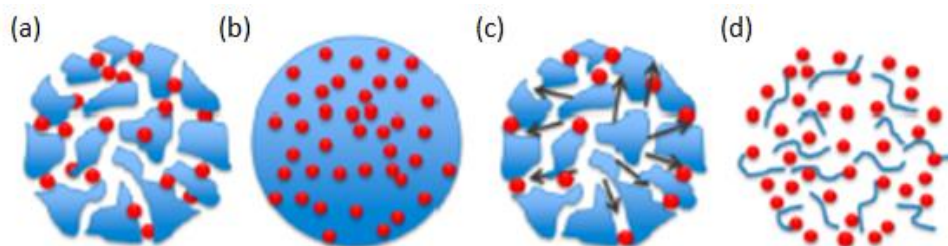


Figura 7 – Mecanismos de liberação de ativos de partículas poliméricas: (a) difusão através de poros preenchidos por água, (b) difusão através da matriz polimérica, (c) bombeamento osmótico e (d) erosão. Fonte: Kamaly *et al.* (2016).

Difusão através da matriz polimérica → A difusão e liberação do ativo que ocorre pela membrana polimérica depende mais do polímero empregado como carreador do que dos fenômenos de gradientes de concentração como vistos no mecanismo anterior (KAMALY *et al.* 2016; FU e KAO, 2010). Portanto, o tipo de carreador interfere na difusão do princípio ativo, bem como a taxa de degradação varia conforme o carreador empregado e interferirá no mecanismo de difusão. Os polímeros mais usados para esse tipo de mecanismo de liberação são: poli- ϵ -caprolactona (PCL), PLA (ácido polilático) e o PLGA (ácido polilático glicólico), quitosana e albumina (BEZERRA; SILVA, 2016).

Bombeamento osmótico → A osmose ocorre de modo similar à difusão. No entanto, o transporte do ativo se dá por convecção. A diferença de pressão osmótica causada pelo meio e pelo ativo presente na nanopartícula ocasiona o bombeamento osmótico (KAMALY *et al.* 2016; BEZERRA e SILVA, 2016).

Erosão → A erosão se dá pelo intumescimento do polímero, onde há dispersão das cadeias poliméricas e passagem da substância ativa contida no núcleo das partículas (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

3.5. *Anopheles aquasalis*, a malária e o controle do vetor

Os mosquitos *Anopheles* (Diptera: Culicidae) são de grande relevância na epidemiologia e no estudo da transmissão da malária. *Anopheles aquasalis*, **Figura 9**, é uma espécie do subgênero *Nyssorhynchus* que se reproduz em água salobra, possui distribuição costeira na América Central e do Sul e é considerado um vetor de malária em algumas regiões da Venezuela e do Brasil (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Os mosquitos do gênero *Anopheles* em média podem variar de 0,5 a 1,5 cm quando chegam a fase adulta, e seu desenvolvimento compreende dois ciclos de vida, um aquático e outro aéreo. O aquático se inicia no ciclo larval que compreende 4 estádios (L1, L2, L3 e L4), **Figura 8**. Em geral as larvas dos anofelinos apresentam a região da cabeça mais desenvolvida que o restante do corpo e se alimentam de matéria orgânica sedimentosa e micro-organismos. As larvas de *Anopheles* não apresentam sifão respiratório, dessa forma tendo que atingir a superfície da água para adquirir oxigênio. Outro fator característico desse ciclo de vida é o desenvolvimento das larvas através do clima, sendo que climas mais quentes propiciam desenvolvimento acelerado (WILLIAMS, 2013).

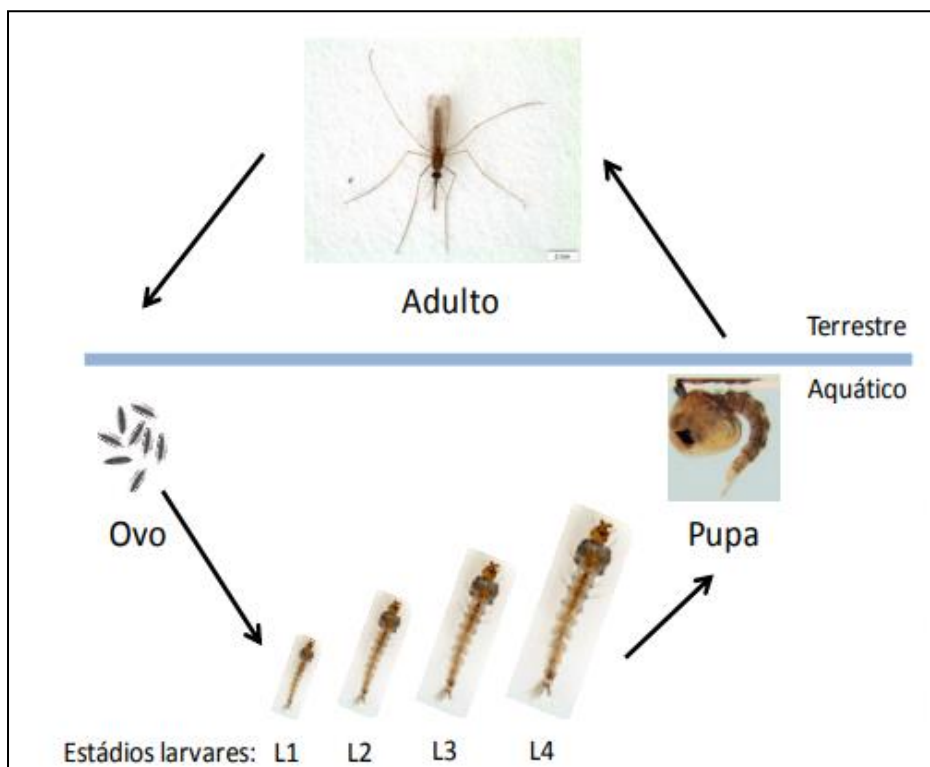


Figura 8 – Fase do ciclo de vida dos Anophelinos. Fonte: Williams (2013).

De acordo com [WHO \(2018\)](#), a malária é um problema de saúde pública que afeta grande parte dos continentes localizados em zonas tropicais e são registrados mais de 200 milhões de casos anualmente no mundo. Dessa forma, a malária se tornou um problema a ser erradicado, uma vez que existem medidas mitigatórias e não definitivas para o controle do vetor transmissor ([BAIA-DA-SILVA et al. 2019](#)).

A malária é causada pelo parasita *Plasmodium* através da picada do mosquito *Anopheles*, e no Brasil são conhecidos três tipos comuns: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* ([SOUZA et al. 2016](#)). De acordo com o Ministério da Saúde (2010), além de utilizar artifícios como drogas para combater a infecção, é necessário realizar um estudo de vigilância epidemiológica da malária, que inclui estudar as áreas de infestações pelos mosquitos e meios para eliminar o vetor.



Figura 9– Mosquito da espécie *Anopheles aquasalis*. Fonte: Fiocruz (2012).

A preferência do mosquito *A. aquasalis* por regiões de climas quentes torna o conhecimento sobre o ciclo de vida e desenvolvimento dessa espécie necessário para a prevenção em regiões distantes das zonas costeiras. A espécie vem sendo estudada nas principais cidades do norte do Brasil, como Belém - PA, através do Instituto Evandro Chagas ([DA SILVA et al. 2006](#)), e Manaus - AM, pela Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-AM) ([SAMPAIO et al. 2016](#)).

Pela necessidade de reduzir a população de anofelinos, foram desenvolvidos estudos com substâncias que em determinadas concentrações conseguem promover o controle de algumas espécies. Algumas das substâncias utilizadas para o combate do vetor incluem: diclorodifeniltricloroetano-DDT ([SIMMA, et al. 2019](#)), o

benzenohexacloro (BHC) e os hexaclorociclohexanos (HCH) (MODEL *et al.* 2016). No entanto, essas substâncias convencionalmente comercializadas geram consequências à saúde humana (CARMO *et al.* 2017), além de potencializarem a resistência dos insetos que, segundo Consoli e Oliveira (1994), se tornou evidente em meados do século XX. A resistência aos inseticidas pode ocorrer de duas formas: por refratariedade, quando a população seguinte herda características genéticas imunes à substância, e por resistência adquirida, quando há seleção natural dos mais resistentes ou comportamental, adaptando-se para evitar o contato com o inseticida. Dessa forma, foram incorporados como alternativas diversos inseticidas como os hormônios, inibidores de quitina e produtos de origem vegetal (como o utilizado neste trabalho) (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Pesquisas visam à utilização de óleos de origem vegetal com atividade larvicida para combater vetores do gênero *Anopheles* e *Aedes*, e vêm sendo desenvolvidas com a finalidade de possível substituição dos inseticidas convencionais por inseticidas alternativos de origem vegetal além de interromper o desenvolvimento das larvas evitando que cheguem a fase adulta. Autores como Talukdar, Mandal e Ganguly (2017) e Xu *et al.* (2020) testaram a eficácia do extrato de *Eucalyptus grandis* e *Cinnamomum camphora* no combate ao *Anopheles stephensi*. De Oliveira *et al.* (2019) utilizaram *Allium sativum* para aplicação em larvas de terceiro estágio de *Aedes aegypti*, e Silva *et al.* (2018) utilizou o óleo essencial de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* carregados por nanopartículas de PCL/Gelatina para combater o *Aedes aegypti* com mortalidade de 100 % após 48 h. Outras pesquisas sobre o combate de mosquitos *A. aegypti* com o uso de óleos essenciais foram desenvolvidas por Azevedo *et al.* (2018) e Mar *et al.* (2018).

4. METODOLOGIA

A metodologia descrita neste trabalho está seccionada em duas etapas principais: 1- Extração e caracterização do óleo essencial e 2 - Sistema nanoparticulado. As demais sub-etapas estão descritas no fluxograma da **Figura 10**.

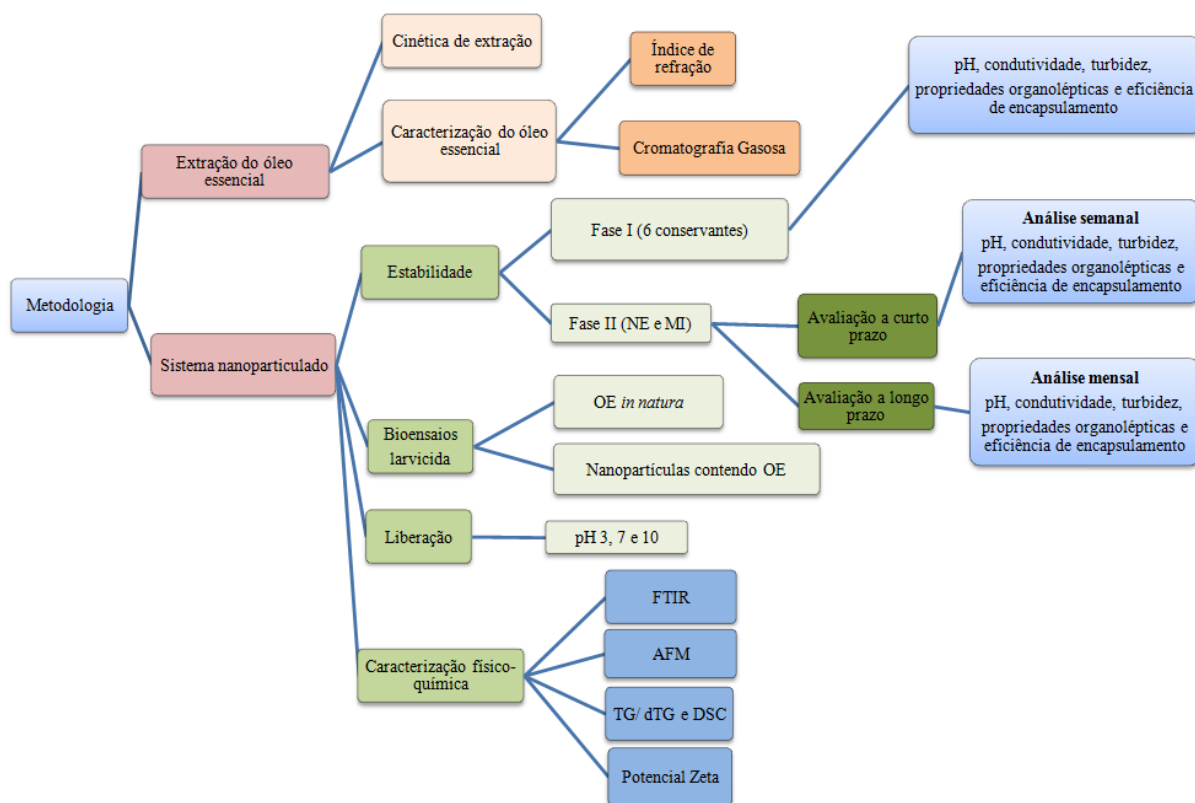


Figura 10 – Etapas da metodologia adotada neste estudo. Fonte: A autora.

4.1. Extração e Caracterização do óleo essencial da *Piper nigrum*

As sementes da *P. nigrum* foram adquiridas no comércio local, mercado municipal de Manaus. A extração do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Polímeros Nanoestruturados (NANOPOL) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) por hidrodestilação, através do uso do extrator do tipo Clevenger, **Figura 11**. As sementes foram previamente trituradas e colocadas dentro de um balão de destilação (2L) de fundo redondo. O sistema de arrefecimento foi conectado por duas mangueiras para promover a entrada e saída de água do condensador.

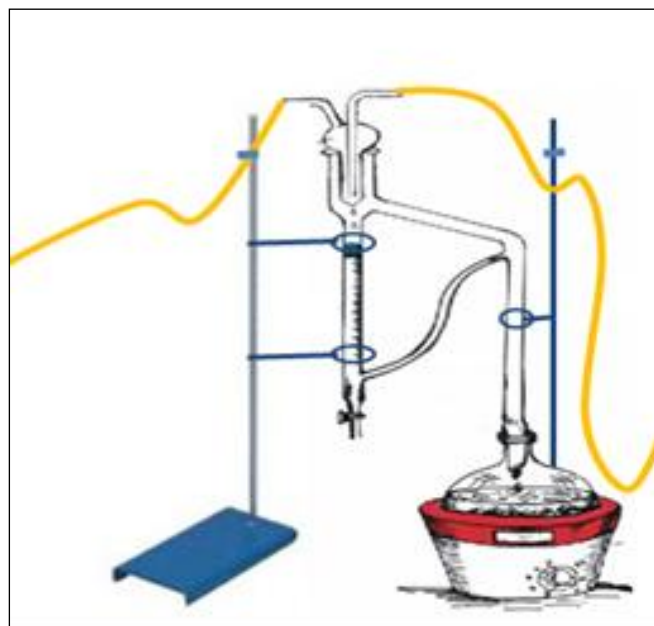


Figura 11 - Sistema para extração por hidrodestilação. Fonte: A autora.

A extração do óleo essencial foi realizada por 3 h a fim de verificar a cada 0,5 h o volume de óleo essencial extraído.

O rendimento do óleo essencial extraído foi calculado de acordo com a metodologia de [Figueiredo et al. \(2004\)](#). Obtém-se o percentual de rendimento de acordo através da equação 1.

$$Ro (\%) = \frac{Vo}{Em - \left(\frac{EmxU}{100}\right)} \times 100 \quad \text{Eq.(1)}$$

onde “Vo” é o volume do óleo extraído, “Em” é a massa de extrato vegetal, U é a umidade e “Ro” é rendimento de óleo extraído.

Para a identificação dos constituintes monoterpenos e sesquiterpenos do óleo essencial, o mesmo foi submetido à técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) no LABCG (Laboratório de Cromatografia Gasosa), na Central Analítica da UFAM em um equipamento modelo TRACE GC ULTRA, ThermoScientific. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C e manteve-se em condição isotérmica por 2 min, seguido por rampa de 3 °C/min até 250 °C, e rampa de 10 °C/min até 290 °C em condição isotérmica por 5 min. Foram estabelecidos os índices de retenção dos compostos usando alcanos C₇-C₃₀. Os cálculos dos Índices de Retenção do

óleo essencial foram estabelecidos pela equação de [Van der Dool e Kratz \(1963\)](#) e tais índices confirmados usando dados de [Adams \(2007\)](#).

A integridade das propriedades físicas do óleo essencial foi verificada por meio do índice de refração, utilizando um refratômetro Brix, modelo GT427, com especificações: medição de 0 a 32%, com resolução de 0.2%, exatidão de $\pm 0.2\%$ e dimensões de 30 x 40 x 170 mm.

4.2. Sistemas Nanoparticulados

4.2.1. Desenvolvimento das Formulações

A síntese das partículas encapsulantes foi realizada através do desenvolvimento de duas fases, orgânica e aquosa. Na fase orgânica foram acrescentados os tensoativos, emulsificantes e o óleo essencial, e na fase aquosa, gelatina, Tween 80 e água destilada, conforme ilustra a **Figura 12**.

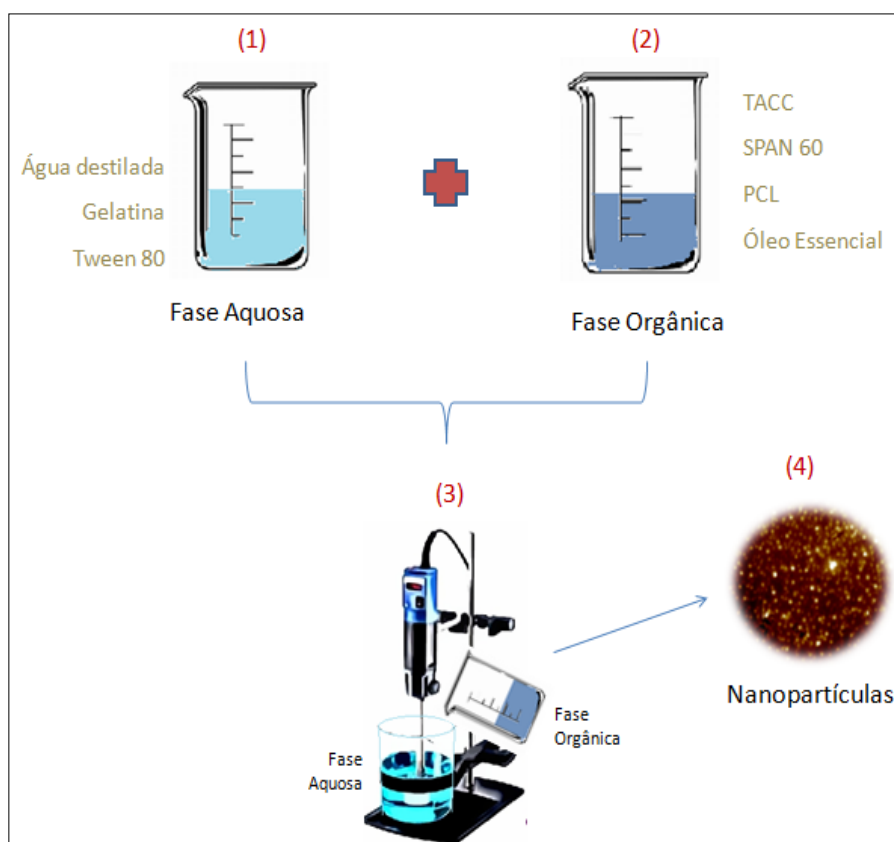


Figura 12 - Síntese de partículas com PCL e Gelatina. Fonte: A autora.

