

Juliana da Silva Zanatta

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA E REPELENTE DO
ÓLEO DE CRAVO (*Syzygium aromaticum*) EM DIFERENTES
SISTEMAS DE NANOENCAPSULAÇÃO**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique
Hermes de Araújo

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Claudia
Sayer

Coorientador: Prof. Dr. Carlos José
de Carvalho Pinto

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

Zanatta, Juliana da Silva

Avaliação da Atividade Larvicida e Repelente do Óleo de Cravo (*Syzygium aromaticum*) em Diferentes Sistemas de Nanoencapsulação ; Juliana da Silva Zanatta ; orientador, Pedro Henrique Hermes de Araújo ; coorientadora, Claudia Sayer ; coorientador, Carlos José de Carvalho Pinto – Florianópolis, SC, 2017.

102 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Nanoencapsulação. 3. Óleo de cravo (*Syzygium aromaticum*). 4. Atividade larvicida e repelente. 5. *Aedes albopictus*. I. de Araújo, Pedro Henrique Hermes. II. Sayer, Claudia. III. de Carlos Pinto, Carlos José. IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

Juliana da Silva Zanatta

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA E REPELENTE DO
ÓLEO DE CRAVO (*Syzygium aromaticum*) EM DIFERENTES
SISTEMAS DE NANOENCAPSULAÇÃO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração **em Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 14 de Setembro de 2017.

Prof. Cíntia Soares, Dr.^a
Coordenadora do Curso

Prof. Pedro Henrique Hermes de Araújo, Dr.
Orientador

Prof.^a Claudia Sayer, Dr.^a
Coorientadora

Prof. Carlos José de Carvalho Pinto, Dr.
Coorientador

Banca Examinadora:

Prof. Carlos Brisola Marcondes, Dr.

Prof.^a Débora de Oliveira, Dr.^a

Aos meus queridos pais, meus maiores
exemplos de vida e amor
incondicional.

Minha eterna gratidão♥

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e ao Universo pela minha existência, e ao meu Anjo da Guarda por sempre me acompanhar.

Aos meus pais biológicos José e Julieta *in memoriam* por me trazerem à vida e por iluminarem os meus passos de onde quer que estejam.

Agradeço infinitamente aos meus pais de coração Olindo e Iraídes por me permitirem fazer parte de suas vidas, por me ensinarem o que é o amor incondicional todos os dias, por fazerem dos meus sonhos os seus, por sempre estarem ao meu lado e nunca me deixarem desistir.

A toda minha família, por me acolher, me amar, me apoiar e sempre me fazer seguir em frente, por me mostrar que nunca estamos sozinhos e sempre temos com quem contar mesmo nos dias mais difíceis.

Aos meus orientadores Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo e Dr^a. Claudia Sayer pela oportunidade, pelos ensinamentos, amizade e confiança. Ao Dr. Carlos José de Carvalho Pinto por abrir as portas do Departamento de Microbiologia Imunologia e Parasitologia (MIP) da UFSC para a realização deste trabalho, pela paciência e contribuição.

A Dr^a. Débora de Oliveira por sua participação ativa em todas as etapas e por tornar meu mestrado mais alegre.

Ao aluno de Iniciação Científica Marcos Adriano Ribeiro Pires pela dedicação e ajuda na parte biológica do meu trabalho.

Aos meus amigos e colegas do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos (EQA) por toda ajuda e por fazerem dos meus dias mais divertidos.

Aos laboratórios: Laboratório de Controle e Processos de Polimerização (LCP), Laboratório de Transmissores de Hematozoários (LTH), Laboratório de Transferência de Massa (LabMASSA), Laboratório de Engenharia Bioquímica (Engebio), Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME).

A Fiocruz pelo fornecimento de ovos de *Aedes albopictus*.

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química por todos os recursos disponibilizados.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*“Todos os seus sonhos podem se tornar realidade
se você tiver coragem para persegui-los.”*

Walt Disney

RESUMO

Os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* são considerados os principais agentes causadores de doenças como dengue, febre amarela, Zika vírus e Chikungunya e são os responsáveis pela morte de milhões de pessoas no mundo inteiro. Assim, formas eficientes de combate a esses mosquitos precisam ser encontradas uma vez que o uso de repelentes sintéticos pode causar problemas tanto para os seres humanos, como para o meio ambiente, desta forma, é de extrema importância o desenvolvimento de novos produtos. O óleo de cravo (*Syzygium aromaticum*) é conhecido por apresentar diferentes propriedades como antioxidante, antimicrobiana, larvicida, repelente entre outras. Sua composição química é constituída principalmente de eugenol, que apresenta anel aromático, hidroxila e hidrocarbonetos em sua estrutura. Devido sua natureza hidrofóbica, torna-se difícil sua incorporação em sistemas aquosos limitando seu uso na forma livre, assim a técnica de encapsulação vem como solução para este problema. Neste trabalho o óleo de cravo foi encapsulado através da técnica de miniemulsificação e polimerização em miniemulsão. As concentrações letais CL_{50} e CL_{90} do óleo de cravo autoemulsificado e do óleo de cravo em sistema de nanoemulsão foram determinadas em mosquitos da espécie *Aedes albopictus* em 24 e 48 horas de exposição. O óleo de cravo autoemulsificado apresentou valores de $CL_{50} 60,0 \pm 3,5$ ppm e $CL_{90} 88,5 \pm 6,1$ ppm em 24 horas e $CL_{50} 53,7 \pm 3,1$ ppm e $CL_{90} 75,4 \pm 5,4$ ppm em 48 horas de exposição. A nanoemulsão carregada com óleo de cravo apresentou valores de $CL_{50} 99,6 \pm 4,2$ ppm e $CL_{90} 152,1 \pm 10,4$ ppm em 24 horas e $CL_{50} 87,3 \pm 3,8$ ppm e $CL_{90} 139,5 \pm 10,0$ ppm em 48 horas de exposição. Um teste de eficiência da atividade larvicida ao longo do tempo foi realizado, o óleo de cravo autoemulsificado foi eficiente aproximadamente 100 % durante 13 dias e o óleo em sistema de nanoemulsão apresentou a mesma eficiência durante 12 dias. O látex com nanopartículas de óleo de cravo obtido por polimerização em miniemulsão foi impregnado em substrato têxtil de algodão e sua atividade repelente foi avaliada. Após 2 semanas de impregnação, o substrato apresentou um índice de repelência inferior a 20 %.

Palavras-chave: Óleo de cravo. Encapsulação. *Aedes albopictus*.

ABSTRACT

Aedes aegypti and *Aedes albopictus* mosquitoes are considered the main agents causing diseases such as dengue, yellow fever, Zika virus and Chikungunya and are responsible for the deaths of millions of people worldwide. Thus, efficient ways to combat these mosquitoes need to be found since the use of synthetic repellents can cause problems for both humans and the environment, so developing new products is of the utmost importance. Clove oil (*Syzygium aromaticum*) is known to have different properties like antioxidant, antimicrobial, larvicide, repellent among others. Its chemical composition consists mainly of eugenol, which presents aromatic ring, hydroxyl and hydrocarbons in its structure. Due to its hydrophobic nature, it becomes difficult to incorporate it into aqueous systems by limiting its use in free form, so the encapsulation technique comes as a solution to this problem. In this work the clove oil was encapsulated through the technique of miniemulsification and miniemulsion polymerization. The lethal concentrations LC₅₀ and LC₉₀ of self-emulsifying clove oil and clove oil in a nanoemulsion system were determined in *Aedes albopictus* mosquitoes at 24 and 48 hours of exposure. The self-emulsifying clove oil presented values of LC₅₀ 60.0 ± 3.5 ppm and LC₉₀ 88.5 ± 6.1 ppm in 24 hours and LC₅₀ 53.7 ± 3.1 ppm and LC₉₀ 75.4 ± 5.4 ppm in 48 hours of exposure. The clove oil-loaded nanoemulsion presented values of LC₅₀ 99.6 ± 4.2 ppm and LC₉₀ 152.1 ± 10.4 ppm in 24 hours and LC₅₀ 87.3 ± 3.8 ppm and LC₉₀ 139.5 ± 10.0 ppm in 48 hours of exposure. A test of efficiency of larvicidal activity over time was performed, self-emulsifying clove oil was approximately 100% efficient for 13 days and the oil in the nanoemulsion system showed the same efficiency for 12 days. Latex with clove oil nanoparticles obtained by miniemulsion polymerization was impregnated in cotton textile substrate and its repellent activity was evaluated. After 2 weeks of impregnation, the substrate showed a repellency index less than 20 %.