De acordo com o método de síntese descrito por [Silva et al. \(2018\)](#), foi utilizada a gelatina tipo B (para a formação da bicamada com o PCL, **Figura 13**, a qual foi aquecida a 50 °C em água destilada sob agitação. O Tween 80 (0,3 g) foi solubilizado juntamente com a gelatina e água destilada quando a temperatura atingiu 40 °C. Para a fase orgânica, foi solubilizado em diclorometano (5 mL) aproximadamente 0,05 g de PCL, Span 60 (0,02 g) e TAAC (0,1 g) e, por fim, foi acrescido o óleo essencial da *P. nigrum* (EOPN). Após a solubilização da fase orgânica e alcançada a temperatura ideal da fase aquosa, adicionou-se a fase orgânica na fase aquosa sob agitação por um turrax a 10.000 rpm para a formação das partículas. Para melhor adesão entre o PCL e gelatina adicionou-se transglutaminase (0,19 g) à solução final, sob agitação magnética. A solução final foi mantida sob agitação constante (25 °C) até a evaporação total do solvente. O pH final foi ajustado e as amostras rotuladas de acordo com o conservante empregado. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em incubadoras e mantidas a uma temperatura constante de 35 °C.

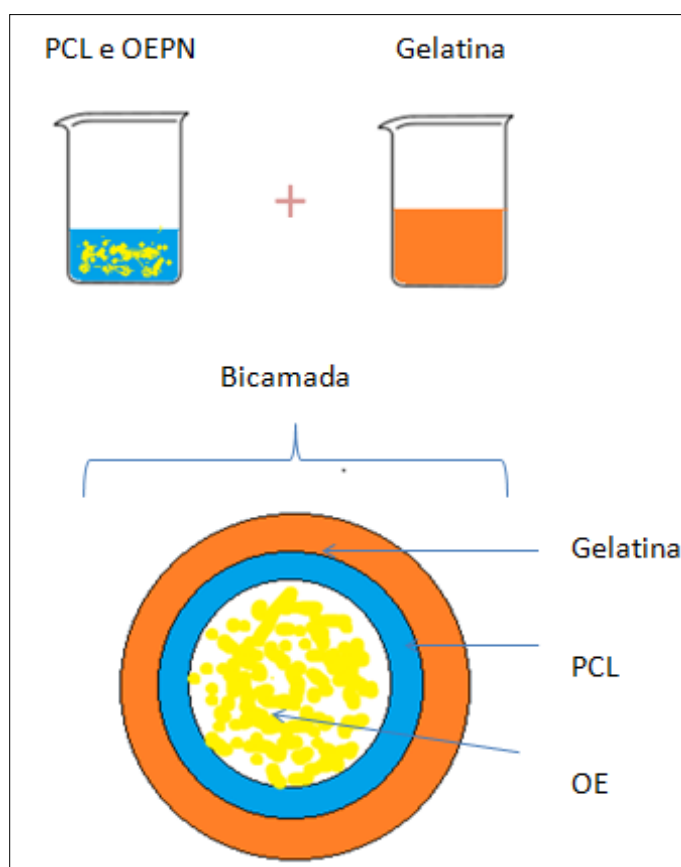


Figura 13 – Nanopartículas contendo OEPN constituída por bicamada de PCL e gelatina. Fonte: A autora.

4.2.2. Estabilidade das formulações em diferentes conservantes

Para um estudo prévio, inicialmente foram sintetizados oito formulações contendo nanopartículas a base de PCL/gelatina. Dentre elas, seis continham óleo essencial da *P. nigrum*, e uma formulação era constituída por nanopartículas sem conservante. Em seis sistemas foi adicionado um conservante específico visando preservar as propriedades organolépticas (cor e odor), físicas e químicas, além da integridade das nanopartículas à ação de microorganismos. Os conservantes escolhidos foram ácido cítrico, NE (Phenoxyethanol/2-Methyl-2H-Isothiazolin-3-One.), MI (Metilisotiazolinona), Benzoato de Sódio (BzNa), Timol e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético).

De acordo com a [ANVISA \(2004\)](#) o estudo de estabilidade é realizado para avaliar a capacidade do material em manter suas propriedades organolépticas, físico-químicas e microbiológicas preservadas a longo prazo sob a adição de diferentes conservantes. Com a necessidade de verificar a estabilidade dos sistemas sob climas quentes, as formulações foram mantidas a 35 °C. Os parâmetros analisados foram pH, condutividade elétrica, turbidez, propriedades organolépticas (cor e odor) e eficiência de encapsulamento. Inicialmente (Fase I) foi realizada a análise das seis formulações com seus respectivos conservantes por 30 dias, sob manipulação constante. Subsequente foram verificadas as formulações com melhor desempenho (Fase II), descartando as demais, para continuar as análises de estabilidade em estocagem ou prateleira, por 12 meses. Na fase II, os conservantes selecionados foram avaliados sob curta e longa duração. O método de seleção das formulações estáveis contendo conservantes sob um intervalo de 30 dias obedeceu à seguinte ordem de exclusão:

Eficiência de encapsulamento – Indica a eficiência do carreador contendo óleo essencial e capacidade das nanopartículas manterem o óleo essencial encapsulado;

Propriedades organolépticas – Para atender a aplicação do material a longo prazo se fez necessária a análise da alteração de cor e odor, uma vez que tais propriedades podem indicar a presença de microorganismos, restringindo a vida útil da formulação. Para determinação da integridade dos sistemas com os conservantes ideais, foi realizado teste de estocagem ou prateleira, de acordo com a [ANVISA \(2004\)](#), com duração de 12 meses de avaliação, para comprovar a eficácia do produto quanto à estabilidade sob condições inalteradas e estimar o prazo de validade.

4.2.2.1. Avaliação do pH

O pH das formulações foi aferido por meio do pHâmetro digital da marca BEL Engineering modelo Phs3bw. Esta análise foi realizada para advertir a presença de caráter ácido ou básico no meio, indicando a alteração no pH e, portanto, desestabilização da formulação por rompimento das partículas ou aglomeração, ou por exposição do óleo essencial no meio (AZARMI *et al.* 2006; SILVA, 2015; PIRES, 2019; SILVA *et al.* 2019).

4.2.2.2. Avaliação da Condutividade Elétrica

A condutividade elétrica é um indicativo da alteração de cargas do meio e, portanto, associada à desestabilização da formulação com exposição de óleo essencial (PIRES, 2019; SILVA *et al.* 2019). A análise foi feita através de um condutivímetro da marca BEL Engineering, modelo W12D, com comutação automática da faixa de medição entre 0 ~ 20 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 20 ~ 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 0,2 ~ 2 mS/cm , 2 ~ 20 mS/cm , 20 ~ 200 mS/cm e $\pm 1\%$ de precisão em todas as escalas.

4.2.2.3. Análise da Turbidez

A turbidez das formulações foi verificada através de um turbidímetro da marca Instrutemp, modelo ITTB1000, com variação de leitura de 0,1 NTU a 1000 NTU, e 1 cubeta 25 mL/porta amostra; set de padrões prontos com os valores 0,1 NTU; 0,8 NTU; 8 NTU; 80 NTU e 1000 NTU.

4.2.2.4. Eficiência de Encapsulamento

A Eficiência de Encapsulamento das formulações foi estimada através da espectroscopia UV-VIS (Global Trade Technology, modelo UV-5100), por meio da identificação dos valores de absorbância em relação ao comprimento de onda fixo absorvido pelo óleo essencial a fim de determinar a quantidade de óleo essencial disperso no meio. Também foram realizadas varreduras em triplicata com o óleo essencial *in natura* da *P. nigrum*, para obtenção da curva de calibração do óleo essencial e do valor fixo do comprimento de onda equivalente a $\lambda = 278 \text{ nm}$. A curva de calibração (Figura 14) foi plotada de acordo com os valores das absorbâncias em função das concentrações em metanol 1,9 a 1000 mg. mL^{-1} .

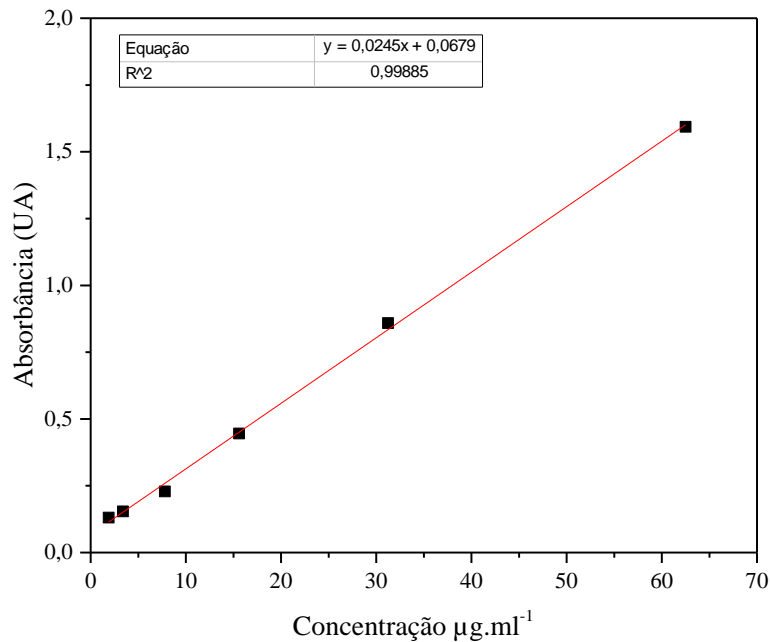


Figura 14 - Curva de calibração do óleo essencial. Fonte: A autora.

Os cálculos da EE foram realizados através da quantidade de óleo encapsulado pela concentração absoluta de óleo no sistema, conforme a Equação 2 (ONG *et al.* 2016; GHASEMISHAHRESTANI *et al.* 2016; SILVA *et al.* 2019).

Eq. (2)

$$EE (\%) = \frac{E}{C_o} \times 100$$

onde EE (%) é a eficiência de encapsulamento em porcentagem, E é a quantidade de óleo essencial encapsulado, e Co a concentração absoluta de óleo essencial.

4.2.3. Liberação Controlada *in vitro*

As formulações contendo os conservantes MI e NE foram inseridas em membranas de diálise celulósicas para avaliar a liberação do ativo em diferentes pH (3, 7 e 10) por 120 h. Alíquotas foram retiradas em intervalos regulares e as análises foram feitas em triplicata através da espectroscopia UV-VIS. Foram obtidos os valores das concentrações de óleo essencial disperso no meio em função dos valores de absorbância (BAJPAI, 2016; SILVA *et al.* 2019; KHAN; SHUKLA).

Após o ensaio de liberação os valores obtidos das análises foram plotados e ajustados para o modelo de Korsmeyer-Peppas de acordo com a Equação 3.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n \quad \text{Eq. (3)}$$

onde: K é a constante de difusão, n é o expoente de liberação que caracteriza o mecanismo de liberação do ativo, M_t é a quantidade do ativo liberada em um tempo t , M_∞ é a quantidade total do agente ativo em um tempo infinito e M_t/M_∞ é a fração do ativo liberado ao longo do tempo t (MANADAS *et al.* 2002; SILVA *et al.* 2019).

4.2.4. Caracterização físico-química das formulações

4.2.4.1. Análise por AFM e distribuição do tamanho de partícula

A caracterização por AFM foi realizada para identificar por topografia a formação das nanopartículas nas formulações. As medidas foram realizadas no Laboratório de Óptica de Materiais (OPTIMA) do Departamento de Física da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), por meio de um microscópio Innova, Bruker numa área de $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$, operada em modo de contato usando ponteira de nitreto de silício. As medidas foram realizadas a $296 \pm 1\text{K}$ e $40 \pm 1\%$ RH com 512×512 pixels a uma taxa de varredura de 1 Hz. A distribuição do tamanho de partícula foi estimada usando o software Originpro versão 2016, e a área das partículas verificadas pelo software ImageJ (SCHINDELIN *et al.* 2012).

4.2.4.2. Análise por FTIR

Para a caracterização espectroscópica através da determinação de grupos funcionais orgânicos foram realizadas as análises de FTIR no Laboratório HUB de Tecnologia e Inovação da Universidade Estadual do Amazonas (UEA). As análises foram feitas em um espectrofotômetro de infravermelho da marca Shimadzu, Modelo IR Prestige-21, e a coleta de dados foi feita através do software IR solution 1.6. As pastilhas foram preparadas com 170 mg de brometo de potássio (KBr) utilizando uma prensa hidráulica Perkin-Elmer a uma pressão de 80 KPa por 10 min. Foram realizados 64 scans por transmitância com resolução no intervalo de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$.

4.2.4.3. Análise por TG/dTG e DSC

Para a verificação da degradação das amostras em ampla faixa de temperatura foram feitas análises termogravimétricas no Laboratório de Físico-Química/FT/UFAM do Departamento Engenharia Civil na Universidade Federal do Amazonas – UFAM e as análises foram realizadas em um equipamento SDT Q600 da TA Instruments. Foram utilizadas massas de aproximadamente 10 mg, em cadinho de alumina, com taxa de aquecimento de 10 °C/min até a temperatura final de 600 °C, em fluxo de N₂ de 30 mL/min.

4.2.4.4. Potencial Zeta e Tamanho de partícula

As análises do potencial zeta (mV), tamanho de partículas (nm) e índice de polidispersão (PDI) foram realizadas no Laboratório de Inovação e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica – LIDETEF da UFAM, pela técnica de DLS (Espalhamento Dinâmico de Luz) através de um equipamento Zetasizer Nano ZS90 (MalvernInstruments, Malvern, UK). As amostras foram verificadas sob ângulo de espalhamento de 90° e diluição 1:1000 v/v.

4.2.5. Bioensaio Larvicida

Os bioensaios larvicidas foram conduzidos com a formulação contendo o conservante NE visando verificar a eficácia larvicida das nanopartículas carregadas com óleo essencial e com óleo essencial (OE) *in natura* aplicadas em larvas de 3º estágio (L3) da espécie *A. aquasalis*. Inicialmente foi verificada a mortalidade das larvas submetidas a diferentes concentrações de óleo essencial para a determinação das Doses Letais (DL₅₀ e DL₉₀) e, em seguida, em diferentes concentrações da formulação contendo nanopartículas com óleo essencial. A metodologia adotada nos bioensaios foi adaptada de acordo com o protocolo [Dulmage \(1990\)](#) e [Pires \(2019\)](#). Nos bioensaios, a mortalidade da população utilizada como controle recebeu um limite máximo de 10 % de tolerância, e foram utilizadas cinco concentrações preliminares com óleo essencial e mortalidade não excedente a 90% para cada concentração. Por fim, a formulação contendo o óleo essencial encapsulado foi aplicada em triplicata em larvas L3, de forma que as larvas foram mantidas sob adição de suplementação.

4.2.5.1. Bioensaios com óleo essencial *in natura*

Foram realizados bioensaios para testar a eficiência do óleo essencial na mortalidade das larvas do *A. aquasalis* de acordo com adaptação da metodologia anteriormente descrita. Os bioensaios com as formulações foram realizados em conferência com a liberação controlada do nanossistema mantendo a proporcionalidade de óleo essencial liberado. Os experimentos nas condições laboratoriais e de semi-campo foram realizados no Centro de Entomologia da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). As condições laboratoriais (*in vitro*) e semi-campo (*in loco*) foram, respectivamente, e com fotoperíodo 14 h/dia e 10 h/noite. Os bioensaios foram realizados por 72 h utilizando as concentrações de 125, 250, 375, 454 e 625 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de OE (**Quadro 1**), diluídos em 0,03% de Tween 80®, e as leituras foram realizadas após 24, 48 e 72 h. Foram utilizadas 10 larvas de 3º estágio de *A. aquasalis* em cada recipiente contendo 20 mL de água de criação e as respectivas concentrações de OE de *P. nigrum*, **Figura 15**, sem repetições. No tratamento controle, foi utilizada a mesma metodologia descrita acima, substituindo o óleo essencial pelo diluente Tween80® a 0,03%. Para a análise das DL (DL₅₀ e DL₉₀), foram realizados tratamentos estatísticos por regressão linear binária, modelo PROBIT, a fim de determinar as doses letais. Os modelos foram implementados no software R Statistical.



Figura 15 - Bioensaio larvicida utilizando OE de *P. nigrum* *in natura*. Fonte: A autora.

Quadro 1 - Concentrações utilizadas para aplicação do óleo essencial *in natura* em larvas de *A. aquasalis*.

Fonte: A autora.

Intervalo (h)	Concentração de OE ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) - <i>in vitro</i>	Concentração de OE ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) - <i>in loco</i>
24	125	125
	250	250
	375	375
	454	454
	625	625

4.2.5.2. Bioensaios utilizando a formulação desenvolvida

Os bioensaios utilizando a formulação desenvolvida foram modelados de acordo com o teste de toxicidade anterior. Os experimentos também foram realizados em condições laboratoriais e semi-campo (



Figura 16). Todas as análises foram realizadas em triplicata com 20 larvas em cada

recipiente, sendo 600 larvas no total. As larvas foram dispostas em 20 mL de água salobra e, considerando as concentrações, foram realizados testes com 100, 200, 400 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para o controle negativo, a formulação contendo nanopartículas vazias foi utilizada. Os testes foram realizados em 24, 48 e 72 h.

Tabela 1 - Concentrações utilizadas para controle larvicida da formulação desenvolvida. Fonte: A autora.

Tempo de ensaio (h)	Amostras	Concentração da emulsão com NPs ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) - <i>in vitro</i>	Amostras	Concentração da emulsão com NPs ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) - <i>in loco</i>
72	1A	100	2A	100
	1B	200	2B	200
	1C	400	2C	400
	1D	500	2D	500



Figura 16 - Bioensaios com a formulação desenvolvida (a), *in vitro* (b), *in loco* (c), (d) e (e). Fonte: A autora.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Caracterização do Óleo Essencial

5.1.1. Cinética de extração e rendimento

Em um intervalo de 3 h de hidrodestilação foram obtidos 5 mL de óleo essencial da *P. nigrum*. A cinética de extração mostrou que aproximadamente 0,83 mL de óleo essencial foi extraído a cada 0,5 h. A condensação do óleo essencial iniciou cerca de 0,5 h após o início da hidrodestilação. A **Figura 17** mostra a curva de cinética de extração do OE.