Keywords: Clove oil. Encapsulation. *Aedes albopictus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Aedes aegypti</i>	31
Figura 2 – <i>Aedes albopictus</i>	32
Figura 3 – Tórax de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	34
Figura 4 – Ciclo de vida dos mosquitos <i>Aedes</i>	34
Figura 5 – Ovos de <i>Aedes albopictus</i> depositados em papel filtro	35
Figura 6 – Larva do mosquito <i>Aedes albopictus</i>	36
Figura 7 – Pupas do mosquito <i>Aedes albopictus</i>	36
Figura 8 – Estrutura química do eugenol	39
Figura 9 – Esquema de preparo de nanoemulsão utilizando método de alta energia	41
Figura 10 – Esquema da coalescência	43
Figura 11 – Esquema da degradação difusional	43
Figura 12 – Esquema do processo de miniemulsão	44
Figura 13 – (a) Armadilha para deposição de ovos e (b) ovos de <i>Aedes albopictus</i> em microscópio	50
Figura 14 – (a) Aparato para coleta de mosquitos. (b) Mosquito <i>Aedes albopictus</i> identificado em microscópio. (c) Gaiola para criação	51
Figura 15 – (a) Ovos fornecidos pela Fiocruz e (b) criação de larvas ...	52
Figura 16 – Nanogotas carregadas com óleo de cravo. (a) Nanoemulsão em fundo escuro e (b) nanoemulsão em fundo verde	56
Figura 17 – Mortalidade das larvas de <i>Aedes albopictus</i> nos tempos de 24 e 48 horas de exposição em função das concentrações testadas de óleo de cravo autoemulsificado	57
Figura 18 – Comportamento sigmoidal da atividade larvicida do óleo de cravo	59
Figura 19 – Mortalidade das larvas de <i>Aedes albopictus</i> nos tempos de 24 e 48 horas de exposição em função das concentrações de óleo de cravo testadas em sistema de nanoemulsão	60
Figura 20 – Esquema do procedimento de polimerização em miniemulsão repelência	70
Figura 21 – Tecido 100 % algodão confeccionado para teste de repelência	74
Figura 22 – Equipamentos utilizados no processo de purga. (a) Canecos e (b) banho de canecos.	74
Figura 23 – Equipamentos utilizados no processo de impregnação. (a) Foulard e (b) rama	75
Figura 24 – (a) Aparato para realização do teste de repelência e (b) tecido para teste	77

Figura 25 – Conversão dos monômeros em polímeros através de reação de polimerização em miniemulsão à 70 °C por 6 horas.....	78
Figura 26 – Nanopartículas carregadas com óleo de cravo.(a) Látex em fundo escuro e (b) látex em fundo verde.....	80
Figura 27 – Espectros de FTIR obtidos. (a) Espectro do poliestireno e poliácrlato de butila. (b) Espectro do óleo de cravo. (c) Espectro do poliestireno, poliácrlato de butila e óleo de cravo.....	81
Figura 28 – Micrografias dos tecidos de algodão sem tratamento e com nanopartículas de óleo de cravo. (a) e (c) Tecidos de algodão sem tratamento nas magnificações de 500 e 2000x. (b) e (d) Tecidos de algodão impregnados com nanopartículas de óleo de cravo com magnificações de 500 e 2000x.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise estatística da mortalidade das larvas de <i>Aedes albopictus</i> em função da concentração de óleo de cravo autoemulsificado.....	58
Tabela 2 – Análise estatística da mortalidade das larvas de <i>Aedes albopictus</i> em função da concentração de óleo de cravo na nanoemulsão.....	61
Tabela 3 – Análise estatística comparando as mortalidades das larvas de <i>Aedes albopictus</i> com óleo de cravo autoemulsificado e em nanoemulsão em função da concentração no tempo de 24 horas	63
Tabela 4 – Análise estatística comparando as concentrações letais em função das mortalidades do óleo de cravo autoemulsificado e em nanoemulsão nos tempos de 24 e 48 horas em larvas de <i>Aedes albopictus</i>	64
Tabela 5 – Eficiência da atividade larvicida do óleo de cravo autoemulsificado e em nanoemulsão ao longo do tempo em <i>Aedes albopictus</i>	65
Tabela 6 – Formulações dos látices obtidos via polimerização em miniemulsão a 70 °C durante 6 horas de reação. Formulações com 25 % de teor de sólidos e 10 % de óleo de cravo em relação à massa total de reagentes.....	71
Tabela 7 – Condições do processo de impregnação dos tecidos	75
Tabela 8 – Tamanho de partícula (Dp), dispersão (PDI) e eficiência de encapsulação (EE) dos látices obtidos por miniemulsão utilizando diferentes monômeros	79
Tabela 9 – Peso molecular numérico médio e ponderal dos polímeros obtidos via miniemulsão.....	80
Tabela 10 – Média de mosquitos repelidos e índice de repelência dos substratos têxteis avaliados em <i>Aedes albopictus</i>	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O – Água em óleo
Abs – Absorbância
AIBN – Azobisisobutironitrila
BuA – Acrilato de butila
CCB – Centro de Ciências Biológicas
CL₅₀ - Concentração letal que mata 50 %
CL₉₀ - Concentração letal que mata 90 %
DEET – N,N'-Diethyl-3-methylbenzamide
DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz
DMSO – Dimetilsulfóxido
EE – Eficiência de encapsulação
FDA – United States Food and Drug Administration
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
FTIR – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
GC/MS – Cromatografia gasosa com detector de massas
GPC – Cromatografia de Permeação em Gel
L1 – Larvas no primeiro estágio de desenvolvimento
L2 – Larvas no segundo estágio de desenvolvimento
L3 – Larvas no terceiro estágio de desenvolvimento
L4 – Larvas no quarto estágio de desenvolvimento
LAMEB – Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LCP – Laboratório de Controle e Processos de Polimerização
LTH – Laboratório de Transmissores de Hematozoários
mg - Miligramas
MIP – Microbiologia Imunologia e Parasitologia
Nano – Nanoemulsão carregada com óleo de cravo
NOSMOVE – Núcleo Operacional Sentinela de Mosquitos Vetores
O/A – Óleo em água
OC – Óleo de cravo
OMS – Organização Mundial da Saúde
PDI – Índice de polidispersão
pH – Potencial hidrogeniônico
ppm – Partes por milhão
rpm – Rotação por minuto
SLS - Lauril sulfato de sódio
Sty – Estireno
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
UV- vis – Espectrofotometria por Ultravioleta-visível

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

Dp – Diâmetro médio das partículas

KBr – Brometo de potássio

kDa – Kilodalton

Na₂CO₃ – Carbonato de sódio

nm - Nanômetro

°C – Graus Celsius

p – Probabilidade de significância

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	27
1 INTRODUÇÃO.....	27
1.1 OBJETIVOS	28
1.1.1 Objetivo geral.....	28
1.1.2 Objetivos específicos	28
CAPÍTULO II	31
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR VETORES	31
2.1.1 <i>Aedes aegypti</i>	31
2.1.2 <i>Aedes albopictus</i>	32
2.1.3 Dengue	32
2.1.4 Febre amarela	33
2.1.5 Zika vírus.....	33
2.1.6 Chikungunya	33
2.2 CARACTERÍSTICAS DOS MOSQUITOS <i>Aedes</i>	33
2.2.1 Ciclo do vida.....	34
2.2.2 Ovos.....	35
2.2.3 Larvas	35
2.2.4 Pupas.....	36
2.2.5 Mosquito adulto	37
2.3 MECANISMOS DE CONTROLE VETORIAL	37
2.3.1 Óleos essenciais	37
2.3.2 Óleo de cravo.....	38
2.3.3 Mecanismo de ação dos óleos essenciais.....	39
2.4 NANOTECNOLOGIA	40
2.4.1 Encapsulação de óleos essenciais	40
2.4.2 Nanoemulsões	40
2.4.3 Nanopartículas poliméricas.....	41
2.4.4 Polimerização via miniemulsão	42
2.4.4.1 Polimerização em miniemulsão via radicais livres.....	44
2.4.5 Impregnação de nanopartículas poliméricas em substrato têxtil.....	45
CAPÍTULO III.....	47
3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO DE CRAVO (<i>Syzygium aromaticum</i>) AUTOEMULSIFICADO E PELA TÉCNICA DE MINIEMULSIFICAÇÃO EM <i>Aedes albopictus</i>.....	47
3.1 INTRODUÇÃO	47