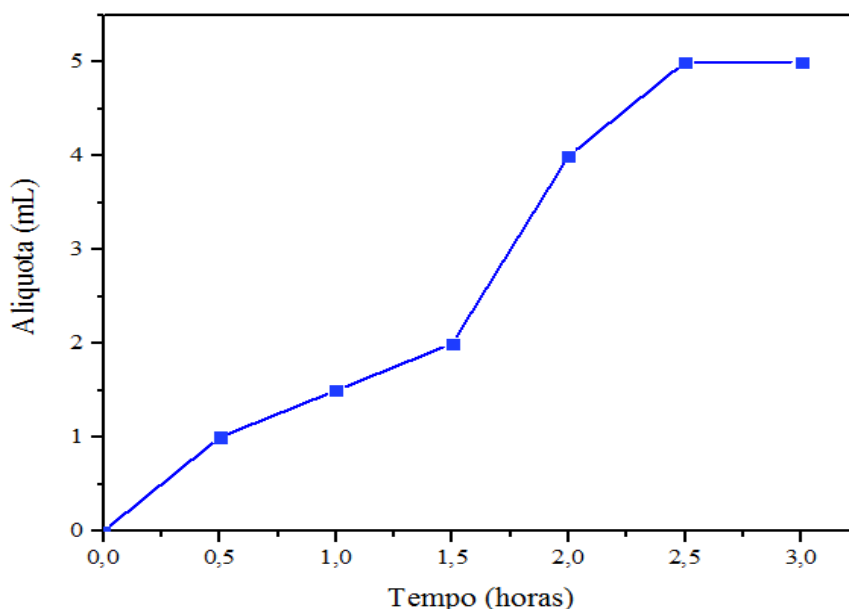


Figura 17– Gráfico da cinética de extração do óleo essencial. Fonte: A autora.

Considerando a massa inicial de sementes de *P. nigrum* de 300 g, foi obtido um rendimento de 3,4 %. O tempo de extração influenciou no rendimento do óleo essencial. O tempo ótimo de extração foi de 2,5 h, e a densidade do óleo essencial foi determinada em torno de 0,78 g/cm³.

O índice de refração (IR) do óleo essencial (**Figura 18**) foi estimado em aproximadamente $1,48 \pm 0,01$ e, de acordo com o banco de dados britânico Aromatic Database (2018), é considerado um valor aceitável, pois o mesmo é reportado, em temperatura ambiente, em um intervalo de 1,474 a 1,492. Portanto, o óleo essencial

extraído da *P. nigrum* possui um valor de IR dentro do intervalo sugerido, tratando-se de uma substância orgânica de densidade moderada, ou seja, a luz permeia o óleo essencial apresentando moderada atividade óptica, indicando que é um material com desordem a nível molecular.

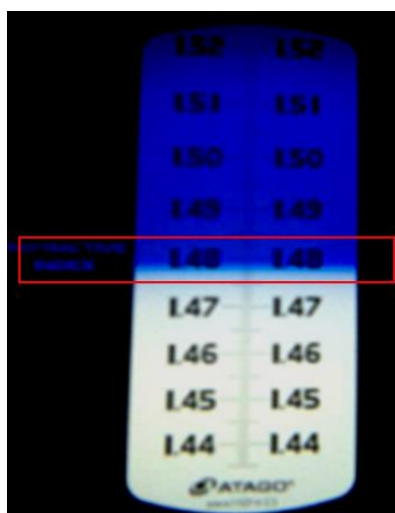


Figura 18 – Índice de refração do óleo essencial da *Piper nigrum*. Fonte: A autora.

5.1.2. Determinação dos constituintes químicos do Óleo Essencial por CG/EM

A análise por CG/EM permitiu a indicação de 29 constituintes na composição química do óleo essencial da *P. nigrum*, como mostra a **Tabela 2**. Dentre eles, os componentes majoritários em ordem crescente são Silvestreno (14,17 %), Sabineno (14,96 %) e β -cariofileno (34,87 %). Foram identificados 95,32 % dos constituintes do óleo essencial, sendo 51,66 % monoterpenos (dos quais 47,35 % compreendem hidrocarbonetos e 4,31 % são oxigenados), 43,66 % de sesquiterpenos (dos quais 43,09 % são hidrocarbonetos e 0,57 % oxigenados), e os constituintes não identificados totalizaram 4,68 %.

De acordo com [Karp e Croteau \(1982\)](#), o sabineno é um monoterpeno bicíclico de fórmula molecular $C_{10}H_{16}$ (**Figura 19-a**), e possui um anel de ciclopentano anexado a um anel de ciclopropano. Tal constituinte possui propriedades antimicóticas segundo [Kohzaki et al. \(2009\)](#) e, para [Wang \(2011\)](#), o sabineno possui excelentes propriedades inseticidas, as quais foram reportadas em seu estudo para o gorgulho do milho, com dose letal (DL) de 23,98 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

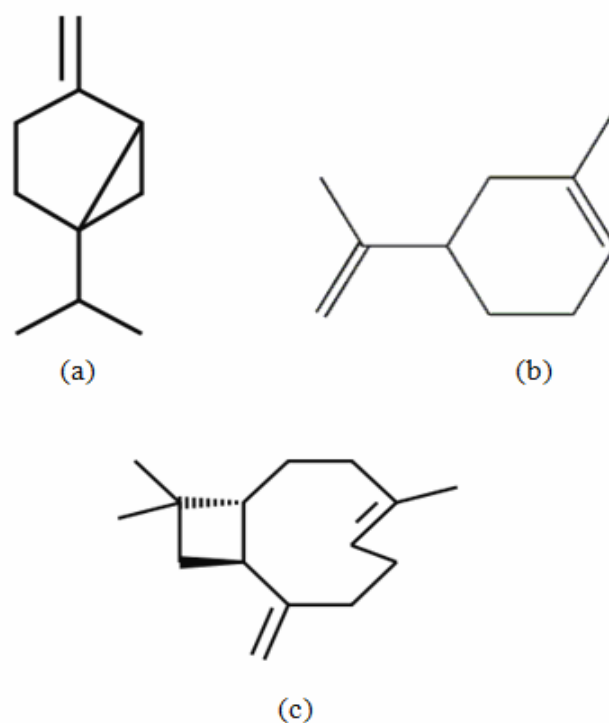


Figura 19 –Estrutura química dos constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de *Piper nigrum* (a) Sabineno, (b) Silvestreno e (c) β -cariofileno. Fonte: CHEMSPIDER (2019), adaptado.

O silvestreno (**Figura 19-b**) é um composto aromático monoterpene de fórmula química $C_{10}H_{16}$ utilizado muitas vezes para aromatizar substâncias (PUBCHEM, 2019). Foi sintetizado pela primeira vez por Walter Norman Haworth, com o intuito de estudar o comportamento dos terpenos (JOLIOT, 1966).

O β -cariofileno é um sesquiterpene bicíclico de fórmula $C_{15}H_{24}$, **Figura 19-c**, que pode ser encontrado em vários óleos essenciais e, de acordo com Montanari *et al.* (2011), está presente em espécies como *Lippiasericea*, *Aloysiatriphylla* Royle e *Lippia Alba*, com comprovada ação fungicida. Aciole *et al.* (2011) afirma que o β -cariofileno é responsável pela ação inseticida contra o *Aedes aegypti* em concentrações letais que variaram de 80 a 200 $\mu\text{g/mL}$, além de apresentar atividade anti-inflamatória, antibiótica, antioxidante, anticarcinogênica e anestésica (MOHAMMED; OMRAN; HUSSEIN, 2016).

Tabela 2 – Constituintes do óleo essencial da *Piper nigrum*. Fonte: A autora.

Nº	Constituintes	Área (%)	IR _{lit}	IR _{cal}
1	α -tujeno	2,92	924	925
2	α -pineno	5,28	932	931
3	sabineno	14,96	969	971
4	β - pineno	3,19	974	972
5	mirreno	0,87	988	991
6	α -felandreno	0,50	1002	1001
7	δ -3-carene	2,09	1008	1007
8	ρ -cimeno	0,51	1024	1022
9	silvestreno	14,17	1025	1026
10	γ -terpineno	2,14	1054	1057
11	terpinoleno	0,56	1086	1087
12	<i>E</i> - sabineno hidratado	0,15	1098	1100
13	dehidro sabina cetona	0,16	1117	1119
14	terpinen-4-ol	3,95	1174	1176
15	α -terpineol	0,21	1186	1190
16	δ -elemeno	1,30	1335	1339
17	α - copaeno	0,20	1374	1377
18	β -elemene	0,63	1389	1393
19	β- cariofileno	34,87	1417	1421
20	γ - elemeno	0,29	1434	1436
21	α -guaiano	0,14	1437	1440
22	α -humulene	1,70	1454	1455
23	germacreno D	0,20	1480	1482
24	β -selineno	1,24	1489	1487
25	α -selineno	0,52	1498	1497
26	germacreno A	0,11	1507	1506
27	δ - cadineno	0,05	1522	1525
28	germacreno B	1,84	1559	1558
29	óxido de cariofileno	0,57	1582	1583
Total identificado		95,32		
Total de monoterpenos		51,66		
Monoterpenos hidrocarbonetos		47,35		
Monoterpenos oxigenados		4,31		
Total de sesquiterpenos		43,66		
Sesquiterpenos hidrocarbonetos		43,09		
Sesquiterpenos oxigenados		0,57		
Outros		4,68		

*IR_{real}: Índice de retenção Calculado, IR_{lit}: Índice de Retenção Literatura, ADAMS 2007.

5.2. Estabilidade das Formulações

5.2.1. Estabilidade das Formulações na Fase I

A estabilidade preliminar foi avaliada através dos parâmetros pH, condutividade elétrica, turbidez, propriedades organolépticas (cor e odor) (**Figura 20**) e eficiência de encapsulamento, a fim de verificar qual formulação é mais estável a 35 °C utilizando diferentes conservantes. De acordo com a [ANVISA \(2004\)](#), a estabilidade de um produto deve ser avaliada para nortear o desenvolvimento do material, bem como aperfeiçoar formulações a fim de garantir confiabilidade e segurança.

As formulações mais estáveis foram determinadas pela preservação de cor e odor durante 30 dias e através da verificação da eficiência de encapsulamento média de 81,7 %. Os valores de eficiência de encapsulamento são considerados ideais acima de 70% ([SNIMA et al. 2014](#); [VENKATESAN](#); [ANIL](#); [KIM, 2017](#); [RAMOS et al. 2019](#)). Desta forma, foi possível verificar que as formulações contendo o conservante timol e a formulação sem conservante apresentou eficiência de encapsulamento abaixo do percentual ideal.

As formulações contendo os conservantes MI e NE mantiveram suas propriedades organolépticas preservadas durante 14 dias, **Figura 20-a** e, por conseguinte 30 dias (**Figura 20-b**). Todavia, as formulações contendo os conservantes ácido cítrico e timol apresentaram alteração de cor e odor na segunda quinzena de avaliação. Os demais sistemas contendo EDTA, BZNa e sem conservante mantiveram cor e odor preservados até 14 dias, e em 30 dias estavam com alteração de coloração (amarelada) e alteração de odor. Parâmetros como o pH e condutividade, **Figura 20-a e b** afetaram a estabilidade do sistema através da alteração dos valores iniciais, indicando a presença de óleo essencial disperso no meio. Os valores de pH dos sistemas com ácido cítrico, BZNa, timol, EDTA, e sem conservante decaíram substancialmente, o que pode ser justificado pela presença de óleo essencial no meio, decorrente da desestabilização das formulações. Uma vez que o óleo essencial possui pH = 5,3, as formulações tenderam à diminuição dos valores de pH.

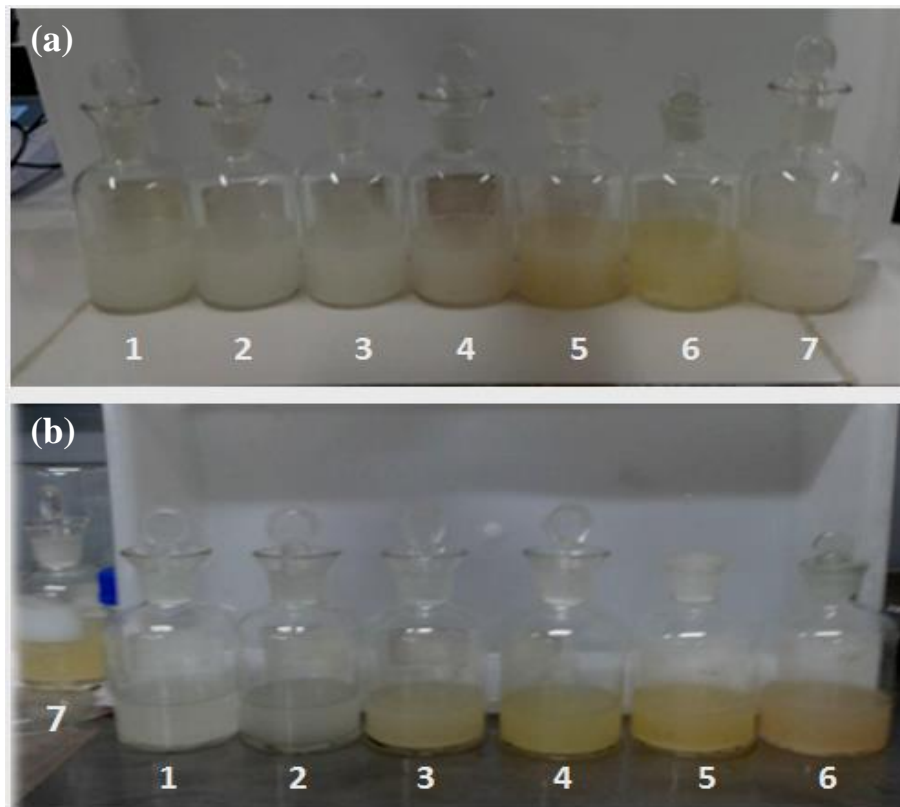


Figura 20 – Formulações contendo conservantes NE – 1, MI – 2, EDTA – 3, BZNa – 4, Ác. Cítrico – 5, Timol – 6, Sem conservante – 7. (a) sistemas avaliados sob 14 dias e (b) sistemas avaliados em 30 dias. Fonte: A autora.

Em contrapartida, as formulações contendo os conservantes MI, NE e ácido cítrico mantiveram a estabilidade durante 14 dias, e nos demais dias a formulação contendo ácido cítrico e EDTA apresentaram aumento de pH. No sistema contendo o conservante MI, transcorridos os 13 dias, foi observado o início de um decréscimo nos valores de pH. No entanto, o sistema manteve-se estável até 30 dias, mantendo pH acima de 7. Os nanossistemas que apresentaram valores muito abaixo do pH 8 formaram aglomerados das partículas (floculação) (SCHAFFAZICK *et al.* 2002). Para Gharanjig *et al.* (2020), o pH ideal para a estabilidade de gelatina tipo B é 5,7 o que pode justificar a preservação do material de parede e, portanto, a elevada eficiência dos sistemas que indicaram diminuição de pH (CHEN *et al.* 2013; GHARANJIG *et al.* 2020). Na formulação contendo EDTA, o aumento de pH pode ser justificado pela presença de micro-organismos.

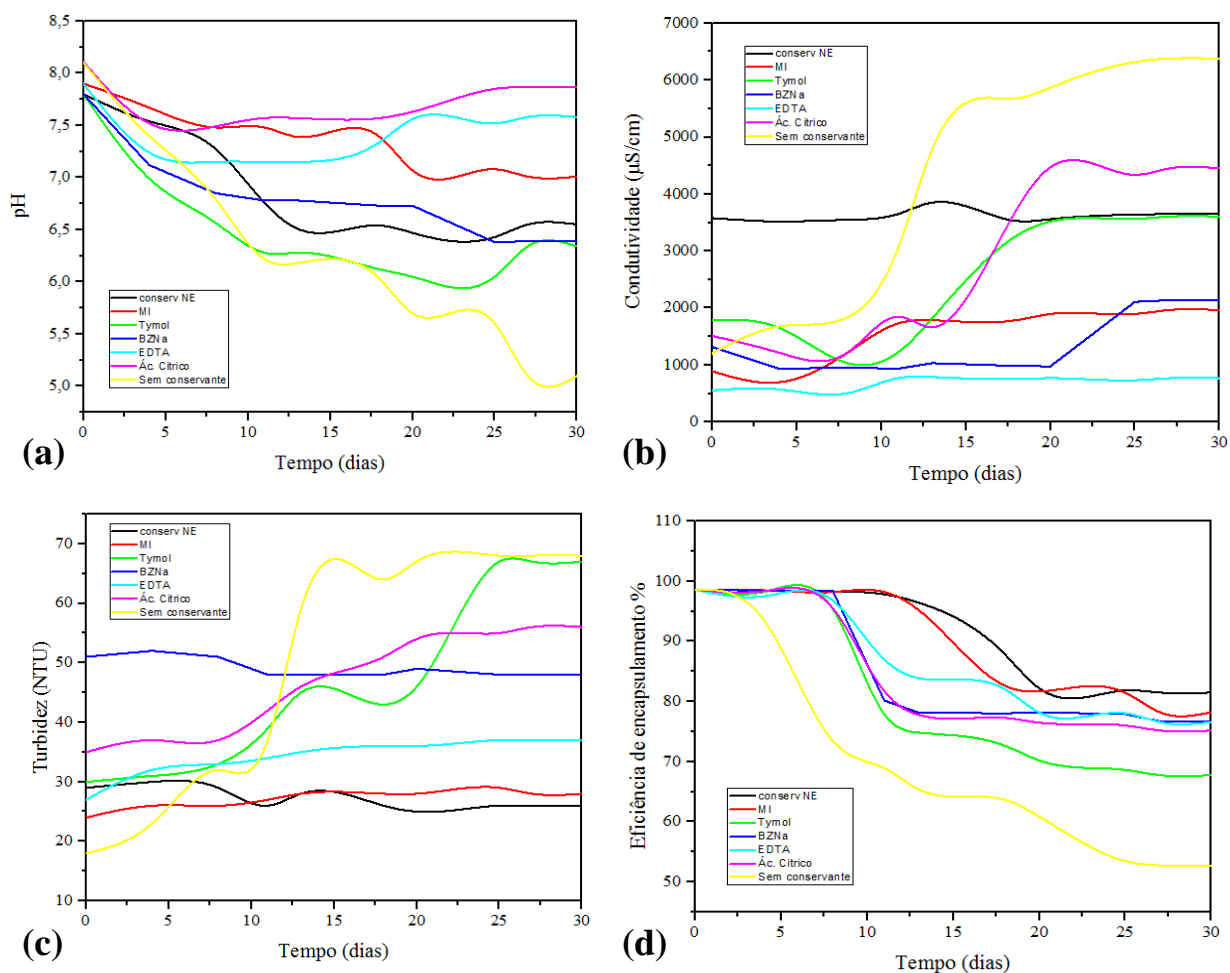


Figura 21 - Avaliação dos parâmetros de estabilidade das formulações em função do tempo (dias) mediante a adição de conservantes: (a) pH, (b) condutividade elétrica, (c) turbidez e (d) Eficiência de Encapsulamento. Fonte: A autora.

A partir do 14^o dia, as formulações contendo timol e ácido cítrico, e sem conservante apresentaram um aumento significativo da condutividade elétrica e, ao 20^o dia, a formulação contendo BZNa apresentou aumento de condutividade elétrica para aproximadamente 1000 μS/cm, indicando que tal formulação apresentou desestabilização progressiva a curto prazo. O óleo essencial demonstra certa condutividade elétrica devido aos grupos funcionais de suas moléculas constituintes (JALÉN; GRACKA, 2015). O aumento da condutividade também pode ser justificado pela dispersão de óleo essencial no meio. No entanto, outros fatores devem ser considerados, como o aumento de temperatura, que pode alterar a eficiência das de parede e interferir na ação de cargas disponíveis na superfície das formulações (CORADI *et al.* 2014).

Todavia, para as formulações contendo os conservantes EDTA, NE e MI houve

aumento de condutividade elétrica ao 14º dia, com valores próximos à maior alteração observada na primeira quinzena de avaliação. O aumento de condutividade elétrica corrobora aos valores observados de pH. A condutividade elétrica reporta desestabilização das cargas do sistema, uma vez que o ponto isoelétrico de cargas é modificado (GHARANJIG *et al.* 2020; KUMAR e DIXIT, 2017). O decréscimo do pH altera o ponto isoelétrico equivalente a pH 8, descrito por Silva *et al.* (2018) e por Oliveira *et al.* (2019). Portanto, com a alteração do pH houve um aumento da condutividade concomitante à possível aglomeração de cargas por interações hidrofóbicas com o meio e ligações secundárias formadas entre as partículas (KUMAR e DIXIT, 2017).

A turbidez das formulações aumentou a partir do 9º dia de avaliação, mantendo-se até o 22º dia, e atingindo o valor máximo para a formulação sem conservante, e para aquela contendo timol, em torno de 66 NTU, respectivamente, em 27 dias. Mudanças na turbidez podem ser justificadas pela presença de material floculado no meio (KIRBY, HARRIS e LEWIS, 2004), o que pode sugerir rompimento de partículas decorrente da desestabilização eletrostática promovida pela variação do pH e da condutividade elétrica (MORÁN *et al.* 2017; PIRES, 2019).

As formulações desenvolvidas apresentaram, de forma geral, elevada eficiência de encapsulamento durante o período de avaliação, compreendendo valores entre 70 a 80%. No entanto, as únicas formulações que apresentaram preservação das propriedades organolépticas, estabilidade de pH e condutividade elétrica em função do tempo foram aquelas contendo os conservantes MI e NE. Por essa razão, essas formulações foram as selecionadas para as próximas análises.

5.2.2. Estabilidade das Formulações na Fase II utilizando os Conservantes NE e MI

Como verificado, as formulações mais estáveis foram aquelas contendo os conservantes NE e MI. No primeiro dia após a síntese, a eficiência de encapsulamento (EE), **Figura 22-d**, correspondeu a 98% e manteve-se entre 90 a 95% após 15 dias de análise. Após esse período houve um decaimento para aproximadamente 87% para ambos os sistemas e, durante 57 a 80 dias, não foram mais observadas variações bruscas. A partir de 86 dias, não houve variação significativa na EE, a qual permaneceu estável em 73 % tanto para a formulação contendo NE, quanto para aquela contendo NI.

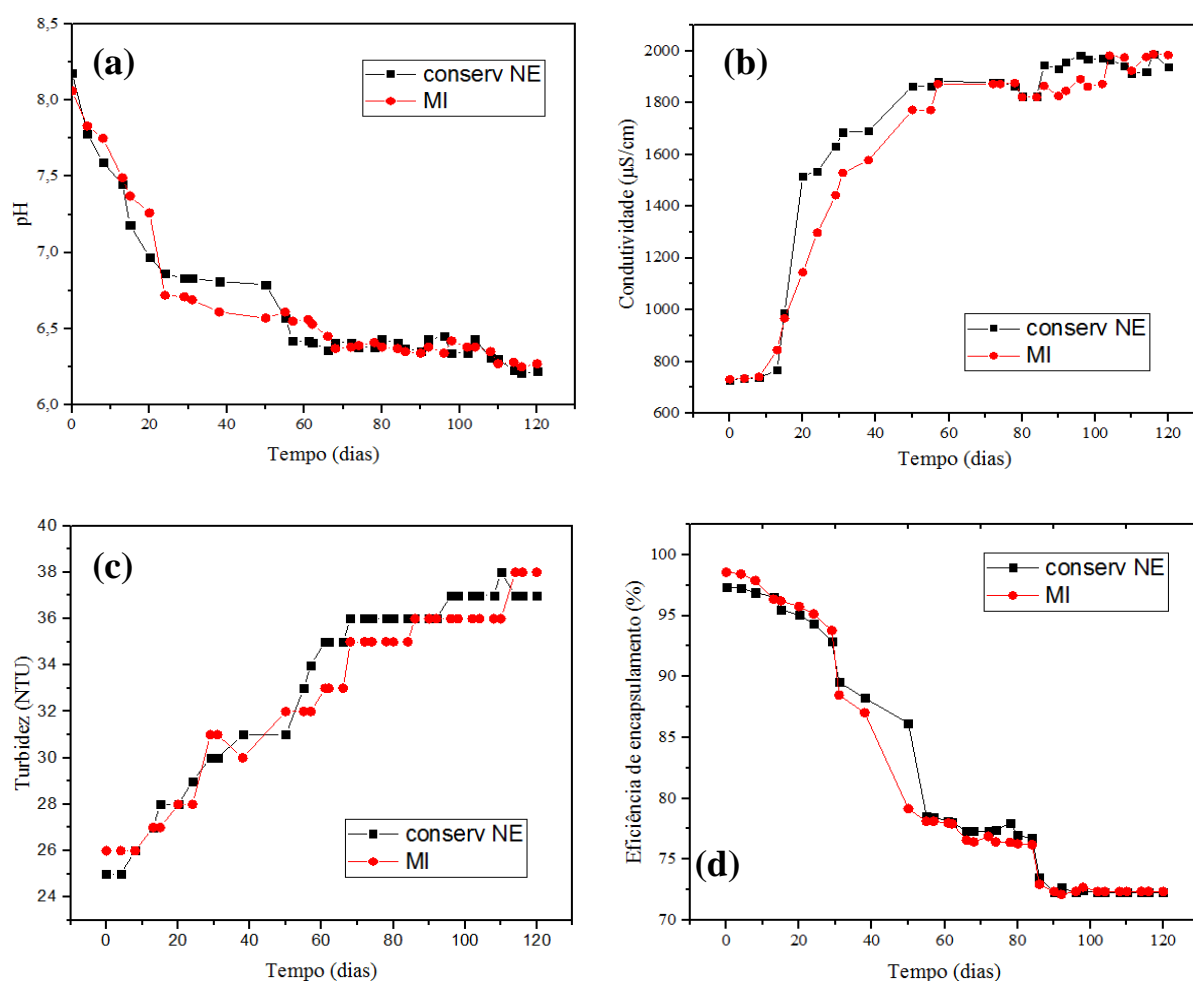


Figura 22 - Análise dos parâmetros de estabilidade das formulações em função do tempo (120 dias) e análise de estabilidade de curta duração mediante a adição de conservantes: (a) pH, (b) condutividade elétrica, (c) turbidez e (d) Eficiência de Encapsulamento. Fonte: A autora.

Quando há exposição do óleo essencial no meio, tem-se a diminuição do pH para ambos os sistemas, confirmando a diminuição da eficiência de encapsulamento e aumento da desestabilização da formulação, bem como modificações da turbidez e da condutividade elétrica. Notou-se que a turbidez, **Figura 22-c**, se manteve constante nos intervalos de 68 a 80, 80 a 92, e 98 a 110 dias, podendo ser justificada pela atração de cargas entre as partículas e à alteração do ponto de estabilidade elétrica. Notou-se visualmente uma decantação de material particulado no fundo dos frascos das formulações contendo NE e MI, o que pode influenciar na detecção do aumento de turbidez. Considerando que os sistemas são coloidais, não há uniformidade na distribuição de densidade de material particulado pelo meio, uma vez que o pH diminuiu, acidificando o meio e desestabilizando as cargas nas superfícies externas das

nanopartículas. Esse fenômeno pode justificar a decantação e a desestabilização das formulações. Isso fica evidente ao se observar o decréscimo da turbidez em alguns pontos da curva, decorrente da dificuldade da detecção de turbidez real do meio.

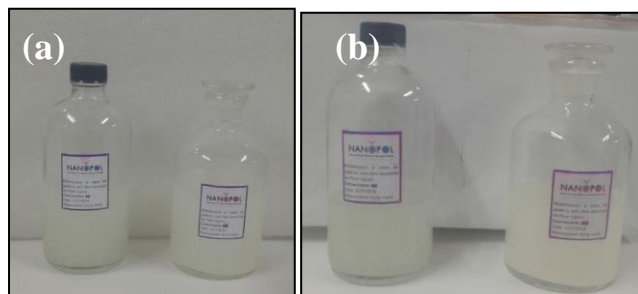


Figura 23 – Análise de cor sob curta duração, 24 h após síntese (a) com conservantes NE e MI e (b) após 120 dias. Fonte: A autora.

A condutividade elétrica é um fator indicativo de exposição de óleo essencial no meio e, em ambas as formulações, foi observado o aumento da condutividade elétrica à medida que a eficiência de encapsulamento diminuiu. As propriedades organolépticas revelaram alteração de cor, transcorridos 12 meses. A [ANVISA \(2004\)](#) preconiza que um produto aberto para uso ou consumo no decorrer de 120 dias deve ser avaliado e manter suas propriedades iniciais inalteradas.

5.2.3. Estabilidade das Formulações na Fase II utilizando os Conservantes NE e MI

A estabilidade das formulações em longa duração foi verificada durante 12 meses, **Figura 24**. As análises mensais da estabilidade de longa duração (12 meses) demonstraram resultados similares aos relatados nos ensaios de curta duração (120 dias). No entanto, a de longa duração apresentou valores de eficiência de encapsulamento superiores aos de curta duração. Comparando os resultados dos ensaios das análises de curta com as de longa duração pode-se afirmar que as formulações não manipuladas mantiveram suas propriedades preservadas por mais tempo. As propriedades organolépticas das formulações de longa duração mantiveram-se inalteradas durante 12 meses, o que não foi observado na análise da estabilidade em 120 dias em sistema de manipulação constante.

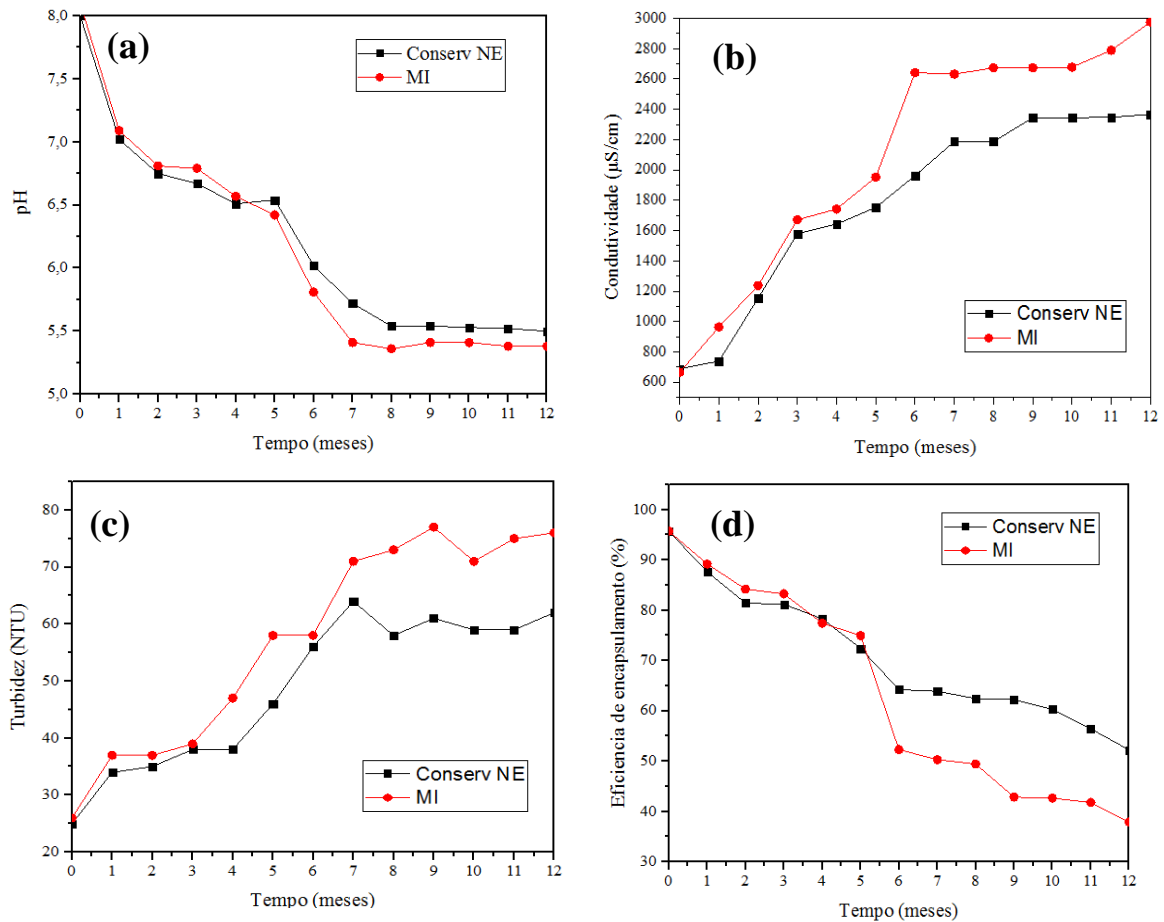


Figura 24- Análise dos parâmetros de estabilidade das formulações em função do tempo e análise de estabilidade de longa duração mediante a adição de conservantes: (a) pH, (b) condutividade elétrica, (c) turbidez e (d) Eficiência de Encapsulamento. Fonte: A autora.

A **Figura 25** mostra os frascos contendo as formulações devidamente vedadas. É possível notar a preservação de cor dos mesmos ao longo dos 12 meses. A diferença visual das formulações se dá pela formação de aglomerados de material de parede no fundo do frasco, sendo observável a partir do 4^o mês. A turbidez avaliada nos sistemas demonstrou aumento abrupto a partir do 4^o mês de análise.

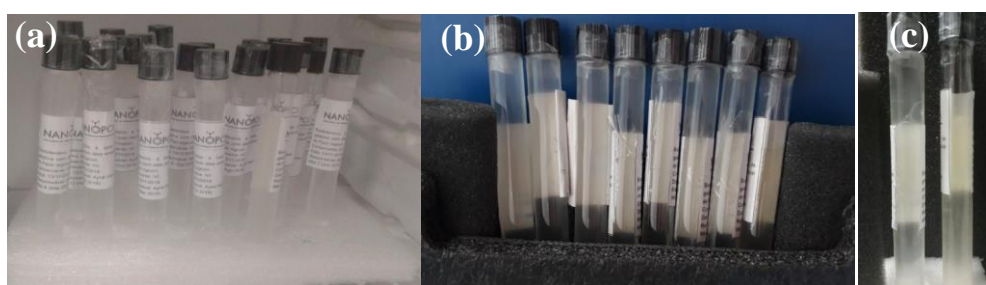


Figura 25 - Análise de cor sob Longa Duração após 24 h de síntese (a) com conservantes NE e MI, (b) após 8 meses e (c) após 12 meses. Fonte: A autora.

Analisando comparativamente as duas formulações a longo prazo (com conservante NE e MI), notou-se diferença entre os parâmetros avaliados. A formulação contendo o conservante NE se manteve com eficiência de encapsulamento superior à formulação contendo MI. A partir do 5º mês de avaliação, a eficiência de encapsulamento da formulação contendo MI diminuiu substancialmente, atingindo valor mínimo de 38 % em 12 meses. Tal formulação, por 5 meses de avaliação, manteve eficiência de encapsulamento equivalente ou acima do valor referido como ideal pela literatura corresponde a ≥ 70 % (SNIMA *et al.* 2014; VENKATESAN; ANIL; KIM, 2017; RAMOS *et al.* 2019). Para a formulação contendo o conservante NE a eficiência de encapsulamento também atingiu valores equivalentes a 70 % até o 5º mês. No entanto, manteve-se estável entre valores de 65 % a 62 % até o 10º mês de avaliação.

A condutividade elétrica crescente observada na formulação contendo o conservante MI pode estar relacionada à desestabilização do meio a partir de 6 meses de análise e, portanto, o configura como a formulação mais instável quando comparada com aquela contendo NE. Do mesmo modo, a turbidez foi observada com aumento a partir do 6º mês para as formulações contendo NE e MI. O pH, no entanto, a partir do 5º mês de avaliação, decaiu para ambas as formulações devido à exposição de óleo essencial no meio.

A desestabilização das formulações observadas nas avaliações de longa duração, comparativamente com às de curta duração, demonstrou que ambos os sistemas não perderam suas propriedades organolépticas e físico-químicas quando abertos e submetidos a fatores adversos de manipulação. Adicionalmente, a partir do 6º mês de avaliação, as formulações sofreram consideráveis desestabilizações. Desta forma, é possível afirmar pela Resolução RDC N° 34, (ANVISA, 2010), que a validade das formulações seria equivalente a 3 meses de uso quando abertos, com 1 mês de margem de segurança. Para as formulações em estoque ou prateleira corresponde a 5 meses de validade e 1 mês de segurança, contendo 1 L por embalagem, de acordo com a classificação da ANVISA (2010) para “líquidos para pronto uso” inseticidas/repelentes.

5.3. Caracterização físico-química das formulações

5.3.1. Potencial Zeta e Tamanho de partícula

Foram realizadas análises de DLS nas formulações contendo conservante NE e MI, a fim de verificar o tamanho das nanopartículas e o Potencial Zeta dos nanossistemas.

Nas medidas de Potencial Zeta, os valores obtidos (**Tabela 3**) foram -30,6 e -18,5 mV, assegurando a formulação contendo o conservante NE dentro do ideal para estabilidade de cargas (valor ≥ 30) (LU; GAO, 2010; ALEX *et al.* 2016; KUMAR; DIXIT, 2017;). De acordo com Kumar e Dixit (2017), sistemas com valores de potencial zeta maiores que -25 mV e menores que +25 mV, eventualmente formarão aglomerados devido às interações entre partículas, incluindo ligações secundárias e interações hidrofóbicas.

Novamente foi observado outro indicativo de desestabilização por cargas na formulação contendo MI: a condutividade é superior àquela aferida na formulação contendo NE, o que sugere a maior presença de cargas no meio. A condutividade das formulações está vinculada ao pH. O pH pode aumentar ou diminuir bruscamente quando a formulação se afasta do ponto isoelétrico equivalente a pH 8 para esses tipos de nanopartículas, descrito por Silva *et al.* (2018). Por tais motivos observados nos resultados de Potencial Zeta, assim como os observados na estabilidade a longo prazo, a formulação contendo o conservante MI apresentou valores que sugerem desestabilização das nanopartículas e menor vida útil do material. Dessa forma, para as demais análises físico-químicas e para o ensaio larvicida foi selecionada somente a formulação contendo o conservante NE.

Tabela 3 – Análise de Potencial Zeta do sistema contendo conservante NE e MI. Fonte: A autora.

Amostras	Potencial Zeta (mV)	Condutividade (mS.cm ⁻¹)
NPOE_NE	-30,6	0,0127
NPOE_MI	-18,5	0,4250

Como observado na **Figura 26**, os valores de potencial zeta (mV) para a formulação contendo o conservante NE encontram-se em faixa majoritária entre -40 e -

30 mV, demonstrando que a quantidade de cargas do sistema não ultrapassa o sugerido para sua desestabilização. Também é possível observar valores menores em um segundo pico compreendendo uma faixa de -20 a -10 mV.