3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.2.1	Reagentes	47
3.2.2	Preparo da nanoemulsão carregada com óleo de cravo pela técnica de miniemulsificação	48
3.2.2.1	Nanoemulsão branco	48
3.2.2.2	Nanoemulsão com óleo de cravo e corante fluorescente	48
3.2.3	Medidas de tamanho de gota.....	49
3.2.4	Dispersão padrão de óleo de cravo	49
3.2.4.1	Dispersão branco.....	49
3.2.5	Criação de <i>Aedes albopictus</i>	49
3.2.5.1	Armadilha para deposição de ovos.....	50
3.2.5.2	Coleta e identificação de mosquitos.....	50
3.2.5.3	Complementação da criação	51
3.2.6	Ensaio larvicida	52
3.2.6.1	Determinação da CL ₅₀ e CL ₉₀ do óleo de cravo autoemulsificado	53
3.2.6.2	Determinação da CL ₅₀ e CL ₉₀ da nanoemulsão de óleo de cravo.....	53
3.2.7	Eficiência da atividade larvicida ao longo do tempo.....	54
3.2.8	Análise de espectrofotometria UV-vis	55
3.2.9	Análise estatística	55
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.3.1	Visualização das nanogotas de óleo de cravo com corante fluorescente	56
3.3.2	Concentrações letais do óleo de cravo	57
3.3.2.1	Análise estatística.....	58
3.3.2.2	Análise Probit.....	59
3.3.3	Concentrações letais da nanoemulsão carregada com óleo de cravo..	60
3.3.3.1	Análise estatística.....	61
3.3.3.2	Análise Probit.....	62
3.3.4	Comparação das mortalidades obtidas com o óleo de cravo autoemulsificado e em nanoemulsão	62
3.3.4.1	Comparação das concentrações letais do óleo de cravo autoemulsificado e em sistema de nanoemulsão	64
3.3.5	Eficiência da atividade larvicida ao longo do tempo.....	64
3.3.5.1	Óleo de cravo residual.....	67
3.4	CONCLUSÕES	67
	CAPÍTULO IV	69

4	DESENVOLVIMENTO DE LÁTEX POLIMÉRICO COM IMPREGNAÇÃO EM SUBSTRATO TÊXTIL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REPELENTE EM <i>Aedes albopictus</i>	69
4.1	INTRODUÇÃO.....	69
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	69
4.2.1	Reagentes.....	69
4.2.2	Dispersão padrão de óleo de cravo.....	69
4.2.3	Polimerização via miniemulsão.....	70
4.3	CARACTERIZAÇÃO.....	71
4.3.1	Conversão gravimétrica.....	71
4.3.2	Tamanho médio de partículas.....	71
4.3.3	Eficiência de encapsulação (EE).....	71
4.3.4	Látex com corante fluorescente.....	72
4.3.5	Cromatografia de permeação em gel (GPC).....	72
4.3.6	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	73
4.3.7	Teor de gel.....	73
4.4	SUBSTRATO TÊXTIL PARA IMPREGNAÇÃO EM FOULARD.....	73
4.4.1	Purga.....	74
4.4.1.1	Impregnação em Foulard.....	75
4.4.1.2	Pick-up.....	76
4.4.1.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	76
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REPELENTE EM <i>Aedes albopictus</i>	76
4.5.1	Substratos avaliados no teste de repelência.....	76
4.5.1.1	Teste de repelência.....	77
4.6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
4.6.1	Conversão dos monômeros em polímeros.....	78
4.6.2	Diâmetro de partícula (Dp), estabilidade e eficiência de encapsulação (EE).....	79
4.6.3	Nanopartículas poliméricas fluorescentes.....	79
4.6.4	Cromatografia de permeação em gel (GPC).....	80
4.6.5	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	81
4.6.6	Teor de gel.....	82
4.6.7	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	82
4.6.8	Atividade repelente em <i>Aedes albopictus</i>.....	84
	CAPÍTULO V.....	89

5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
5.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	90
	CAPÍTULO VI	91
6	REFERÊNCIAS.....	91
	APÊNDICE A.....	101

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

Métodos eficazes na prevenção de picada dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* precisam ser encontrados, uma vez que estes são potenciais agentes causadores de doenças tropicais, como a febre amarela, dengue, Chikungunya e Zika vírus e afetam milhões de pessoas no mundo inteiro. O uso de repelentes sintéticos pode causar problemas tanto para os seres humanos, como para o meio ambiente. Além disso, algumas espécies de mosquitos têm apresentado resistência a esta classe de repelentes, desta forma, é de extrema importância o constante desenvolvimento de novos repelentes.

Os inseticidas naturais derivados de óleos essenciais se apresentam como alternativa por serem eficazes e ambientalmente amigáveis. Entre eles, o óleo de cravo é conhecido por apresentar um amplo espectro de ação, desde antimicrobiano a larvicida e repelente. Devido sua natureza hidrofóbica, torna-se difícil sua incorporação em produtos ou matrizes e a técnica de encapsulação vem como solução para este problema.

Com o óleo de cravo encapsulado em sistemas nanoparticulados, este pode ser utilizado como larvicida frente as larvas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em diferentes recipientes, que vão desde pratos de plantas contendo água até caixas d'água. Também, de forma inovadora, pode-se utilizar o óleo encapsulado em formulações de repelentes para incorporação em substrato têxtil como tecidos de algodão e sua avaliação contra picadas de mosquito.

Com a encapsulação do óleo de cravo, este será liberado lentamente no ambiente proporcionando sua ação larvicida e repelente ao longo do tempo, o que é positivo, uma vez que larvas e mosquitos estão em constante desenvolvimento e reprodução. Neste contexto, o presente trabalho aborda a encapsulação do óleo de cravo (*Syzygium aromaticum*) pelas técnicas de miniemulsificação com posterior aplicação larvicida e a técnica de polimerização em miniemulsão para obtenção de látex polimérico e sua impregnação em tecido de algodão para avaliação da atividade repelente em *Ae. albopictus*. Na literatura não são encontrados trabalhos que avaliaram as atividades larvicida e repelente do óleo de cravo em diferentes sistemas de nanoencapsulação utilizando *Ae. albopictus*, desta forma, este trabalho pode ser considerado inédito.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade larvicida e repelente do óleo de cravo encapsulado através das técnicas de miniemulsificação (nanoemulsão) e polimerização em miniemulsão.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar as concentrações letais CL_{50} e CL_{90} do óleo de cravo autoemulsificado em *Aedes albopictus* e compará-las com os valores obtidos para a nanoemulsão carregada com o óleo essencial.
- Monitorar a atividade larvicida da nanoemulsão ao longo do tempo e comparar com o óleo autoemulsificado.
- Desenvolver um látex polimérico com óleo de cravo encapsulado via polimerização em miniemulsão.
- Caracterizar o látex carregado com óleo de cravo no que se refere ao tamanho de partícula, eficiência de encapsulação e estabilidade sob armazenagem.
- Caracterizar o polímero obtido via polimerização em miniemulsão em relação as massas molares, teor de gel e conversão utilizando diferentes monômeros (estireno e acrilato de butila).
- Avaliar ao longo do tempo a atividade repelente dos tecidos impregnados com o látex e comparar os resultados obtidos com o óleo não encapsulado.

1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO

Este trabalho foi dividido em seis capítulos para facilitar o entendimento. No Capítulo I são apresentados uma breve introdução e os objetivos desta dissertação. O capítulo II compreende a fundamentação teórica necessária para o desenvolvimento do trabalho. O Capítulo III aborda o desenvolvimento da nanoemulsão carregada com óleo de cravo e sua aplicação como larvicida. O Capítulo IV expõe a síntese do látex carregado com óleo de cravo através de polimerização em miniemulsão, assim como, a caracterização dos polímeros obtidos, a metodologia de impregnação do látex em tecidos de algodão e sua

aplicação como repelente. O Capítulo V relata as considerações finais do trabalho e o Capítulo VI apresenta as referências bibliográficas utilizadas nesta dissertação.

CAPÍTULO II

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR VETORES

Doenças tropicais como febre amarela, dengue, Zika vírus e Chikungunya são transmitidas por dois vetores principais, os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Estas espécies de mosquitos são responsáveis pela morte de milhões de pessoas no mundo inteiro (GUBLER,1998; BHATT et al., 2013).

2.1.1 *Aedes aegypti*

É originário da África e acredita-se que foi inicialmente introduzido nas regiões tropicais (América) e subtropicais (Ásia) do planeta desde o século XVI, através de navios negreiros. No Brasil, os primeiros relatos de dengue foram no final do século XIX e início do século XX (WEBB, 2016; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Os criadouros preferidos desta espécie são pneus, latas, pratos de vasos, bem como, cisternas, caixas d'água, toneis e piscinas. O mosquito se prolifera nos criadouros citados na condição de que a água armazenada seja limpa e acumulada em recipientes de parede ou fundo escuros. Na Figura 1 é mostrada a morfologia do *Ae. aegypti*.

Figura 1 – *Aedes aegypti*.



Fonte: Fiocruz.

2.1.2 *Aedes albopictus*

Considerado o vetor secundário do vírus da dengue, apresenta a mesma capacidade de proliferação do *Ae. aegypti* bem como características morfológicas semelhantes. O *Ae. albopictus* é oriundo da Ásia e ocorre em áreas de clima temperado e tropical. Foi relatado pela primeira vez no Brasil em 1986. É um mosquito que escolhe lugares para viver e se reproduzir com maior cobertura vegetal, por isso é mais facilmente encontrado no ambiente rural e suburbano. A proliferação do mosquito se dá nos mesmos criadouros do *Ae. aegypti*. A morfologia do mosquito *Ae. albopictus* pode ser observada na Figura 2.

Figura 2 – *Aedes albopictus*.



Fonte: Retratosbiodiversos.com.br.

2.1.3 Dengue

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que 50 a 100 milhões de infecções ocasionadas por dengue ocorrem todos os anos. A dengue é considerada uma grande preocupação de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. A dengue é uma arbovirose, e tem como agente um arbovírus do gênero Flavivírus, pertencente à família Flaviviridae e existem quatro sorotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 E DEN-4. Os sintomas da dengue são febre alta, fortes dores de cabeça, dores nos músculos e articulações, náuseas e vômitos. Ainda não existem medicamentos antivirais capazes de tratar a infecção por dengue (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012; GUBLER, 1998).

2.1.4 Febre amarela

A febre amarela é uma doença infecciosa que causa febre aguda e é imunoprevenível, ou seja, pode ser prevenida por meio de vacinação, os sintomas de febre amarela são manifestações de insuficiência renal e hepática, febre, dores de cabeça, náusea, vômitos e diarreia, nos casos mais graves podem ocorrer manifestações hemorrágicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

2.1.5 Zika vírus

A infecção causada por Zika vírus é geralmente assintomática ou apresenta sintomas como febre, erupção cutânea, dores de cabeça e dores nas articulações e pode provocar vários problemas neurológicos graves, debilitantes e até mesmo fatais, como por exemplo perda fetal, microcefalia, crises convulsivas e problemas oculares. A doença tem afetado aproximadamente 4 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que o Brasil é o país mais atingido (ANDERSON; THOMAS; ENDY, 2016; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

2.1.6 Chikungunya

A palavra Chikungunya é utilizada para representar tanto o vírus como a doença, o vírus é o responsável pela febre Chikungunya em seres humanos. As dores articulares causadas pela Chikungunya podem durar de semanas a meses, dores musculares, dor de cabeça, náuseas, fadiga e erupção cutânea são outros sintomas (SOLIGNAT et al., 2009; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014).

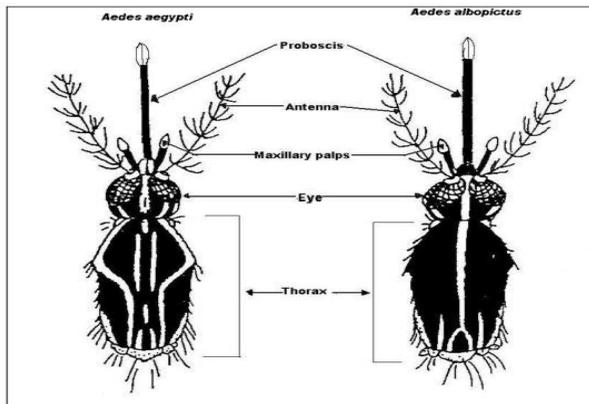
2.2 CARACTERÍSTICAS DOS MOSQUITOS *Aedes*

Os mosquitos têm seu corpo segmentado e revestido pelo exoesqueleto ou cutícula, que é formado principalmente por quitina. O corpo dos mosquitos adultos é dividido em cabeça, tórax e abdome. Na cabeça estão os olhos, antenas e palpos, no tórax estão as patas e asas e no abdome a maior parte dos órgãos internos, aparelho reprodutor, digestivo e excretor. (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

As características morfológicas dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* são muito parecidas, ambos apresentam corpo de cor escura com manchas brancas e são diferenciados pelo dorso do tórax; na espécie *aegypti* em formato de lira e na espécie *albopictus* desenho em

linha reta. A diferença entre as espécies pode ser visualizada na Figura 3.

Figura 3 – Tórax de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

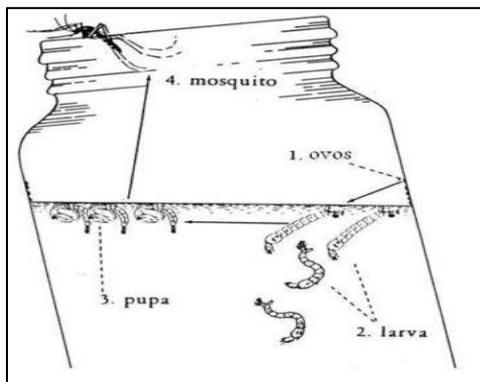


Fonte: Adaptado de Sivanathan (2006).

2.2.1 Ciclo de vida

O inseto possui três fases de vida, são elas; o ovo, a fase aquática (com as etapas de larva e pupa) e a fase adulta. Na Figura 4 está representado resumidamente o ciclo de vida dos mosquitos *Aedes*.

Figura 4 – Ciclo de vida dos mosquitos *Aedes*.



Fonte: Adaptado de Araújo (2011).

2.2.2 Ovos

Os ovos destes mosquitos podem ser elípticos ou ovais, inicialmente são de cor clara e após se tornam mais escuros, são depositados sobre a superfície da água ou na parede úmida do recipiente. Se deixados fora da água, podem sobreviver por longos períodos; mais de um ano. (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Figura 5 – Ovos de *Aedes albopictus* depositados em papel filtro.



Fonte: Autor (2017).

2.2.3 Larvas

São aquáticas e em constante movimentação, são de coloração que varia do amarelo claro até levemente escuras, o corpo é dividido em cabeça, tórax e abdome e apresentam aproximadamente 222 pares de cerdas, compreendem quatro estágios de desenvolvimento; L1, L2; L3 e L4. Mesmo aquáticas respiram sempre o oxigênio do ar, necessitando chegar à superfície da água e se alimentam de qualquer partícula de matéria orgânica (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Figura 6 – Larva do mosquito *Aedes albopictus*.



Fonte: Autor (2017).

2.2.4 Pupas

Nesta fase as pupas estão em constante movimento e não se alimentam, são as larvas do quarto estágio de desenvolvimento (L4) que se transformam em pupas para posterior metamorfose para mosquito (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Figura 7 – Pupas do mosquito *Aedes albopictus*.



Fonte: Autor (2017).

2.2.5 Mosquito adulto

Os mosquitos adultos se alimentam de carboidratos como glicose, sacarose, maltose e frutose, além disso, as fêmeas necessitam de repasto sanguíneo para maturar os ovos e são elas unicamente que picam em função desta necessidade (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

2.3 MECANISMOS DE CONTROLE VETORIAL

O controle de vetores pode ser feito através de diferentes estratégias, como o controle mecânico, que visa encontrar e eliminar qualquer local ou recipiente que contenha água parada, o controle biológico que faz uso de microrganismos que afetem as populações dos mosquitos e o controle químico em que inseticidas afetam o desenvolvimento de larvas e mosquitos adultos.

Atualmente o controle químico é realizado através de repelentes sintéticos formulados contendo diferentes compostos químicos como organofosforados, carbamatos e piretroides, estes compostos químicos são prejudiciais tanto para a saúde dos seres humanos como para o meio ambiente (NAQQASH et al., 2016).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2006) o inseticida ideal deve ser eficaz, sustentável, exibir baixa toxicidade para os mamíferos, além de não alterar significativamente as características da água ambiental.

Portanto, é de extrema importância a pesquisa e desenvolvimento de novos produtos inofensivos à saúde humana e ambientalmente amigáveis capazes de inibir o crescimento e a proliferação das larvas e mosquitos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* devido estes serem potenciais agentes causadores de doenças tropicais.