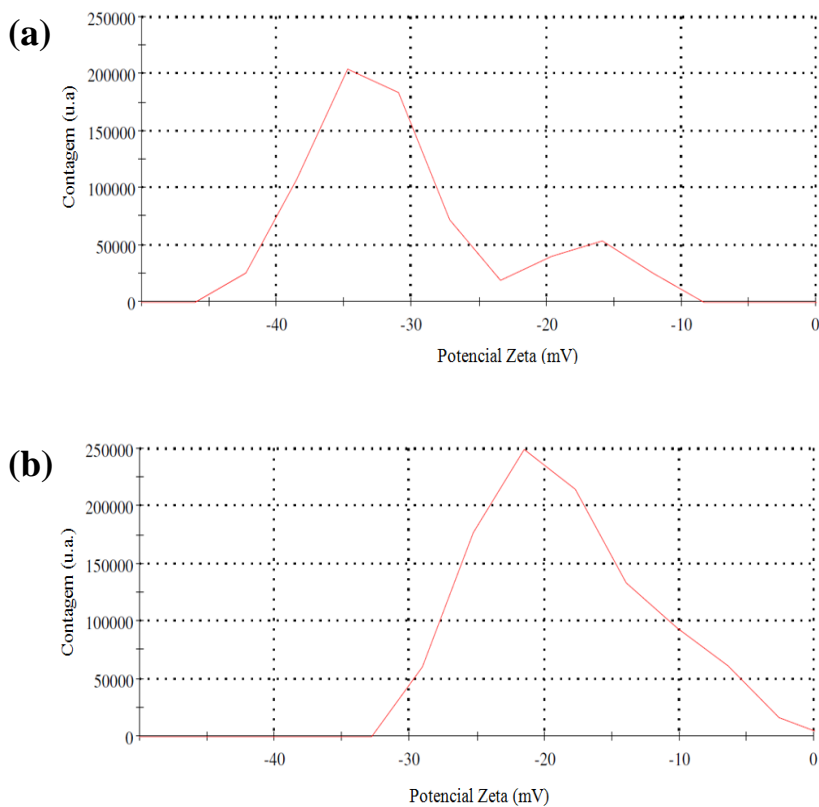


Figura 26 - Gráfico de medidas de Potencial Zeta da formulação contendo conservante NE (a) e nanossistema contendo conservante MI (b). Fonte: A autora.

A formulação contendo o conservante NE foi selecionada para a realização da análise de tamanho de partícula por DLS, uma vez que apresentou melhor estabilidade reportada pelo Potencial Zeta. Como pode ser observado, **Tabela 3**, a formulação contendo o conservante NE apresentou tamanho médio de partículas equivalente a 209,6 nm.

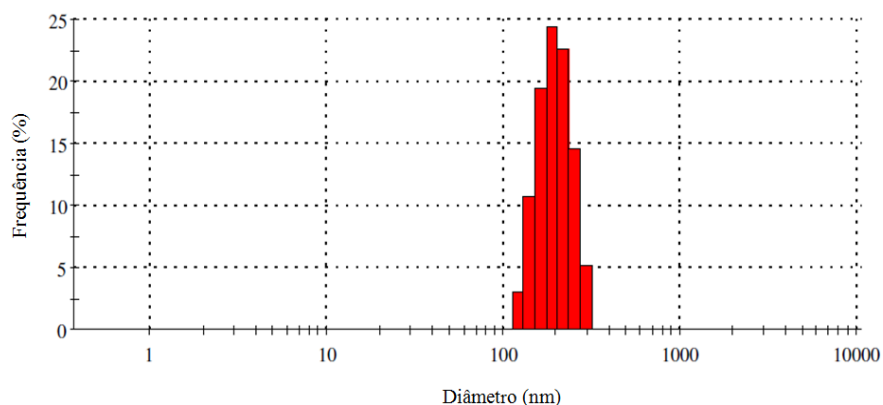


Figura 27 – Distribuição de tamanho de partículas da formulação contendo o conservante NE. Fonte: A autora.

O índice de polidispersão (PDI) correspondeu a 0,373, o que configura a baixa variação de tamanho de partículas. O tamanho de partículas variou entre 122,4 nm a 295,3 nm.

Tabela 4 – Média de tamanho hidrodinâmico de partículas e diâmetro médio da formulação contendo o conservante NE. Fonte: A autora.

Amostras	Média Z (nm)	Diâmetro médio (nm)	PDI
NPOE_NE	353,8	209,6	0,373

5.3.2. Análise Topográfica por AFM e distribuição do tamanho de partícula

As imagens obtidas por AFM (Nanopartículas Vazias – NPV e Nanopartículas com óleo essencial da *Piper nigrum* - NPOE e do óleo essencial *in natura* da *Piper nigrum* OEPN) corroboraram aos resultados observados através das análises de UV-VIS e FTIR, indicando a formação de nanopartículas contendo óleo essencial encapsulado. A formação de nanopartículas pode ser observada nas **Figura 28** e **Figura 30**. Nota-se na **Figura 28-b** que as nanopartículas apresentaram tamanho médio de diâmetro equivalente a (212 ± 2) nm.

Similar ao encontrado em modelos geométricos elípticos, notou-se a presença de diâmetros variáveis, sendo um menor (vértice) e um maior (co-vértice). Portanto, as nanopartículas não são totalmente esféricas para esse tipo de sistema mantido a 35 °C,

como ilustra a **Figura 28**. A altura das nanopartículas também sugere irregularidades na morfologia, pois a altura para o co-vértice e para o vértice difere em 10 nm.

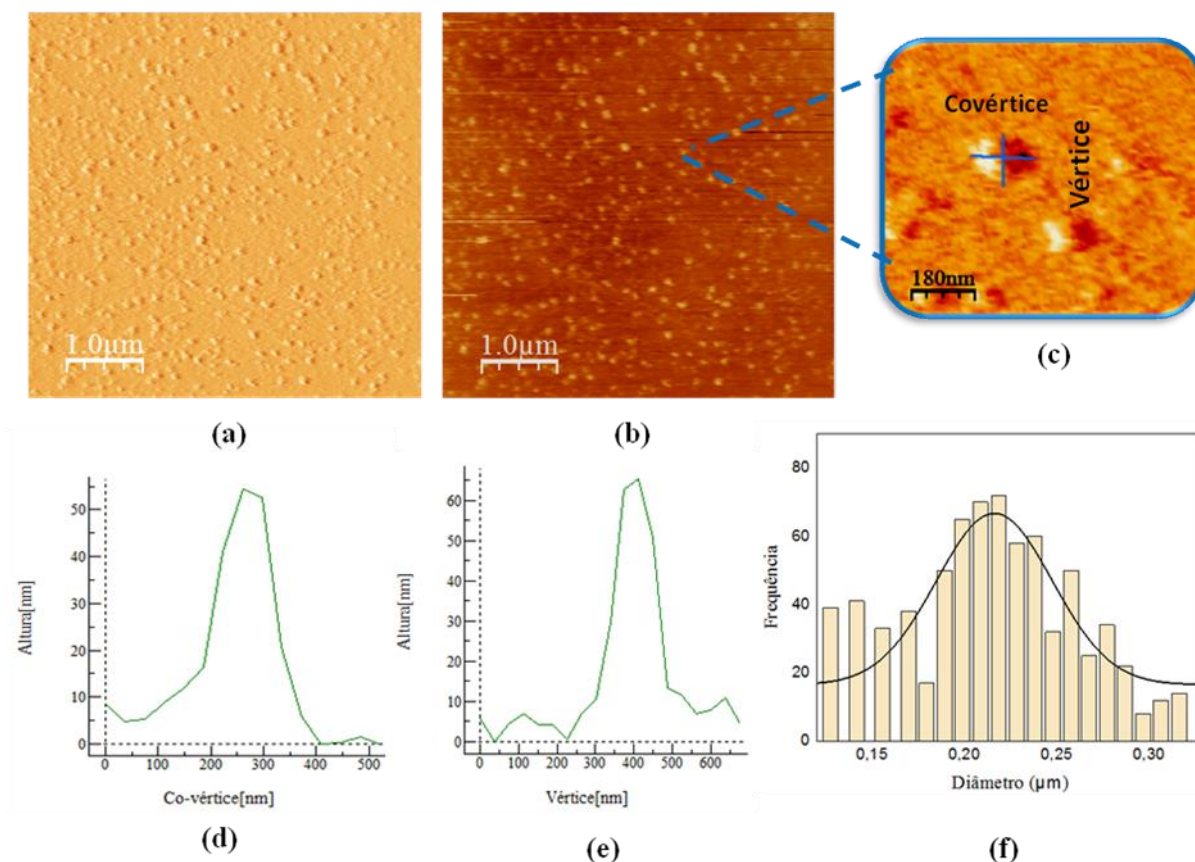


Figura 28– (a) Deflexão, (b) Topografia das nanopartículas com óleo essencial no primeiro dia de análise, após a síntese, (c) Nanopartícula em aproximação em escala 180 nm, (d) e (e) dimensão de Vértice e Co-vértice, respectivamente, e distribuição do diâmetro médio das nanopartículas por ajuste Gaussiano. Fonte: A autora.

Na análise de distribuição de tamanho de partícula foi aplicada a classificação de Feret, onde se considerou o diâmetro da nanopartícula irregular e mediu-se a maior distância entre as tangentes (INMETRO, 2017). Os diâmetros de Feret estão demonstrados através do gráfico de polidispersão, conforme mostra a **Figura 29-c**. Atribuiu-se a maior frequência de partículas em uma faixa de 200 a 300 nm e, pela curva Gaussiana, foi possível notar, através **Figura 29-a e b**, uma grande concentração de nanopartículas em uma faixa de 200 a 250 nm. Entretanto, não foi possível observar uma variação considerável na distribuição de tamanho.

Os tamanhos das nanopartículas carregadas com óleo essencial, observados após 24 h de síntese, variaram entre 100 a 350 nm, conforme mostra a **Figura 28-f**. Após 60

dias de síntese, foi observada a variação de 100 a 500 nm (PDI), conforme mostra a **Figura 29-c**.

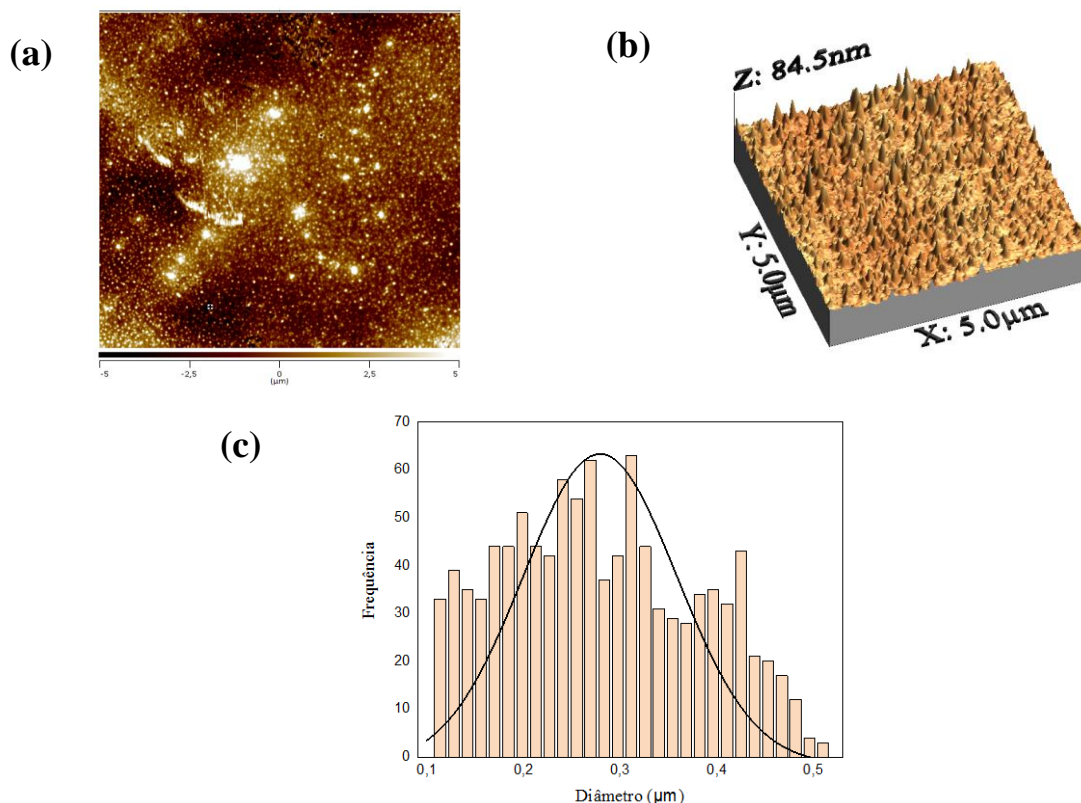


Figura 29– Imagens de AFM de nanopartículas após 60 dias carregadas com óleo essencial de *Piper nigrum*: (a) Topografia em 3D das nanopartículas e (c) Gráfico de distribuição do diâmetro médio das nanopartículas por ajuste Gaussiano. Fonte: A autora.

As nanopartículas vazias apresentaram diâmetros menores e de tamanhos equivalentes às nanopartículas contendo óleo essencial encapsulado. Isso se deve à ausência do óleo essencial e, conseqüentemente, à diminuição do tamanho da partícula. Também foi observada uma diferença entre a integridade das partículas com óleo essencial após o primeiro dia de síntese e, também após 60 dias. A **Figura 28-a** mostra a imagem de AFM das nanopartículas após 24 h de síntese, sendo possível verificar a integridade na morfologia das nanopartículas. No entanto, após 60 dias de análise, como mostra a **Figura 29-a**, foram observados pontos claros com áreas maiores. Esses resultados corroboram a análise de eficiência de encapsulamento verificada no primeiro dia de síntese e após 60 dias, sendo observado que os valores de eficiência de encapsulamento decrescem em função do tempo de análise.

Na **Figura 30** foi observado na amostra NPV uma morfologia regular, de formato

esferóide, sendo a mesma morfologia observada para as nanopartículas em temperatura de 25 °C, como mostra a **Figura 31**.

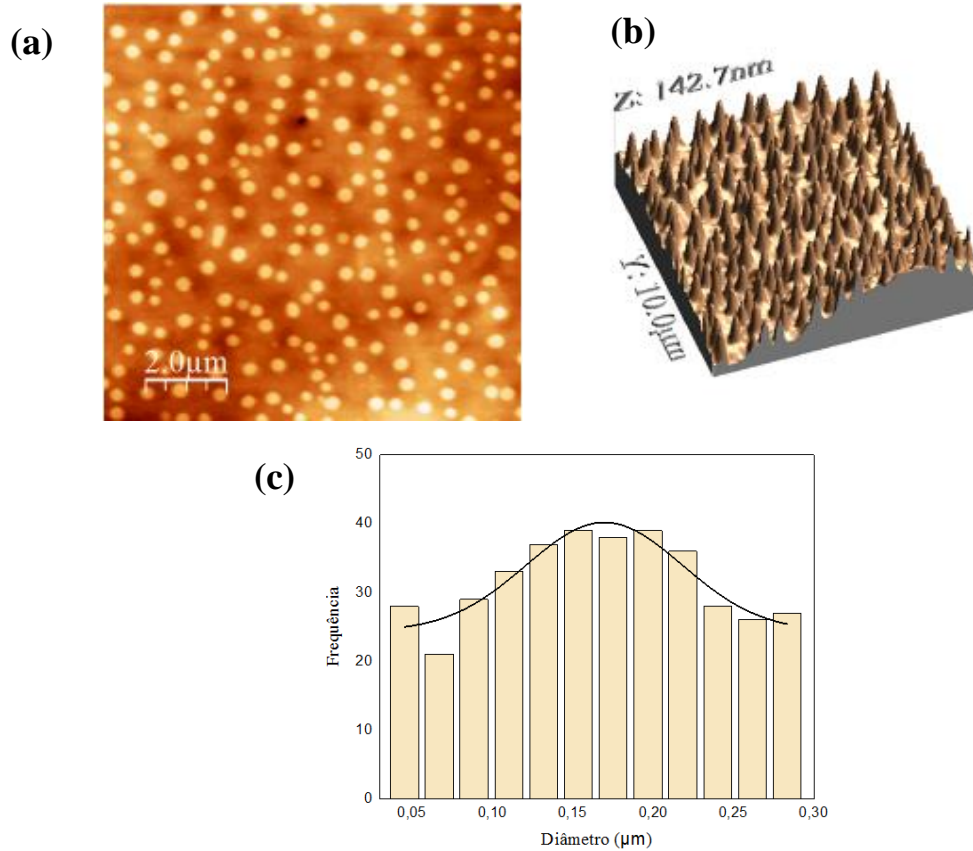


Figura 30 - Imagens de AFM de nanopartículas vazias (a) Topografia em 3D das nanopartículas e (c) Gráfico de distribuição do diâmetro médio das nanopartículas representadas através de ajuste gaussiano.

Supõe-se que a morfologia esferóide seja decorrente da ausência de óleo essencial e, para as nanopartículas a 25 °C contendo óleo essencial, em contrapartida, possivelmente são influenciadas pelo aumento da temperatura. [Kommareddy, Shenoy e Amiji \(2007\)](#) reportaram que, em temperaturas mais elevadas, a higroscopicidade da gelatina aumenta, tendendo a uma modificação superficial, o que pode influenciar para que a gelatina mantida a 35 °C possa apresentar superfície e diâmetros irregulares. Essa diferença de morfologia pode ser verificada nas **Figura 28** e **Figura 31**.

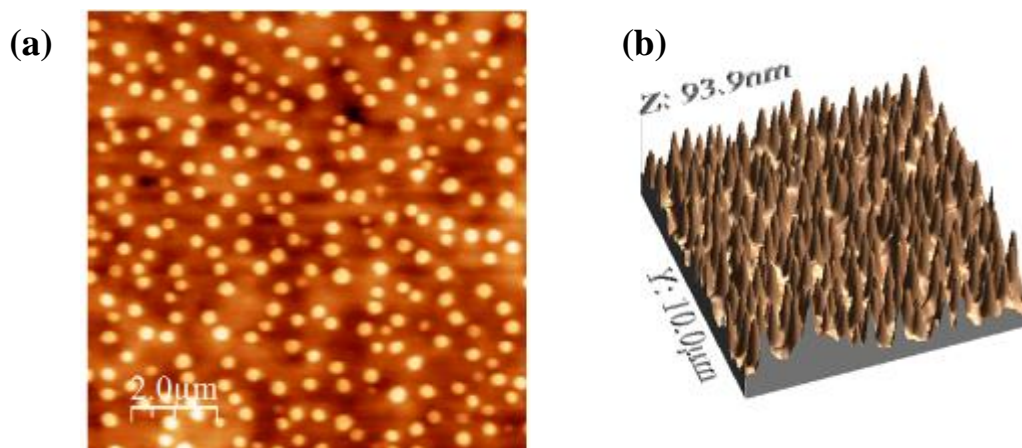


Figura 31 – (a) Nanopartícula com OE da *Piper nigrum* mantida a 25°C e (b) Topografia 3D das nanopartículas contendo OE e mantidas a 25°C.

5.3.3. Análise por FTIR

Os espectros de FTIR das nanopartículas e suas respectivas bandas [Nanopartículas Vazias – NPV e Nanopartículas com óleo essencial da *Piper nigrum*-NPOE e do óleo essencial *in natura* da *Piper nigrum* (OEPN)] podem ser observados na **Figura 32**. A identificação desses espectros e bandas permite determinar qualitativamente o encapsulamento do óleo essencial, confirmando os resultados obtidos anteriormente na eficiência de encapsulamento.

Para as amostras NPV e NPOE, as principais bandas observadas são referentes ao material de parede mais externo, indicando que este é formado por gelatina. O pico em aproximadamente 1650 cm^{-1} , de acordo com [Silva et al. \(2018\)](#), é atribuído ao grupo amina I (C=O e C-N), e [Kaintura et al. \(2015\)](#) determina que as bandas na região 3477 cm^{-1} observadas nos espectros das amostras NPV e NPOE são atribuídas ao estiramento antissimétrico de NH_2 de amida secundária da gelatina.

Foi observado no espectro da amostra OEPN o estiramento simétrico de C-H que corresponde aos grupos funcionais do β -cariofileno na banda 883 cm^{-1} ([BOUNAAS et al. 2018](#); [PEREIRA et al. 2019](#)). A banda em 2359 cm^{-1} corresponde à vibração de CO_2 , que pode ser observada, inclusive, em todos os espectros das amostras devido às condições experimentais. A banda intensa com pico máximo em 1653 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação dupla entre carbonos C=C, que pode ser encontrada na molécula de silvestreno ([SCHULZ; BARANSKA, 2017](#)).

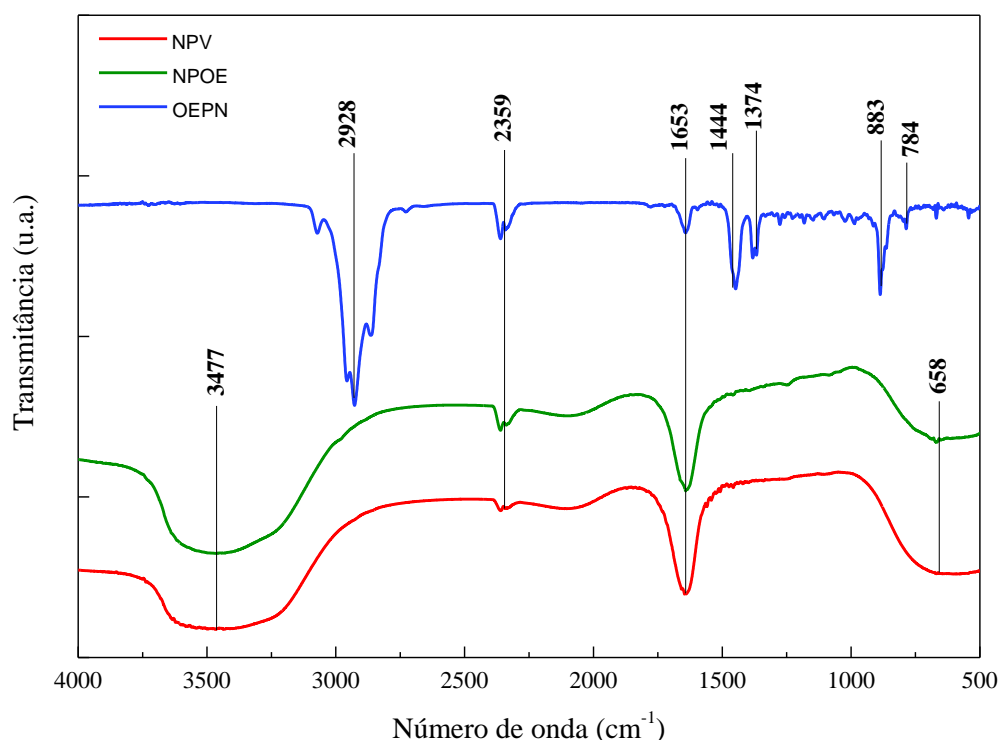


Figura 32 - Espectros de FTIR das amostras NPV, NPOE e OEPN. Fonte: A autora.

Como pode ser observado na **Figura 32**, os espectros das amostras NPV e NPOE coincidem na maioria dos picos, reforçando o encapsulamento do óleo essencial pelas nanopartículas. É possível notar que, para a amostra NPV não há bandas referentes ao óleo essencial entre 1000 cm^{-1} a 800 cm^{-1} (BOUNAAS *et al.* 2018). Todavia, no espectro NPOE, no mesmo intervalo, são observados picos de baixíssima intensidade referentes ao óleo essencial. Tal fato se deve ao óleo essencial não estar encapsulado 100%, ou seja, ainda há traços no meio (BOURBON; CERQUEIRA; VICENTE, 2016).

5.3.4. Análise por TG/dTG e DSC

As análises termogravimétricas (TG/dTG), **Figura 33**, e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), **Figura 34**, foram utilizadas para descrever o comportamento térmico das formulações contendo Nanopartículas Vazias (NPV), Nanopartículas carregadas com óleo essencial (NPOE) e do óleo essencial (OE).

De acordo com Rangelov *et al.* (2017) a degradação total da gelatina Tipo B se dá em aproximadamente 90 °C em um único evento térmico. Considerando que grande parte dos constituintes da síntese para formular as nanopartículas é de gelatina tipo B,

sugere-se que tanto para NPOE e NPV a gelatina presente no material de parede das nanopartículas pode estar degradando simultaneamente aos demais componentes.

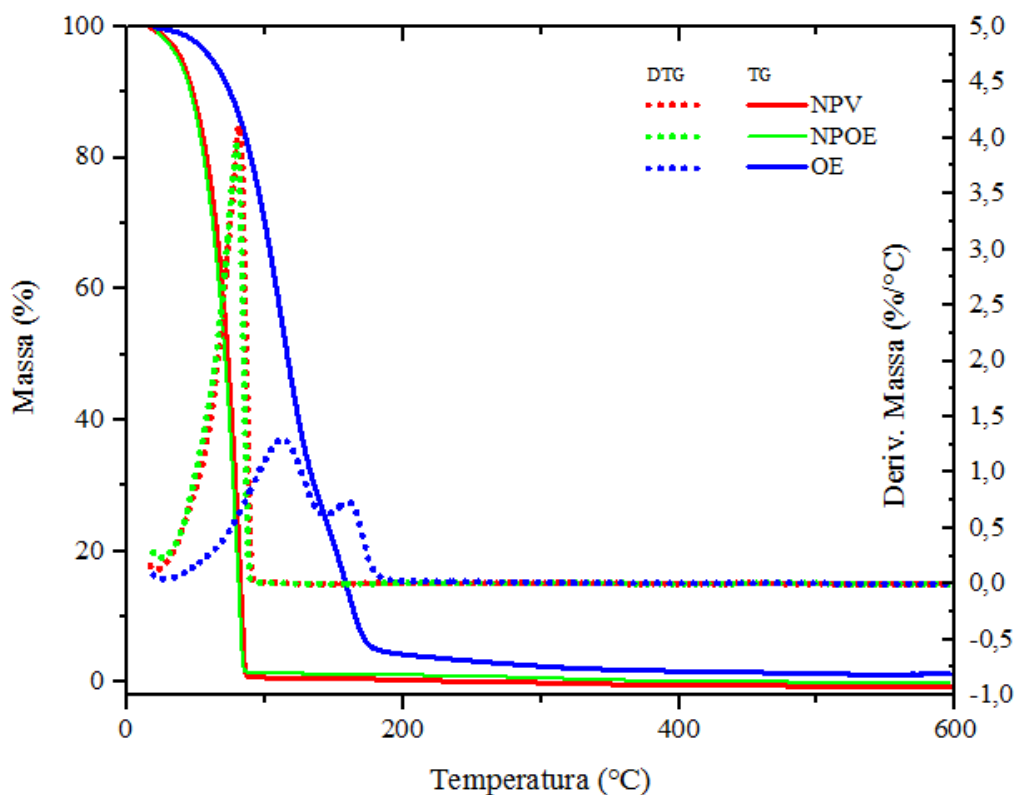


Figura 33 – Termogravimetria (TG/dTG) das amostras NPV, NPOE e OE. Fonte: A autora.

O primeiro pico a aproximadamente 110 °C do óleo essencial na TG representa o fim da degradação de grupos orgânicos, indicando a possível degradação dos grupos monoterpênicos (DELANCEY *et al.* 2011), enquanto o evento sugere a degradação de compostos orgânicos com alto peso molecular (HAN *et al.* 2017)

Na análise por DSC (**Figura 34**) é observável sutil variação no fluxo de calor para as amostras NPV e NPOE entre 362 e 478 °C, com variação de fluxo de calor 3,35 J/g, podendo ser um indicativo de degradação do PCL residual nas NPOE e NPV até então não observável.

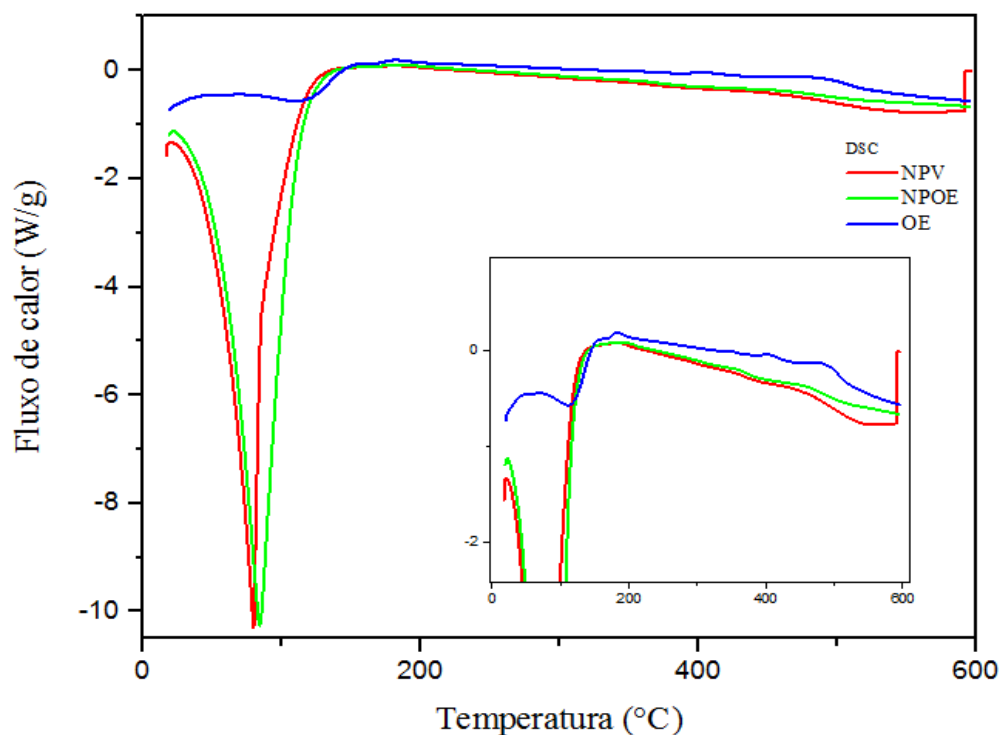


Figura 34 – Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) das amostras NPV, NPOE e OE, com fluxo convencional exotérmico (picos) e endotérmico (vales). Fonte: A autora.

Tanto para as amostras NPOE e NPV, como para o OE, foram observáveis eventos endotérmicos. Para NPOE e NPV, a variação de fluxo de calor conferiu 1614 J/g e para o OE um evento endotérmico com variação de fluxo de calor 57,92 J/g, o que é justificável para o OE, uma vez que em sua composição se faz presente moléculas orgânicas e a energia atribuída para configurar quebra de ligação é substancialmente inferior ao encontrado nas NPOE e NPV.

5.3.5. Liberação Controlada *in vitro*

A liberação controlada do óleo essencial da *Piper nigrum* foi verificada através do estudo da cinética de liberação. O modelo matemático pertinente às equações da curva de liberação corresponde ao modelo de Korsmeyer-Peppas (SIEPMANN; PEPPAS; HIGUCHI, 2011), com expoente de liberação n entre 0,64 e 0,65 (Tabela 5), representando um modelo anômalo (não Fickiano) de liberação controlada (FU; KAO, 2010).

Quando $0,5 < n < 1$ (Tabela 5) considera-se um modelo de transporte não-Fickiano, o que caracteriza mecanismo por difusão da matriz polimérica devido ao inchaço da

cápsula (JACOB *et al.* 2018; BRUSCHI, 2015). É um processo que depende fator tempo ($t^{0,5 \cdot n < 1}$), sendo que o tempo é a variável responsável pelo rearranjo das cadeias poliméricas de forma que o polímero consiga abrir suas cadeias e lentamente transpor o óleo essencial encapsulado do núcleo da nanopartícula para o meio externo (BRUSCHI, 2015).

Tabela 5 –Parâmetros da cinética de liberação *in vitro* do sistema contendo conservante NE. Fonte: A autora.

Modelo	Coeficiente	Concentração 500 µg.mL ⁻¹		
		pH = 3	pH = 7	pH = 10
Korsmeyer-Peppas	k	92,7	92,7	89,8
	n	0,64	0,65	0,64
	R ²	0,93	0,96	0,94

Observou-se que o óleo essencial da *P. nigrum* em diferentes pH (3, 7 e 10) apresentou liberação máxima por 72 h (conforme **Figura 35**). Não houve variação significativa nos valores de liberação do óleo essencial em diferentes meios. As DL₅₀ e DL₉₀ (aplicação larvicida) foram plotados de acordo com o gráfico (**Figura 36**). A DL₅₀ mostra valores correspondentes aos observados nas primeiras 5 h de liberação. A DL₉₀ possui valores correspondentes a 24 h de liberação do óleo essencial. De acordo com o estudo de liberação, foram preparadas concentrações previamente estimadas para aplicação larvicida. Portanto, é possível prever o comportamento de liberação quando submetido ao tempo de exposição de 72 h no bioensaio. É possível observar na **Figura 35** que os valores em µg.mL⁻¹ da concentração no meio após 72 h continuam em aproximadamente 460 µg.mL⁻¹, indicativo de óleo disperso no meio. Porém, não é possível afirmar que ocorra liberação do ativo após esse período. O valor identificado na análise após 72 h pode ser referente à concentração máxima de óleo essencial no meio.

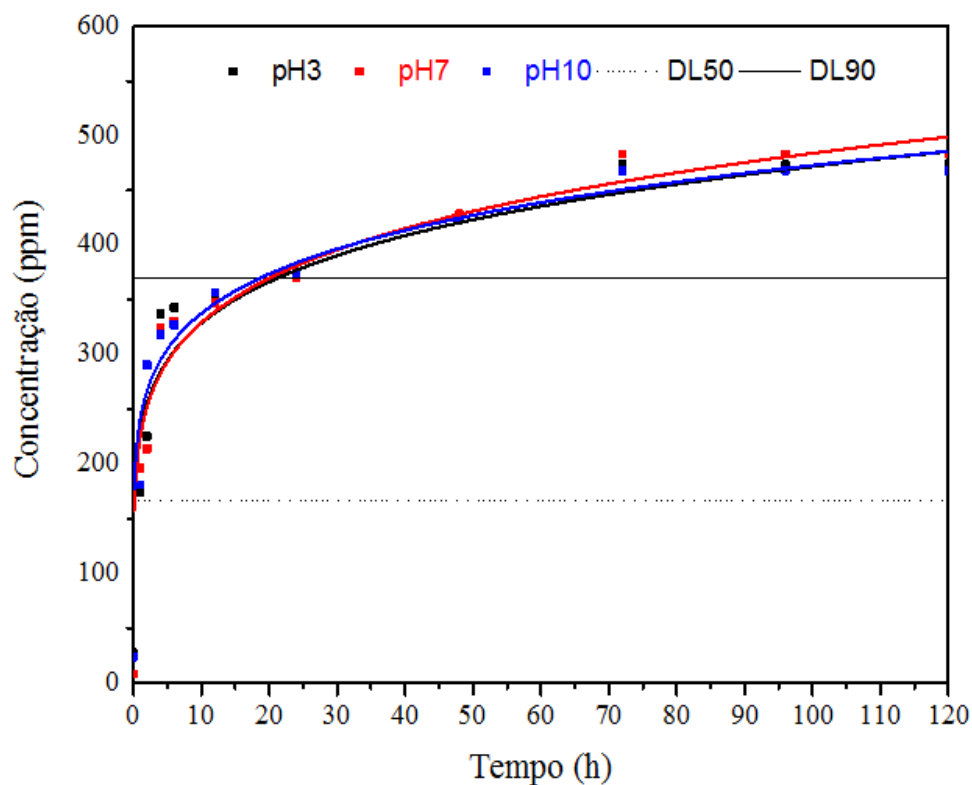


Figura 35 – Curvas de liberação controlada em diferentes pH para o sistema contendo conservante NE. Fonte: A autora.

Quanto ao fim da liberação pela predição do comportamento da cinética de liberação, através do modelo de Korsmeyer-Peppas, sugere-se que quando o óleo essencial disperso no meio for totalmente volatilizado, quando t^n tender a t^∞ (DIPIRO *et al.* 1996; BRUSCHI, 2015), haverá um decaimento brusco na curva de liberação demonstrando ausência de ativo a ser liberado e indicando fim da liberação.

5.4. Bioensaio larvicida

5.4.1. Bioensaio larvicida com óleo essencial *in natura*

Os resultados expuseram que as larvas em condições laboratoriais (*in vitro*), (27 ± 1) °C a 70 % UR, apresentaram mortalidade de 100% para quase todas as concentrações em 48 h. Não houve variações significativas na mortalidade larval em nenhum dos intervalos de tempo analisados (24, 48 e 72 h). Para ensaios em condições de semi-campo (*in loco*), sob condições (29 ± 1) °C, 65 % a 72 % UR, foi observada variação na mortalidade larval em diferentes concentrações. Nas primeiras 24 h houve

progressão linear entre os valores de mortalidade, tornando-se menos pronunciado após 48 h e mantendo-se constante em 72 h (**Figura 36**) para as concentrações 125, 250, 375, 454 e 625 $\mu\text{g mL}^{-1}$, atingindo o percentual máximo de mortalidade de valores 30, 80, 90, 90 e 100 %, respectivamente.

A partir dos valores obtidos no experimento em semi-campo, a DL_{50} e DL_{90} foram calculadas com variações de dose para cada dia analisado. Nas primeiras 24 h, a DL_{50} e DL_{90} apresentaram valores de 229 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 628 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Em 48 h, esses valores diminuíram para 166 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 370 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e, finalmente, em 72 h foram de 74 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 356 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Considerando a baixa variação no número de óbitos entre 48 e 72 h, foi escolhida uma dose resposta de até 48 h. Assim, pode-se afirmar que o óleo essencial da *P. nigrum* tem melhor eficácia por até 48 h e que as concentrações mínimas usadas para resposta em 2 dias não podem ser inferiores a 166 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (LD_{50}) e 370 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (DL_{90}), respectivamente.