Os inseticidas naturais derivados de óleos essenciais se apresentam como alternativa por serem eficazes e ambientalmente amigáveis. Entre os óleos essenciais, o óleo de cravo é conhecido por apresentar um amplo espectro de ação, desde antimicrobiano a larvicida e repelente (CALO et al., 2015; BAKKALI et al., 2008; DIAS; MORAES, 2014).

2.3.1 Óleos essenciais

Óleos essenciais são misturas bastante complexas, podendo conter de 20 a 60 componentes e são caracterizados por dois ou três componentes principais em concentrações mais elevadas, são estes

componentes principais que determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais. Os óleos essenciais apresentam compostos químicos, como hidrocarbonetos incluindo monoterpenos, diterpenos e sesquiterpenos e constituintes alifáticos e aromáticos como aldeídos, álcoois e fenóis. Os monoterpenos são as moléculas mais representativas na composição dos óleos essenciais (aproximadamente 90%) e formam-se a partir do acoplamento de duas unidades de isopreno (C_5H_8) (PAVELA, 2015; RAILEANU et al., 2013; GRAYSON et al., 2000).

Óleos essenciais podem ser obtidos por métodos tradicionais, como hidrodestilação, destilação à vapor, destilação seca e prensagem mecânica de plantas a frio e por métodos mais avançados como extração assistida por ultrassom, micro-ondas e fluido supercrítico (REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012; ASSAMI et al., 2012; GAVAHIAN et al., 2015; DIMA; DIMA, 2015).

Dentre os óleos essenciais destaca-se o óleo essencial de Cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) nativo das ilhas Maluku no leste da Indonésia (CORTÉS-ROJAS; DE SOUZA; OLIVEIRA, 2014), este óleo ganha destaque por apresentar inúmeras propriedades devido sua estrutura química, sendo assim utilizado em uma vasta gama de aplicações.

2.3.2 Óleo de cravo

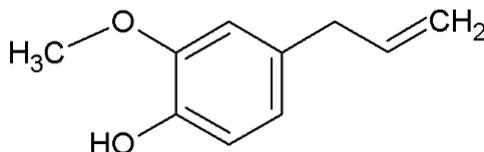
O óleo de cravo apresenta como composto majoritário o eugenol (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012), Fayemiwo et al., (2014) determinaram a composição química do óleo de cravo através de GC/MS, em que, o componente majoritário encontrado foi o eugenol (80,5 %), seguido de acetato de eugenila (5,01%) e β -cariofileno (3,14%) entre outros em menores quantidades.

O eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol) é conhecido por apresentar diferentes propriedades como larvicida, repelente, biocida, antioxidante, antifúngico, anticâncer entre outros (FAYEMIWO et al., 2014; NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010; BHAT; KEMPRAJ, 2009; SHAN et al., 2005; XIE et al., 2015; PISANO et al., 2007).

O óleo de cravo é considerado pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) como uma substância segura quando administrada em níveis que não excedam 1500 ppm para todas as classes de alimentos. Além disso, a Organização Mundial da Saúde estabeleceu a ingestão diária aceitável de óleo de cravo em $2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ de peso corporal para humanos (GULÇIN; ELMASTAS; ABOUL-ENEIN, 2012).

Na Figura 8 está representada a estrutura química do eugenol, que apresenta grupos funcionais como éter metílico, fenol e hidrocarbonetos.

Figura 8 – Estrutura química do eugenol.



Fonte: Adaptado de Bakkali et al. (2008).

2.3.3 Mecanismo de ação dos óleos essenciais

A relação entre o efeito larvicida e a composição química dos óleos essenciais é difícil de ser determinada, uma vez que as interações entre os compostos podem influenciar diretamente na atividade, bem como, os resultados dos testes dependem de muitos fatores; condições laboratoriais como temperatura e exposição à luz, material biológico, solvente utilizado, entre outros (DIAS; MORAES, 2014; LAHLOU, 2004).

Em testes com larvas de *Ae. aegypti* Santos et al. (2010) verificaram que moléculas aromáticas eram mais tóxicas do que moléculas alifáticas, devido a densidade eletrônica do anel aromático influenciar positivamente na eficiência dos óleos essenciais. Também, quanto maior o número de ligações duplas conjugadas no anel aromático, maior será o potencial larvicida. Já, um elevado número de grupos hidroxila diminui a atividade larvicida, porque estes grupos evitam a penetração de moléculas através da cutícula, o que impede o composto de atingir seu alvo (SCOTTI et al., 2014; LÓPEZ; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS; GIL, 2005).

Os compostos larvicidas podem agir por absorção através da cutícula, sistema respiratório ou por ingestão através do sistema gastrointestinal. Com as substâncias no interior da larva, estas podem atingir o local de ação ou podem causar efeitos sistêmicos por difusão em diferentes tecidos (CANTRELL et al., 2010; SOUZA et al., 2012). Segundo Enan (2001) e Isman (2005) o rápido efeito de alguns larvicidas naturais é indicativo de seu modo de ação neurotóxico e neuromuscular.

Os insetos detectam odores, uma vez que este odor é volátil e é detectado pelo receptor olfatório (localizado nas antenas) e desta forma

são repelidos (MAIA; MOORE, 2011). Os óleos essenciais podem causar diferentes efeitos sobre os insetos, incluindo repelência, inibição de oviposição e alimentação, distúrbios no desenvolvimento e mortalidade. A propriedade de repelente dos óleos essenciais está associada a presença de isoprenoides em sua estrutura como monoterpenos, sesquiterpenos e álcoois (AGUIAR, 2011; REHMAN; ALI; KHAN, 2014).

2.4 NANOTECNOLOGIA

A nanoencapsulação é um importante campo da nanotecnologia, que envolve o aprisionamento de agentes bioativos dentro de materiais de suporte, com uma dimensão em nanoescala (FATHI; MARTÍN; MCCLEMENTS, 2014). A nanotecnologia pode ser aplicada em diferentes áreas, como na indústria da construção civil (HANUS; HARRIS, 2013), alimentos (SMOLKOVA et al., 2015), fármacos (LEE; YEO, 2015), óleos essenciais (XUE; MICHAEL DAVIDSON; ZHONG, 2015), compostos antimicrobianos (XIE et al., 2014), entre outros.

2.4.1 Encapsulação de óleos essenciais

Devido a hidrofobicidade e baixa solubilidade em água do óleo de cravo, ocorrem dificuldades de incorporação do mesmo em meios aquosos, o que limita a sua incorporação na forma livre. Desta forma, a técnica de nanoencapsulação surge como possibilidade para essa incorporação. Isso porque favorece o armazenamento, aumento da sua biodisponibilidade, e liberação do agente encapsulado ao longo do tempo, o que possibilita a aplicação como agente larvicida em ambientes aquosos propícios a serem reservatório de larvas, bem como, a aplicação de nanopartículas poliméricas carregadas com óleo de cravo para incorporação em diferentes superfícies. Com o uso das técnicas de encapsulação, o desempenho de repelentes naturais pode ser melhorado e óleos essenciais podem se tornar uma opção mais viável para uso em repelentes amigáveis e ao mesmo tempo duradouros (GARG; SINGH, 2011; ASBAHANI et al., 2015, GOODYER et al., 2010).

2.4.2 Nanoemulsões

Nanoemulsões são sistemas heterogêneos constituídos de duas fases imiscíveis (água e óleo) e apresentam um diâmetro médio de

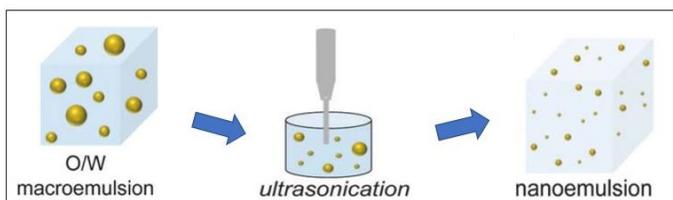
gotículas variando de 20 a 200 nanômetros (nm). Devido ao pequeno tamanho das gotas, a nanoemulsão pode parecer transparente ou translúcida, estas características únicas levaram a um aumento do uso de nanoemulsões em diferentes aplicações como na área química, farmacêutica e cosmética (FERNANDEZ et al., 2004; SOLÈ et al., 2006). As gotas nas nanoemulsões podem existir como óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), em que o núcleo da partícula é óleo ou água, respectivamente.

A utilização de surfactante na formulação de nanoemulsões é fundamental para a formação de gotículas de tamanho pequeno, uma vez que diminui a tensão interfacial, também atua na estabilização da nanoemulsão através de interações eletrostáticas repulsivas e impedimento estérico (MASON et al., 2006).