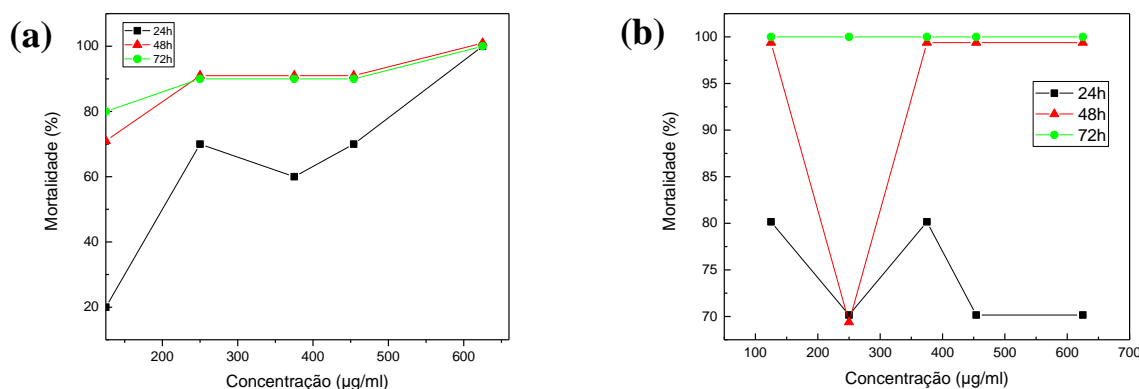


Figura 36 –Mortalidade *versus* concentração. Bioensaio com óleo essencial *in natura*. (a) Experiência *in loco* (semi-campo) e (b) experiência *in vitro* (laboratorial). Fonte: A autora.

O mecanismo de ação dos óleos essenciais em pesquisas semelhantes (YU *et al.* 2015; NARARAK *et al.* 2019) reportam a mudança de coloração no corpúsculo das larvas, de acordo com ação dos danos causados em sua fisiologia, **Figura 37**. A coloração das larvas através das diferentes concentrações indicou danos ao sistema neurológico e digestivo (HOUNDÉTÉ *et al.* 2010). A alteração na colocação da cabeça das larvas pode ser devido a inibição da acetilcolinesterase (AChE), uma enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (HOUNDÉTÉ *et al.* 2010; TALUKDAR *et*

al. 2017). As larvas podem ter sofrido o efeito da toxicidade do óleo essencial da *P. nigrum* pela ação combinada dos seus constituintes e principalmente pela ação do β -cariofileno (que compõe 34% da composição do óleo essencial). Quando isolado e oxidado, o β -cariofileno apresenta alta toxicidade em um intervalo de 30 min em espécies de *Aedes aegypti* e *Anopheles minimus* (NARARAK *et al.* 2019), além de se observar comportamento semelhante para outras variações de anofelinos como o *A. subpictus* (GOVINDARAJAN *et al.* 2016).



Figura 37 - Aspecto das larvas mortas e suas respectivas concentrações: esquerda para direita 125, 250, 375, 454, 625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e controle. Fonte: A autora.

Tabela 6 -Atividade larvicida do óleo essencial da *P. nigrum* em larvas de *A. aquasalis* em ensaio *in loco*. Fonte: A autora.

	Tempo (h)	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Mortalidade (%)	LC ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (IC 90%)	LC ₉₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (IC 90%)	Equação de regressão
	Óleo da <i>P. nigrum</i> in natura	24	125	20		
250			70			
375			60	229,56	628,33	Y = (-1.058 + 1.273) + 0.38X
454			70	(211,54 - 263,89)	(617,55 - 643,94)	
625			100			
CN			0			
48		125	70			
		250	90			
		375	90	166,99	370,17	Y = (-0.826 + 1.610) + 0.44X
		454	90	(152,62 - 181,23)	(366,82 - 378,17)	
		625	100			
		CN				
72		125	80			
		250	90			
		375	90	74,33	356,02	
		454	90	(68,37 -85,31)	(349,27 -361,93)	Y = (0.243 + 0.818) + 0.41X
		625	100			
		CN	0			

*LC₅₀ = concentração letal de mortalidade de 50%, LC₉₀ = concentração letal mortalidade de 90%, IC 90% = Intervalo de confiança, CN - Controle negativo.

5.4.2. Bioensaio larvicida com nanopartículas carregadas

Os ensaios com nanopartículas contendo óleo essencial encapsulado mostraram variação na mortalidade nas mesmas concentrações nos ensaios *in loco* e *in vitro*. O teste *in loco* mostrou maior regularidade na mortalidade de larvas em função da concentração aplicada. Por outro lado, o *in vitro* apresentou baixa variação na mortalidade por concentração, o que sugere que fatores como umidade e temperatura controlada (CARVALHO *et al.* 2002) poderiam ter afetado as condições ideais para a preservação das larvas afetadas pelo óleo essencial por mais tempo. Nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o ensaio *in vitro*, a mortalidade aumentou mais de 50 % após 48 h (Tabela 7). Os resultados também sugerem que em 24 h de liberação controlada *in loco* é possível obter mortalidade superior a 80 % e em 48 h de mortalidade total. Portanto, para eficiência na mortalidade > 90% são necessárias 48 h.

Tabela 7–Atividade larvicida de partículas carregadas com óleo essencial da *P. nigrum* em larvas de *A. aquasalis*. Ensaio *in vitro* e *in loco*. Fonte: A autora.

	Tempo (h)	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)/controle	Mortalidade <i>in vitro</i> (%)	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)/controle	Mortalidade <i>in loco</i> (%)
NP Carregadas com Óleo de <i>P. nigrum</i> in natura	24	100	6,67 \pm 7,73	100	8,33 \pm 7,63
		200	36,67 \pm 4,35	200	58,33 \pm 3,62
		400	88,33 \pm 2,88	300	83,33 \pm 5,77
		500	88,33 \pm 1,54	500	91,67 \pm 0,00
		CN-NP	---	CN-NP	---
	48	100	70,00 \pm 2,5	100	10,00 \pm 5,00
		200	81,67 \pm 7,63	200	66,67 \pm 2,33
		400	91,67 \pm 7,63	300	93,33 \pm 5,77
		500	95,00 \pm 5,00	500	100,00 \pm 0,00
		CN-NPV	---	CN-NPV	---
	72	100	98,33 \pm 2,88	100	25,00 \pm 2,17
		200	96,67 \pm 2,88	200	80,00 \pm 5,00
		400	96,67 \pm 2,88	300	96,67 \pm 5,77
		500	100,00 \pm 0,00	500	---
		CN-NPV	---	CN-NPV	---

*CN-NPV = Controle negativo contendo nanopartículas vazias.

As partículas vazias utilizadas como controle negativo demonstraram 0% de mortalidade. Dessa forma, o material de parede das partículas não interferiu na mortalidade larval, configurando assim a mortalidade larval pelas propriedades do óleo essencial e não pelos componentes da formulação.

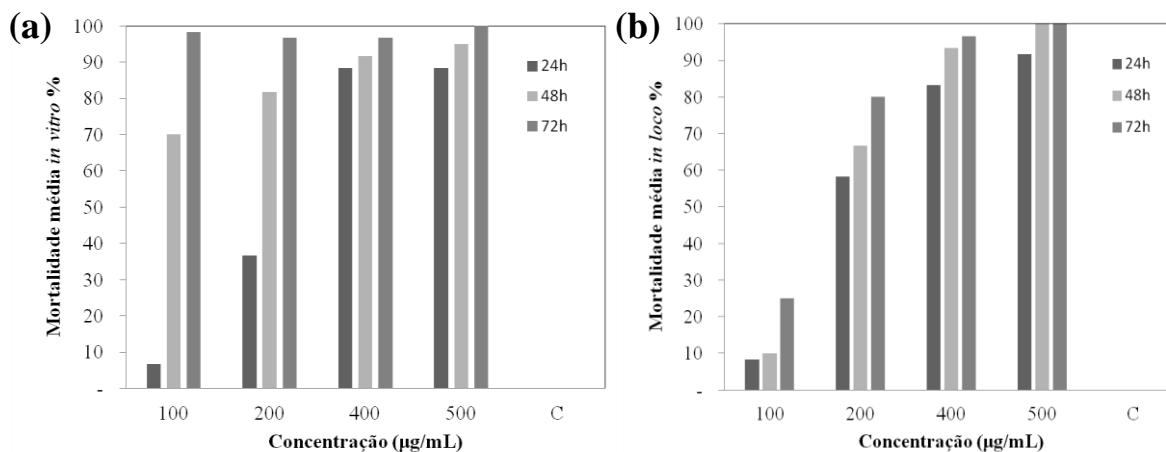


Figura 38 – Gráfico das mortalidades médias das larvas por concentrações de partículas carregadas com óleo essencial da *P. nigrum* (a) *in vitro* e (b) *in loco*, onde C corresponde ao controle. Fonte: A autora.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As partículas poliméricas contendo óleo essencial encapsulado da *Piper nigrum* mostraram-se estáveis quando mantidas a 35 °C quanto aos parâmetros avaliados preconizados pela ANVISA, e foi possível determinar a escolha dos conservantes mais adequados para prolongar a vida útil das formulações. Através do estudo de liberação controlada foi possível observar que as partículas liberaram o óleo essencial de forma contínua, para os sistemas mais estáveis contendo conservante MI e NE a 35 °C analisados em pH ácido, neutro e básico, a liberação total do ativo foi atingida em 72h.

Pode-se confirmar o encapsulamento do OE através das análises de FTIR e AFM. Através da análise por AFM foram obtidas imagens das nanopartículas com óleo essencial e a morfologia das partículas em relação ao encapsulamento do ativo a 35 °C. O FTIR corroborou aos dados obtidos por CG/EM, sendo possível observar as vibrações moleculares dos grupos funcionais presentes nos constituintes majoritários do óleo essencial. O potencial Zeta das amostras contendo os conservantes NE e MI revelou a elevada condutividade da formulação contendo MI em comparação àquela contendo NE,

indicando possível desestabilização de cargas e redução da vida útil da formulação.

Para este estudo conclui-se que o nanossistema PCL/gelatina com o conservante NE, dentre os demais conservantes utilizados, é o ideal para utilização a 35 °C. O óleo essencial foi encapsulado pelo material de parede com valores de EE entre 95 e 97%, e apresentou estabilidade quando mantido a 35 °C por 120 dias considerando a condição a curto prazo, e a longo prazo sua validade foi de 5 meses. A liberação controlada em diferentes pH apresentou aumento significativo no período de 24 h, alcançando valor máximo em 72 h. Esse fato sugere a restrição dos sistemas tanto com MI e com NE submetidos a temperaturas mais elevadas com prazo superior a 72 h, exigindo uma nova aplicação do material. Os bioensaios mostraram eficácia moderada do óleo essencial quando comparada ao controle de larvas de anofelinos em 24 h. No entanto, para aplicações entre 48 h e 72 h de ação do produto, o óleo essencial encapsulado apresentou maior eficácia. Também foi possível observar a diferença da mortalidade referente a fatores externos (umidade e temperatura) do *A. aquasalis* quando submetidos a um experimento *in loco*, se comparados a o experimento *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbasi, B.H., Ahmad N., Fazal H. e Mahmood T. (2010) **Conventional and modern propagation techniques in *Piper nigrum***. Journal of Medicinal Plants Research, v. 4, p. 7-12.

Aciole, S. D., Piccoli, C. F., Costa, E. V., Navarro-Silva, M. A., Marques, F. A., Sales M. B. H. e Rebelo, M. T. (2011). **Insecticidal activity of three species of Guatteria (Annonaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. Revista Colombiana de Entomología, v. 37, n. 2, p. 262-268.

Adams, R. P. (2007). **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. v. 456. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation.

Ahmad, N., Fazal, H., Abbasi BH, Rashid M, Mahmood T e Fatima N. (2010) **Efficient regeneration and antioxidant potential in regenerated-tissues of**

***Piper nigrum* L. Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.102, n. 1, p. 129–34,.

Alex, A. T., Joseph, A., Shavi, G., Rao, J. V., & Udupa, N. (2016). **Development and evaluation of carboplatin-loaded PCL nanoparticles for intranasal delivery**. *Drug delivery*, v. 23, n. 7, p. 2144-2153.

Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**, 2004, vol. 1, Maio, disponível em <http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf>, Acesso: 05/09/2019.

Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº 34**, 2010, Agosto. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_34_2010.pdf/0259adb1-e660-467c-be79. Acesso: 22/12/2019.

Aouada, A. F.; Pan, Z.; Chiou, B.; Orts, J. W.; Mattoso, C. H. L. (2009) **Emprego de isotermas de Langmuir e Freundlich no processo de adsorção de paraquat por hidrogéis de poli(acrilamida) e metilcelulose**. In: Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, São Carlos. Anais do V Workshop, São Carlos: Embrapa, Rede Agro Nano, v.5, p. 145-147.

Assis, L. M. D., Zavareze, E. D. R., Prentice-Hernández, C., & Souza-Soares, L. A. D. (2012). **Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods**. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 15, n. 2, p. 99-09.

Azarmi Sh., Huang Y., Chen H., Mcquarrie S., Abrams D., Roa W., Finlay Wh., Miller Gg., Löbenberg R. (2006). **Optimization of a two-step desolvation method for preparing gelatin nanoparticles and cell uptake studies in 143B osteosarcoma cancer cells**. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci*, v. 9, n. 1, p. 124-132.

Azevedo, S. G., Mar, J. M., da Silva, L. S., França, L. P., Machado, M. B., Tadei, W. P., & Sanches, E. A. (2018). **Bioactivity of Licariapuchury-major Essential Oil Against *Aedes aegypti*, *Tetranychusurticae* and *Cerataphislataniae***. *Records of Natural Products*, v.12, n. 3, p. 229-238.

Baia-da-Silva, D. C., Brito-Sousa, J. D., Rodovalho, S. R., Peterka, C., Moresco, G.,

Lapouble, O. M. M., & Lima, J. B. P. (2019). **Current vector control challenges in the fight against malaria in Brazil**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 52, p. 1-10.

Bejarano, J., Navarro-Marquez, M., Morales-Zavala, F., Morales, J. O., Garcia-Carvajal, I., Araya-Fuentes, E. & Kogan, M. J. (2018). **Nanoparticles for diagnosis and therapy of atherosclerosis and myocardial infarction: evolution toward prospective theranostic approaches**. *Theranostics*, v. 8, n. 17, p. 4710.

Bizerra, A., & Silva, V. (2016). **Sistemas de liberação controlada: Mecanismos e aplicações**. *Revista Saúde e Meio Ambiente*, v. 3, n. 2, p. 1-12.

Bounaas, K., Bouzidi, N., Daghbouche, Y., Garrigues, S., de laGuardia, M., & El Hattab, M. (2018). **Essential oil counterfeit identification through middle infrared spectroscopy**. *Microchemical Journal*, v. 139, p. 347–356.

Bourbon, A. I., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2016). **Encapsulation and controlled release of bioactive compounds in lactoferrin-glycomacropptide nanohydrogels: Curcumin and caffeine as model compounds**. *Journal of food engineering*, v. 180, p. 110-119.

Braz, A. R. P., Bringel, K. K. M. C., Oliveira, L. D. A. P., de Oliveira Filho, I. J. C., de Oliveira Trajano, I. L., Júnior, A. L. R. C., & de Oliveira, B. L. C. A. (2020). **Caracterização dos casos de malária na região extra amazônica brasileira entre 2012 a 2017**. *JMPHC| Journal of Management & Primary Health Care| ISSN 2179-6750*, v. 12, p. 1-15.

Bruschi, M. L. (2015) **Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems**, Ed. Elsevier/WoodheadPublishing, Cambridge, UK.

Carmo, D. D. G., Marsaro J, A. L., Costa, T. L., Farias, E., Ribeiro, A. V., & Picanço, M. C. (2017). **Toxicidade de inseticidas comerciais, por ação de contato, para *Apismellifera***. *Embrapa*, v. 13, p. 145-148

Carvalho, S. C. G. D., Martins Junior, A. D. J., Lima, J. B. P., & Valle, D. (2002). **Temperature influence on embryonic development of *Anopheles albitarsis* and *Anopheles aquasalis***. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 8, p. 1117-

1120.

Cepeda, Á. P. S, Graziano, R. V, Muñoz, E. D. J. P., Gómez, E. Y. P., Bernad-Bernad, M. J., & Cerda, A. Maciel. (2016). **Preparación y caracterización de membranas poliméricas electrohiladas de policaprolactona y quitosano para laliberación controlada de clorhidrato de tiamina**. *Cienciaen Desarrollo*, v. 7, n. 2, p. 133-151.

Chemspider, chemical structure database providing fast text and structure. Disponivelem <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure>. Acesso: 05/09/2019.

Chen, Q., Cao, X., Liu, H., Zhou, W., Qin, L., & An, Z. (2013). **pH-responsive high internal phase emulsions stabilized by core cross-linked star (CCS) polymers**. *Polymer Chemistry*, v. 4, n. 15, p. 4092-4102.

Cimino, A. M., Boyles, A. L., Thayer, K. A., & Perry, M. J. (2016). **Effects of neonicotinoid pesticide exposure on human health: a systematic review**. *Environmental health perspectives*, 125(2), 155-162.

Consoli R. A. G. B., Oliveira R. L. (1994) **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil Rio de Janeiro**, Editora da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Consoli, R. A., & Oliveira, R. L. D. (1994). **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 20^a Ed., Editora Fiocruz.

Coradi, P. C., Melo, E. D. C., & Rocha, R. P. D. (2014). **Evaluation of electrical conductivity as a quality parameter of lemongrass leaves (*Cymbopogon Citratus* Stapf) submitted to drying process**. *Drying Technology*, v. 32, n. 8, p. 969-980.

Da Silva, A. N., Dos Santos, C. C., Lacerda, R. N., Santa Rosa, E. P., De Souza, R. T., Galiza, D. & Póvoa, M. M. (2006). **Laboratory colonization of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) in Belém, Pará, Brazil**. *Journal of medical entomology*, v. 43, n. 1, p. 107-109.

De Oliveira, L. M., Silva, L. S., Mar, J. M., Azevedo, S. G., Rabelo, M. S., da

Fonseca Filho, H. D., ... & Sanches, E. A. (2019). **Alternative Biodefensive based on the Essential Oil from *Allium sativum* Encapsulated in PCL/Gelatin Nanoparticles**. Journal of Food Engineering and Technology, v.8, n. 2, p. 65-74.

Delancey, J. M., Cavazza, M. D., Rendos, M. G., Ulisse, C. J., Palumbo, S. G., & Mathers, R. T. (2011). **Controlling crosslinking in thermosets via chain transfer with monoterpenes**. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, v. 49, n. 17, p. 3719-3727.

Dipiro, J. T., Blouin, R., Pruemmer, J., & Spruill, W. (1996). **Concepts in Clinical Pharmacokinetics**. A self-instructional course. Editora ASHP. Inc. USA.

Dulmage, H. T., Correa, J. A., e Gallegos-Morales, G. (1990). **Potential for improved formulations of *Bacillus thuringiensis israelensis* through standardization and fermentation development**. In Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies. Springer, Dordrecht, v. 23, p. 110-133.