Nanoemulsões podem ser obtidas através de diferentes métodos, incluindo métodos de alta e baixa energia. Em métodos de alta energia são empregados dispersores ultrassônicos em que as ondas de choque de alta energia criam turbulência devido a cavitação, rompendo as gotículas (DELMAS et al., 2011).

Na Figura 9 está representado o preparo de nanoemulsão por método de alta energia.

Figura 9 – Esquema de preparo de nanoemulsão utilizando método de alta energia.



Fonte: Adaptado de Gupta et al. (2016).

2.4.3 Nanopartículas poliméricas

Os polímeros podem ser classificados como naturais e sintéticos, dentre os sintéticos está o poliestireno que é um polímero formado a partir da polimerização do seu monômero estireno. O poliestireno pode ser obtido por diferentes processos de polimerização, incluindo o de polimerização em miniemulsão; técnica utilizada neste trabalho. O polímero é amplamente utilizado na fabricação de eletrônicos, utensílios domésticos, embalagens de alimentos, entre outros (BEZERRA, 2015).

Possui características como estabilidade térmica, transparência e é um polímero amorfo, apresenta baixa resistência sendo um sólido quebradiço, desta forma, neste trabalho é utilizado juntamente com o monômero acrilato de butila que confere propriedades de maleabilidade e elasticidade ao seu polímero; o poliacrilato de butila.

As nanocápsulas ou nanocarreadores podem proteger um componente bioativo em condições ambientais desfavoráveis como a oxidação e o pH. Nanocarreadores fornecem uma área superficial maior e tem potencial para aumentar a solubilidade, melhorar a biodisponibilidade e melhorar a liberação prolongada dos compostos encapsulados. (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012). Desta forma, a escolha dos materiais adequados, bem como o método apropriado é de extrema importância, sendo essencial para garantir as propriedades e aplicações pretendidas (CALDERÓ; GARCÍA-CELMA; SOLANS, 2011).

Os principais fatores que influenciam na liberação de substâncias encapsuladas são a volatilidade do núcleo, a relação entre o material do núcleo e da matriz, grau de viscosidade da matriz, difusão, degradação, uso de solvente, pH, temperatura e pressão (SILVA et al., 2014).

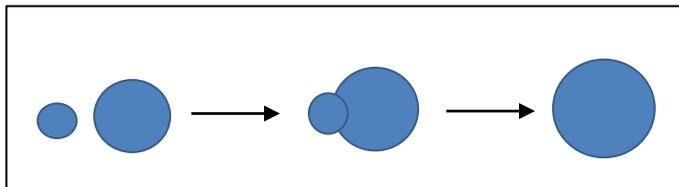
2.4.4 Polimerização via miniemulsão

Utiliza-se a palavra miniemulsão para descrever dispersões aquosas de gotículas de óleo relativamente estáveis, com diâmetro entre 50 e 500 nm, a polimerização em miniemulsão envolve o uso de monômero, água, iniciador, surfactante e coestabilizador. Miniemulsões podem ser produzidas através de alta energia de cisalhamento, em que a tensão de cisalhamento pode ser feita através de um sonicador ou homogeneizador mecânico; quando uma emulsão é submetida a esta tensão formam-se pequenas gotículas, e conseqüentemente tem-se uma miniemulsão.

O surfactante é necessário para retardar ou evitar a formação de coalescência causada pelo movimento Browniano, a coalescência ocorre quando duas ou mais gotas estão próximas o suficiente para que elas se choquem formando gotas de tamanho maior. O esquema da coalescência está representado na Figura 10. Já, o coestabilizador tem como função impedir a degradação difusional ou *Ostwald Ripening* que ocorre na presença de diferença de pressão resultando em um fluxo de massa das gotas de monômero menores para as gotas maiores, dando origem a gotas de diâmetro maiores e, está representado na Figura 11. O coestabilizador deve ser altamente insolúvel na fase aquosa a fim de não

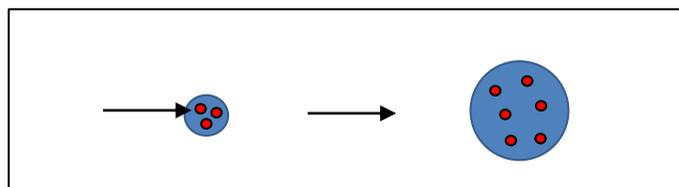
difundir-se para fora das gotículas e altamente solúvel nas gotículas de monômero. (SCHORK et al., 2005; ASUA, 2002).

Figura 10 – Esquema da coalescência.



Fonte: Do autor (2017).

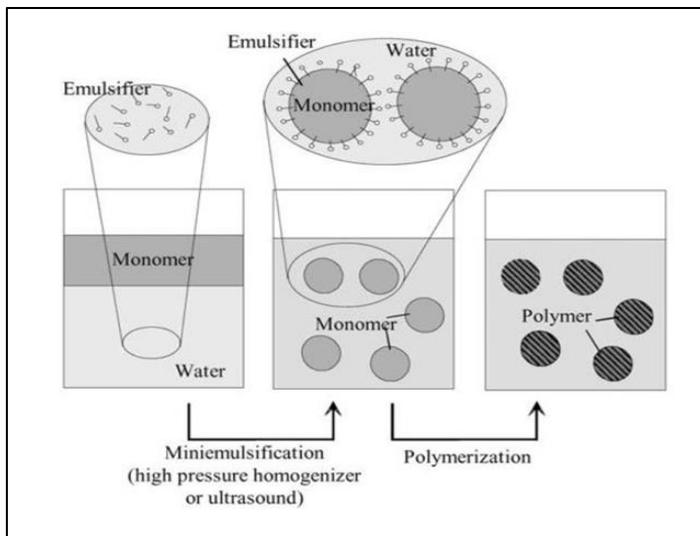
Figura 11 – Esquema da degradação difusional.



Fonte: Do autor (2017).

A miniemulsão geralmente é preparada em três etapas: primeiro, o agente tensoativo é dissolvido em água e o coestabilizador é dissolvido na fase orgânica. Dependendo da natureza do iniciador, se organossolúvel ou hidrossolúvel, este será respectivamente adicionado à fase orgânica ou à aquosa. Na segunda etapa ocorre a formação da emulsão, a fase orgânica (monômero + coestabilizador) é adicionada à solução aquosa contendo o agente tensoativo e o sistema é agitado por agitação magnética. Na terceira etapa a emulsão resultante da segunda etapa é submetida a uma alta tensão de cisalhamento por meio de uma sonda de ultrassom ou de um ultraturrax, formando a miniemulsão (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002). Na Figura 12 está representado o esquema do processo de miniemulsão.

Figura 12 - Esquema do processo de miniemulsão.



Fonte: Adaptado de Antonietti; Landfester (2002).

2.4.4.1 Polimerização em miniemulsão via radicais livres

A polimerização em miniemulsão pode ocorrer via radicais livres e é dividida em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Na etapa de iniciação ocorre a decomposição do iniciador em um par de radicais livres. Um destes radicais livres é adicionado a primeira molécula de monômero, formando um radical primário. Após a etapa de iniciação ocorre a etapa de propagação em que o crescimento das cadeias poliméricas ocorre devido sucessivas adições de uma nova molécula de monômero ao radical. Na etapa de terminação a cadeia polimérica para de crescer e pode ocorrer por combinação, desproporcionamento ou transferência de cadeia. Na terminação por combinação, ocorre a combinação de dois radicais livres formando uma única molécula de polímero, na terminação por desproporcionamento um átomo de hidrogênio é transferido de uma cadeia em crescimento para outra, originando uma ligação dupla e formando duas moléculas de polímero. E na reação de terminação por transferência de cadeia uma cadeia polimérica em crescimento é desativada e o radical livre é deslocado para outra espécie presente no meio (BRESOLIN, 2013).

2.4.5 Impregnação de nanopartículas poliméricas em substrato têxtil

Devido a proliferação dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* e suas consequências, faz-se necessário a utilização de diferentes meios de barreira como forma de proteção individual ou coletiva, como por exemplo a incorporação de agentes repelentes de insetos em têxteis. Dentre os têxteis, a fibra de algodão se destaca, sua produção mundial anual é estimada em 50 % da produção mundial total de fibras e, a China, América e Índia são os principais produtores (SAMPAIO; BISHOP; SHEN, 2005).

De acordo com Katz et al. (2008) os repelentes devem ser eficazes, seguros, atóxicos, não devem danificar a pele ou roupas e devem apresentar um tempo de duração adequado.