Dulmage, H. T., Yousten, A. A., Singer, S. L. L. A., & Lacey, L. A. (1990). **Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*** (No. TDR/BCV/90.1. Unpublished). Geneva: World Health Organization.

El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. A., Casabianca, H. & Elaissari, A. (2015). **Essential oils: from extraction to encapsulation**. *International journal of pharmaceutics*, v. 483, n. 2, p. 220-243.

Figueirêdo, F. J. C., Alves, S. D. M., Santos, A. S., & da Rocha Neto, O. G. (2004). **Rendimento e qualidade físico-química de óleo essencial extraído de diferentes composições de biomassa aérea de pimenta longa**. Embrapa Amazônia Oriental-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E).

Franco, N. A. (2013). **Nanopartículas e suas aplicações em Ciências Farmacêuticas**. Tese de doutorado, Universidade Fernando Pessoa, Porto.

Friedrich, R. B., Fontana, M. C., Beck, R. C. R., Pohlmann, A. R., e Guterres, S. S. (2008). **Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions**. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1131-1136.

Fu, Y., & Kao, W. J. (2010). **Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems.** *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 7, n. 4, p. 429–444.

Gharanjig, H., Gharanjig, K., Hosseinneshad, M., & Jafari, S. M. (2020). **Development and optimization of complex coacervates based on zedo gum, cress seed gum and gelatin.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 148, p. 31-40.

Ghasemishahrestani Z, Mehta M, Darne P, Yadav A, Ranade S. (2015) **Tunable synthesis of gelatin nanoparticles employing sophorolipid and plant extract, a promising drug carrier.** *World J Pharm Pharm Sci*, v. 4, n. 7, p. 1365–81.

Gorrasi, G., Attanasio, G., Izzo, L., & Sorrentino, A. (2017). **Controlled release mechanisms of sodium benzoate from a biodegradable polymer and halloysite nanotube composite.** *Polymer International*, v. 66, n. 5, p. 690-698.

Govindarajan, M., Rajeswary, M., Hoti, S. L., Bhattacharyya, A., & Benelli, G. (2016). **Eugenol, α -pinene and β -caryophyllene from *Plectranthus barbatus* essential oil as eco-friendly larvicides against malaria, dengue and Japanese encephalitis mosquito vectors.** *Parasitology Research*, v. 115, n. 2, p. 807-815.

Graziola, F., Candido, T. M., Oliveira, C. A. D., Peres, D. D. A., Issa, M. G., Mota, J., e Baby, A. R. (2016). **Gelatin-based microspheres crosslinked with glutaraldehyde and rutin oriented to cosmetics.** *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 52, n. 4, p. 603-612.

Han, Z., Zhuang, D., Yan, H., Zhao, H., Sun, B., Li, D., & Xiu, Y. (2017). **Thermogravimetric and kinetic analysis of thermal decomposition characteristics of microbial calcites induced by cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803.** *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 127, n. 2, p. 1371-1379.

Hao, C., Xia, Z., Fan, R., Tan, L., Hu, L., Wu, B., & Wu, H. (2016). **Transcriptome sequencing of black pepper (*Piper nigrum* L.) and an analysis of genes involved in**

phenylpropanoid metabolism in response to *Phytophthora capsici*. BMC genomics, v. 17, n. 1, p. 822.

Hirayama, F., e Uekama, K. (1999). **Cyclodextrin-based controlled drug release system**. Advanced drug delivery reviews, v. 36, n. 1, p. 125-141.

Houndété, T. A., Fournier, D., Ketoh, G. K., Glitho, I. A., Nauen, R., & Martin, T. (2010). **Biochemical determination of acetylcholinesterase genotypes conferring resistance to the organophosphate insecticide chlorpyrifos in field populations of *Bemisia tabaci* from Benin, West Africa**. Pesticidebiochemistryandphysiology, v. 98, n. 1, p. 115-120.

Inmetro, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia; **Análise dimensional de nanomateriais utilizando microscopia eletrônica**, 2017, Nota Técnica. Disponível em http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/pdf/Analise_dimensional_de_nanomateriais_utilizando_microscopia_eletronica_-_Nota_Tecnica.pdf. Acesso: 17/03/2019.

Jacob, J., Haponiuk, J. T., Thomas, S., & Gopi, S. (2018). **Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review**. Materials today chemistry, v. 9, p. 43-55.

Jeleń, H. H., & Gracka, A. (2015). **Analysis of black pepper volatiles by solid phase microextraction-gas chromatography: A comparison of terpenes profiles with hydrodistillation**. Journal of Chromatography A, v. 1418, p. 200-209.

Joliot, F. (1966). Nobel Lectures, Chemistry, 1922-1941.

Kaintura, R., Sharma, P., Singh, S., Rawat, K., & Solanki, P. R. (2015). **Gelatin nanoparticles as a delivery system for proteins**. Journal of Nanomedicine Research, v. 2, n. 1, p. 1-3.

Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., & Farokhzad, O. C. (2016). **Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release**. Chemical reviews, v. 116, n. 4, p. 2602-2663.

Kapoor, I. P. S., Singh, B., Singh, G., De Heluani, C. S., De Lampasona, M. P., e Catalan, C. A. (2009). **Chemistry and in vitro antioxidant activity of volatile oil and oleoresins of black pepper (*Piper nigrum*)**. Journal of agricultural and food chemistry, v. 57, n. 12, p. 5358-5364.

Karp, F.; Croteau, R. (1982)**Evidence that sabinene is an essential precursor of C (3)-oxygenated thujane monoterpenes**. Archives of biochemistry and biophysics, v. 216, n. 2, p. 616-624.

Khan, H., Shukla, R. N., & Bajpai, A. K. (2016). **Genipin-modified gelatin nanocarriers as swelling controlled drug delivery system for in vitro release of cytarabine**. Materials Science and Engineering, v. 61, p. 457-465.

Khan, S. A., e Schneider, M. (2013). **Improvement of nanoprecipitation technique for preparation of gelatin nanoparticles and potential macromolecular drug loading**. Macromolecular bioscience, v. 13, n. 4, p. 455-463.

Kirby, G. H., Harris, D. J., Li, Q., & Lewis, J. A. (2004). **Poly (acrylic acid)-poly (ethylene oxide) comb polymer effects on BaTiO₃ nanoparticle suspension stability**. Journal of the American Ceramic Society, v. 87, n. 2, p. 181-186.

Kohzaki, K., Gomi, K., Yamasaki-Kokudo, Y., Ozawa, R., Takabayashi, J., & Akimitsu, K. (2009). **Characterization of a sabinene synthase gene from rough lemon (*Citrus jambhiri*)**. Journal of plant physiology, v. 166, n. 15, p. 1700-704.

Kommareddy, S.; Shenoy, D. B. & Amiji, M. M. (2007)**Gelatin nanoparticles and their biofunctionalization. Nanotechnologies for the life sciences**. Editora Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, v. 1, ISBN: 35273138182007.

Krindges, A., Jahno, V. D., & Morisso, F. (2018). **Incorporation of micro/nanoparticles of PCL with essential oil of *Cymbopogon nardus* in bacterial cellulose**. International Journal of Advances in Medical Biotechnology-IJAMB, v. 1, n. 2, p. 37-43.

Kumar, A., & Dixit, C. K. (2017). **Methods for characterization of nanoparticles. In Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic**

Nucleic Acids, Woodhead Publishing, v. 1, ISBN: 9780081005637.

Kumar, C. S. (2005). **Biofunctionalization of nanomaterials. Biofunctionalization of Nanomaterials**, EditoraWiley-VCH, v. 37, ISBN 3527313818.

Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V., &Peppas, N. A. (2010). **Polymers for drug delivery systems**. Annual review of chemical and biomolecular engineering, v. 1, p. 149-173.

Lopes, C. M., Lobo, J. M. S., & Costa, P. (2005). **Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.41, n.2, p. 143-154.

Lu, G. W., & Gao, P. (2010). **Emulsions and microemulsions for topical and transdermal drug delivery**. In Handbook of non-invasive drug delivery systems., v. 1,ISBN 9780815520252.

Madkhali, O., Mekhail, G. &Wettig, S. D. (2018). **Modified gelatin nanoparticles for gene delivery**. Internationaljournalofpharmaceutics,v. 554, p. 224-234.

Manadas, R., Pina, M. E., & Veiga, F. (2002). **A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 38, n. 4, p. 375-399.

Manion, C. R., &Widder, R. M. (2017). **Essentials of essential oils**. **American Journal of Health System Pharmacy**, v. 74, n. 9, p. e153-e162.

Mar, J. M., Silva, L. S., Azevedo, S. G., França, L. P., Goes, A. F., dos Santos, A. L., & Sanches, E. A. (2018). **Lippia organoides essential oil: An efficient alternative to control Aedes aegypti, Tetranychusurticae and Cerataphislataniae**. Industrial crops and products, v. 111, p. 292-297.

Ministério da Saúde (Brasil). **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

Model, K. J., Sampaio, S. C., Remor, M. B., Mercante, E., & Boas, M. A. V. (2018).

Organoclorated and organophosphorus pesticides in the Pelotas river sediment. *Engenharia Agrícola*, v. 38, n. 1, p. 124-134.

Mohammed, G. J., Omran, A. M., & Hussein, H. M. (2016). **Antibacterial and Phytochemical Analysis of *Piper nigrum* using Gas Chromatography-Mass Spectrum and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy.** *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, v. 8, n. 6, p. 977-996.

Montanari, R. M., Barbosa, L. C., Demuner, A. J., Silva, C. J., Carvalho, L. S., & Andrade, N. J. (2011). **Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from Verbenaceae species: Alternative sources of (E)-caryophyllene and germacrene-D.** *Química Nova*, v. 34, n. 9, p. 1550-1555.

Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). **Polymer-based nanocapsules for drug delivery.** *International journal of pharmaceutics*, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.

Morán, M. C., Forniés, I., Ruano, G., Busquets, M. A., & Vinardell, M. P. (2017). **Efficient encapsulation and release of RNA molecules from gelatin-based nanoparticles.** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 516, p. 226-237.

Mozafari M R, Flanagan J, Matia-Merino L, Awati A, Omri A, Suntres Z E and Singh H, (2006) **Recent trends in the lipid based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods**, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 86, n. 13, p. 2038–2045.

Nararak, J., Sathantriphop, S., Kongmee, M., Mahiou-Leddert, V., Ollivier, E., Manguin, S., & Chareonviriyaphap, T. (2019). **Excito-repellent activity of β -caryophyllene oxide against *Aedes aegypti* and *Anopheles minimus*.** *Acta Tropica*, v. 197, p. 105.

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Database.** **CID=12304570**, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12304570> Acesso: 23/10/2018.

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Database.** CID=443314, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/443314#section=Top>. SPAN60 Acesso: 23/10/2018.

National Center for Biotechnology Information. **PubChemDatabase.** CID=19726130, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10401#section=Top>. PC L. Acesso: 23/10/2018.

Ong, S. G. M., Ming, L. C., Lee, K. S., & Yuen, K. H. (2016). **Influence of the encapsulation efficiency and size of liposome on the oral bioavailability of griseofulvin-loaded liposomes.** *Pharmaceutics*, v. 8, n. 3, p. 24-25.

Paulkumar, K., Gnanajobitha, G., Vanaja, M., Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., Pandian, K., & Annadurai, G. (2014). **Piper nigrum leaf and stem assisted green synthesis of silver nanoparticles and evaluation of its antibacterial activity against agricultural plant pathogens.** *The Scientific World Journal*, v. 16, n. 6, p. 2789-2796.

Pereira, K. L., Rovelli, G., Song, Y. C., Mayhew, A., Reid, J. P., & Hamilton, J. F. (2019). **A new aerosol flow reactor to study secondary organic aerosol.** *Atmospheric Measurement Techniques*, v. 12, n. 8, p. 4519-4541.

Pires, V. C. (2019.) **Avaliação do potencial larvicida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e sua formulação em nanocápsulas poliméricas.** Dissertação de mestrado. Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ.

Ramos, O. L., Pereira, R. N., Cerqueria, M. A., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2019). **Advances in Processing Technologies for Bio-based Nanosystems in Food**, v. 1, p. 27-29.

Rangelov, A., Arnaudov, L., Stoyanov, S., & Spassov, T. (2017). **Gelatinization of industrial starches studied by DSC and TG.** *Bulg Chem Commun*, v. 49, p. 422-429.

Ray, S., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2016). **An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology.** *Food Bioscience*, v. 13, p. 76-83.

Risch, S. J., & Reineccius, G. A. (1995). **Encapsulation and controlled release of food ingredients**. ACS Symposium Series 590.

Sampaio, V. S., Beltrán, T. P., Kobylinski, K. C., Melo, G. C., Lima, J. B. P., Silva, S. G. M., & Monteiro, W. M. (2016). **Filling gaps on ivermectin knowledge: effects on the survival and reproduction of *Anopheles aquasalis*, a Latin American malaria vector**. Malaria Journal, v. 15, n. 1, p. 438-452.

Sanguansri P and Augustin M A, (2006) **Nanoscale materials development— a food industry perspective**, Trends in Food Science and Technology, v. 17, n. 10, p. 547–556.

Santa, C. F., & López Osorio, B. L. (2013). **Materiales poliméricos en nanomedicina: transporte y liberación controlada de fármacos**. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, v. 37, n. 142, p. 115-124.

Sarkar, J. D. & Singh, A. (2017). **Base triggered release of insecticide from bentonite reinforced citric acid crosslinked carboxymethyl cellulose hydrogel composites**. Carbohydrate Polymers. Oxford, v. 156, p. 303-311.

Schaffazick, S. R., Pohlmann, A. R., Freitas, L. D. L., & Guterres, S. S. (2002). **Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco**. Acta Farm. Bonaerense, v. 21, n. 2, p. 99-106.

Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. et al. (2012), **Fiji: an open-source platform for biological-image analysis**, Nature methods. 676-682, PMID 22743772, doi:10.1038/nmeth.2019

Schulz, H., & Baranska, M. (2017). **Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy**. Vibrational Spectroscopy, v. 43, n. 1, p. 13-25.

Siepmann J, Peppas NA. Higuchi (2011). **Equation: Derivation, applications, use and misuse**. Int J Pharm, v. 418, n. 1, p. 6–12.

Silva, G. R. D. (2015). **Estudo de formação e estabilidade de nanopartículas de poliácido láctico para liberação controlada do óleo essencial de *Shinusmolle* L**, Tese de doutorado, Universidade de São Paulo.

Silva, L. S., Mar, J. M., Azevedo, S. G., Rabelo, M. S., Bezerra, J. A., Campelo, P. H. & de Souza, T. P. (2019). **Encapsulation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* essential oils in gelatin nanoparticles: a possible sustainable control tool of *Aedes aegypti*, *Tetranychusurticae* and *Cerataphislataniae***. Journal of the science of food and agriculture, v. 99, n. 2, p. 685-695.

Simma, E. A., Dermauw, W., Balabanidou, V., Snoeck, S., Bryon, A., Clark, R. M., & Van Leeuwen, T. (2019). **Genome wide gene expression profiling reveals that cuticle alterations and P450 detoxification are associated with deltamethrin and DDT resistance in *Anopheles arabiensis* populations from Ethiopia**. Pest management science, v. 75, n. 7, p. 1808-1818.

Snehalatha, M., Venugopal, K., e Saha, R. N. (2008). **Etoposide-loaded PLGA and PCL nanoparticles I: preparation and effect of formulation variables**. Drug Delivery, v.15, n. 5, p. 267-275.

Snima, K. S., Arunkumar, P., Jayakumar, R., & Lakshmanan, V. K. (2014). **Silymarin encapsulated poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: a prospective candidate for prostate cancer therapy**. Journalofbiomedicalnanotechnology, v. 10, n. 4, p. 559-570.

Souza, A., Taborda, E., Alencar, J., Fernandes, K. C., Lima, L., Ribeiro, M. R., & dos Santos, F. A. L. (2017). **Situação Epidemiológica da Malária no Brasil**. Univag, v.2, p.35-38.

Souza, T. M. H. D. (2019). **Comparação de dois métodos para avaliação de resistência a inseticidas usados para *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* pelo Programa de Controle de Malária do município de Cruzeiro do Sul-Acre**. Dissertação de mestrado, Rio Branco, AC.

Suleman, S., Tufa, T. B., Kebebe, D., Belew, S., Mekonnen, Y., Gashe, F., & De

Spiegeleer, B. (2018). **Treatment of malaria and related symptoms using traditional herbal medicine in Ethiopia.** Journal of ethnopharmacology, v. 213, p. 262-279.

Swathy, J. S., Mishra, P., Thomas, J., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2018). **Antimicrobial potency of high-energy emulsified black pepper oil nanoemulsion against aquaculture pathogen.** Aquaculture, v.491, p. 210-220.

Talukdar, P., Mandal, S.&Ganguly, D. (2017). **Development of bio-larvicide for *Anopheles stephensi* through selected phytoligands from the leaf of *Eucalyptus grandis* against mosquito acetylcholinesterase: An in silico approach.** International Journal of Advanced Research in Computer Science, v.8, n.5, p. 1078–1088.

Tisserand, R; Young, R. (2013) **Essential Oil Safety-E-Book: A Guide for Health Care Professionals.** Ed. Elsevier Health Sciences.

Ummadi, S., Shravani, B., Rao, N. R., Reddy, M. S., e Sanjeev, B. (2013). **Overview on controlled release dosage form.** System. v 3, n. 4. P. 258-269.

Van Den Dool, H.; Kratz, P. D. (1963.). **A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography.** Journal of Chromatography A, v. 11, p. 463-471.

Venkatesan, J., Anil, S., & Kim, S. K. (2017). **Seaweed polysaccharides: Isolation, biological and biomedical applications.** Ed. Elsevier.

Wang, C. F., Yang, K., Zhang, H. M., Cao, J., Fang, R., Liu, Z. L., ... & Zhou, L. (2011). **Components and insecticidal activity against the maize weevils of *Zanthoxylum schinifolium* fruits and leaves** Molecules, v. 16, n.4, p. 3077-3088.

WHO. **Expert Committee on Biological Standardization.** (2004). Fifty-third report (Nº. 926).

WHO. **World Malaria Report** (2018). Geneva: World Health Organization. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.

Williams, J. (2013) **Manual de Entomologia da Malária Para Técnicos de**

Entomologia e Controle de Vetores (Nível Básico). 1ª Ed., Agência dos Estados Unidos para o Desenvolvimento Internacional (USAID).

Xu, Y., Qin, J., Wang, P., Li, Q., Yu, S., Zhang, Y., & Wang, Y. (2020). **Chemical composition and larvicidal activities of essential oil of *Cinnamomum camphora* (L.) leaf against *Anopheles stephensi*.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 53 n. 1-5.

Yasmin, R., Shah, M., Khan, S. A., & Ali, R. (2017). **Gelatin nanoparticles: Apotential candidate for medical applications.** Nanotechnology Reviews, v 6, n. 2, p. 191-207.

Yu, K. X., Wong, C. L., Ahmad, R., & Jantan, I. (2015). **Mosquitocidal and oviposition repellent activities of the extracts of seaweed *Bryopsis pennata* on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*.** Molecules, v. 20 n. 8, p. 14082-14102.