Com o objetivo de se obter um substrato têxtil com atividade repelente, o uso de produtos naturais, baseados em plantas tem ganhado bastante atenção, uma vez que são ambientalmente amigáveis e não oferecem riscos à saúde. Porém, uma desvantagem da utilização de repelentes a base de plantas como óleos essenciais é a sua rápida volatilização, sendo assim efetivos por curtos períodos. A técnica de encapsulação supera esta limitação e agentes repelentes encapsulados e aplicados em substrato têxtil permitem sua atividade repelente por períodos maiores (SAMPAIO et al., 2005; SHAHID-UL-ISLAM; SHAHID; MOHAMMAD, 2013).

Rodrigues et al. (2008) realizaram a impregnação de microcápsulas contendo limoneno em substrato têxtil, o equipamento utilizado na impregnação foi do tipo Foulard. Specos et al. (2010) impregnaram têxteis de algodão com microcápsulas carregadas com óleo essencial de citronela e avaliaram a repelência de mosquitos da espécie *Ae. aegypti*. Pinho (2011) avaliou a eficácia de microcápsulas de permetrina, DEET (N,N'-Diethyl-3-methylbenzamide) e citronela contra a picada de mosquitos *Anopheles stephensi* Liston, 1901, após serem aplicadas em tecidos de algodão. Na literatura não são encontrados trabalhos sobre a encapsulação e impregnação de nanopartículas poliméricas contendo óleo de cravo.

CAPÍTULO III

3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DO ÓLEO DE CRAVO (*Syzygium aromaticum*) AUTOEMULSIFICADO E PELA TÉCNICA DE MINIEMULSIFICAÇÃO EM *Aedes albopictus*

3.1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo são apresentados a metodologia de preparo da nanoemulsão carregada com óleo de cravo pela técnica de miniemulsificação e sua avaliação como agente larvicida. A nanoemulsão obtida por Meneses (2016) utilizou o método de alta energia e apresentou estabilidade coloidal elevada após 60 dias. Também são apresentadas as metodologias utilizadas na criação dos mosquitos *Ae. albopictus* e nos ensaios larvicida, determinação das concentrações letais capazes de matar 50 e 90 % das larvas do mosquito teste quando expostas a diferentes concentrações de óleo de cravo autoemulsificado e encapsulado, bem como os resultados obtidos. No teste de eficiência da atividade larvicida ao longo do tempo utilizou-se duas vezes o valor CL_{90} do óleo de cravo autoemulsificado uma vez que o objetivo era observar 100 % de mortalidade no primeiro dia de teste e verificar por quanto tempo o óleo autoemulsificado e encapsulado apresentavam atividade larvicida. Uma observação importante é que o óleo de cravo não pode ser utilizado na sua forma livre devido sua hidrofobicidade, precisa estar disperso no meio para poder ser avaliado em sistemas aquosos como neste trabalho. Neste trabalho serão utilizados somente mosquitos da espécie *Ae. albopictus* por não oferecerem riscos, devido estes não serem agentes causadores de doenças tropicais no continente Americano.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Reagentes

Óleo essencial da folha de cravo foi obtido de Ferquima Indústria e Comércio de Óleos essenciais, Brasil. Pluronic® F-127 foi adquirido de Sigma-Aldrich, Brasil e Crodamol™ GTCC foi obtido da Alpha Química, Brasil. Dimetilsulfóxido (DMSO), obtido de NEON, Brasil, Tween 80. Água destilada foi usada em todos os experimentos.

3.2.2 Preparo da nanoemulsão carregada com óleo de cravo pela técnica de miniemulsificação

A metodologia de preparo da nanoemulsão foi descrita por Meneses (2016), em que a fase orgânica da nanoemulsão foi preparada com 20 mg (0,42 % em relação a massa total de reagentes) de Crodamol™ GTCC (coestabilizador, lipídio líquido que consiste em uma mistura de ácido cáprico e caprílico). (SEVERINO et al., 2011) e 7 mg. mL⁻¹ de óleo de cravo (0,70 % em relação a massa total) e uma solução aquosa composta de 20 mg de Pluronic® F-127 (surfactante não-iônico, sendo 0,37 % em relação a massa total) e 6 mL de água destilada. À temperatura ambiente, as fases orgânica e aquosa foram agitadas durante 30 minutos a 600 rpm, formando uma emulsão, após, seguido de sonicação em dispersor ultrassônico de alta energia durante 1 minuto (sonicação de 30 segundos e pausa de 10 segundos) a 50 % de amplitude. Por fim, a nanoemulsão foi arrefecida em banho de gelo para dissipar o calor gerado durante a sonicação.

3.2.2.1 Nanoemulsão branco

Uma nanoemulsão branco foi utilizada como controle negativo no teste larvicida para determinar as concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀ da nanoemulsão carregada com óleo de cravo, a fim de comprovar que a mortalidade das larvas ocorre devido à atividade larvicida do óleo de cravo, e não pelos reagentes utilizados na formulação da nanoemulsão. O preparo da nanoemulsão branco seguiu a mesma metodologia utilizada no item 3.2.2 porém, sem a presença de óleo de cravo.

3.2.2.2 Nanoemulsão com óleo de cravo e corante fluorescente

Com o objetivo de comprovar que o óleo de cravo está aprisionado nas nanogotas da nanoemulsão, preparou-se uma nanoemulsão como descrita no item 3.2.2 juntamente com a adição de corante Coumarin 6 (corante hidrofóbico de cor verde) na fase orgânica. A nanoemulsão preparada foi analisada em microscópio óptico (Olympus BX41) com sistema de epifluorescência e filtro verde, com lente objetiva e magnificação de 400x. A análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) no Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2.3 Medidas de tamanho de gota

O tamanho médio da intensidade das gotas (D_p) e o índice de polidispersão (PDI) foram determinados por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) usando um equipamento Zetasizer Nano S (Malvern Instruments, Worcester, Reino Unido). As amostras foram dispersas a 633 nm com um ângulo de 173 °.

3.2.4 Dispersão padrão de óleo de cravo

Uma dispersão de óleo de cravo de 20 mg.mL⁻¹ foi utilizada no ensaio larvicida. A metodologia utilizada com algumas modificações foi descrita por Santos et al. (2011) e utiliza 2,0 % de óleo de cravo, 30 % de DMSO, e 0,7 % de Tween 80; todos em relação a massa total. Devido a hidrofobicidade do óleo de cravo, este precisa ser disperso em DMSO e Tween 80, para evitar a formação de uma película de óleo sobre a água, o que, conseqüentemente asfixiaria as larvas e interferiria nos resultados dos ensaios larvicida.

3.2.4.1 Dispersão branco

Para comprovar que a mortalidade das larvas no ensaio larvicida ocorre devido a atividade larvicida do óleo de cravo, e não pelos reagentes utilizados no preparo da dispersão contendo o óleo, uma dispersão branco foi utilizada como controle negativo. Esta dispersão segue a mesma metodologia utilizada no item 3.2.4 porém, sem a presença de óleo de cravo.

3.2.5 Criação de *Aedes albopictus*

Para a realização deste trabalho, foram utilizados mosquitos da espécie *Ae. albopictus* os quais apresentam morfologia e hábitos semelhantes aos do mosquito *Ae. aegypti*, o qual não pode ser utilizado nos experimentos, por questões de segurança, uma vez que este vetor é o principal agente causador de doenças como dengue, febre amarela, Chikungunya e Zika vírus.

Desta forma, neste trabalho serão utilizados apenas mosquitos da espécie *Ae. albopictus*, que não oferecem riscos, pois, no continente Americano não são agentes causadores de doenças tropicais.

3.2.5.1 Armadilha para deposição de ovos

Para iniciar a criação de mosquitos da espécie *Ae. albopictus*, armadilhas foram colocadas em campo, na cidade de Florianópolis – SC. As armadilhas foram feitas com recipientes de plástico de cor escura, e nos recipientes eram colocados palitos de madeira ou papel filtro com aproximadamente 10 cm de altura de água. As armadilhas eram monitoradas até a deposição ou aparecimento de ovos. Após a deposição dos ovos, os palitos ou papeis filtro eram colocados em novos recipientes de plástico e armazenados no Laboratório de Transmissores de Hematozoários (LTH) da Universidade Federal de Santa Catarina, no Departamento de Microbiologia Imunologia e Parasitologia (MIP) até eclosão, quando eclodidos e transformados em larvas, estas eram identificadas em microscópio.

Figura 13 – (a) Armadilha para deposição de ovos e (b) ovos de *Aedes albopictus* em microscópio.



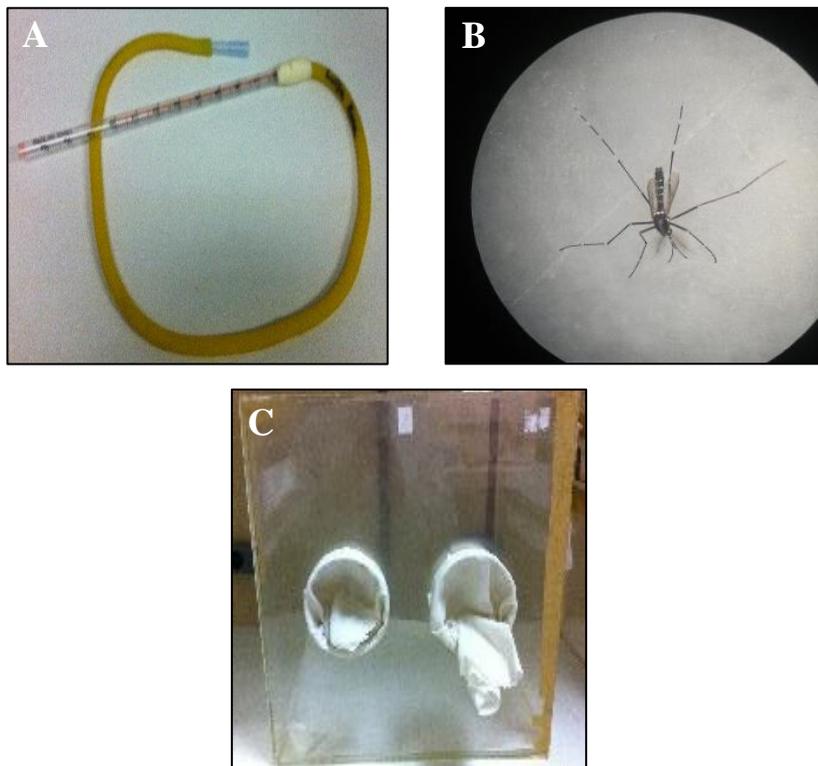
Fonte: Autor (2017).

3.2.5.2 Coleta e identificação de mosquitos

Mosquitos da espécie de interesse foram coletados em campo com o auxílio de um sugador, onde, o mosquito pousa sobre a presa e é aspirado e armazenado em um recipiente fechado. Após, os mosquitos coletados são identificados em microscópio. Se o mosquito coletado for da espécie *Ae. albopictus* (apresenta uma listra branca no tórax) este é colocado em uma gaiola própria para criação de mosquitos.

Na Figura 14 podem ser visualizados o aparato para coleta de mosquitos, o mosquito *Ae. albopictus* em microscópio e a gaiola de criação.

Figura 14 – (a) Aparato para coleta de mosquitos. (b) Mosquito *Aedes albopictus* identificado em microscópio. (c) Gaiola para criação.



Fonte: Autor (2017).

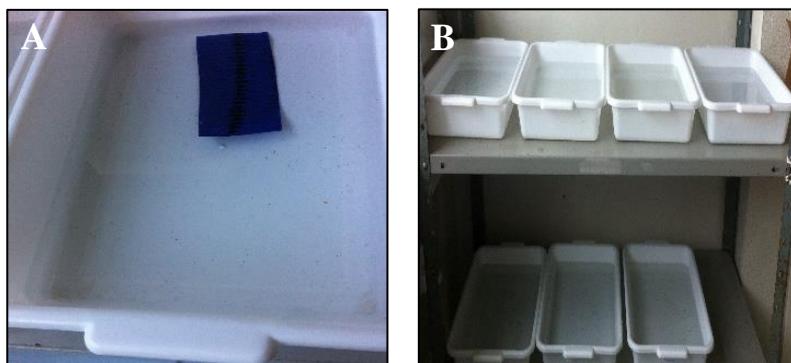
3.2.5.3 Complementação da criação

Para a complementação da criação, ovos de *Ae. albopictus* foram gentilmente fornecidos pelo Núcleo Operacional Sentinela de Mosquitos Vetores – NOSMOVE, DIRAC – IOC – VPAAPS, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, e mantidos em laboratório no insetário da UFSC. As condições do insetário e cuidados com a criação foram seguidos de acordo com Consoli e Oliveira (1994). A criação foi

mantida a uma temperatura de 24 ± 2 °C e 60 ± 10 % de umidade relativa sob um ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Os ovos fornecidos estavam fixados em tiras de papel, estes papéis foram colocados em recipientes de plástico com água destilada (Figura 15) e o desenvolvimento dos ovos foi acompanhado até o nascimento das larvas. Após a eclosão dos ovos, as larvas foram alimentadas com ração de peixe (Alcon basic®) para crescerem e se desenvolverem normalmente. Depois de as larvas se transformarem em mosquitos, estes eram alimentados com uma solução de açúcar a 10 % e repasto sanguíneo uma vez por semana, pois, os mosquitos fêmea necessitam de sangue para colocar e maturar novos ovos.

Figura 15 – (a) Ovos fornecidos pela Fiocruz e (b) criação de larvas.



Fonte: Autor (2017).

3.2.6 Ensaio larvicida

O ensaio larvicida foi realizado de acordo com a metodologia descrita pela OMS (2005) com algumas modificações. Todos os experimentos foram realizados em triplicata contendo 20 larvas do mosquito *Ae. albopictus* no terceiro (L3) e início do quarto estágios (L4) de desenvolvimento em cada amostra. Béqueres de vidro de 50 mL foram utilizados a fim de facilitar a visualização das larvas. Os béqueres contendo as larvas e a amostra a ser testada foram mantidos em uma caixa de plástico a uma temperatura de 24 ± 2 °C, sob um ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro por 48 horas, sendo que em 24 e 48 horas de exposição os níveis de mortalidade das larvas eram verificados.

Utilizou-se o tempo de teste máximo de 48 horas, uma vez que em exposições mais longas, as larvas poderiam estar apresentando mortalidade por razões diversas, sendo necessário realimentá-las.

De acordo com a OMS (2005) larvas mortas, são aquelas que não conseguem emergir até a superfície nem apresentam movimentos ou reação quando estimuladas.

Se mais de 10 % das larvas utilizadas em cada amostra do controle virarem pupa durante o experimento, o teste deve ser repetido. E se a mortalidade de larvas no controle for entre 5 e 20 % a mortalidade dos grupos tratados deve ser corrigida, utilizando-se a Fórmula de Abbott, descrita abaixo.

$$\text{Mortalidade (\%)} = \frac{X-Y}{X} 100 \quad (1)$$

Onde, X é o percentual de sobrevivência no controle não tratado e Y é o percentual de sobrevivência na amostra tratada.

3.2.6.1 Determinação da CL_{50} e CL_{90} do óleo de cravo autoemulsificado

Um ensaio larvicida foi realizado para determinar as concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}) do óleo de cravo autoemulsificado, em que a dispersão de óleo de cravo de 20 mg.mL^{-1} (descrita no item 3.2.4) foi utilizada. Diferentes concentrações a partir da dispersão padrão foram preparadas, de 10 a 200 ppm para um volume final de 20 mL. Em um tubo de plástico do tipo falcon de 50 mL; 20 larvas foram adicionadas, o volume de dispersão padrão correspondente para cada concentração foi adicionado e completou-se até o volume final de 20 mL com água destilada. Após, transferiu-se para um béquer de vidro de 50 mL.

Controles negativos também com 20 larvas em cada amostra foram preparados, um controle continha somente água destilada e um controle com a dispersão branco (descrita no item 3.2.4.1), na maior concentração testada (200 ppm). Após, 24 e 48 horas de exposição da dispersão padrão e dos controles a mortalidade das larvas foi avaliada.

3.2.6.2 Determinação da CL_{50} e CL_{90} da nanoemulsão de óleo de cravo

Uma nanoemulsão de 7 mg.mL^{-1} de óleo de cravo foi preparada através da técnica de miniemulsificação (procedimento descrito no item 3.2.2) e diluições da nanoemulsão foram realizadas. Dois controles

negativos foram avaliados em triplicata contendo 20 larvas em cada amostra, um controle de somente água destilada e outro controle com a nanoemulsão branco (descrita no item 3.2.2.1). Ao término de 24 e 48 horas de exposição, a mortalidade das larvas foi avaliada.

3.2.7 Eficiência da atividade larvicida ao longo do tempo

Este teste pode ser considerado inédito, uma vez que não há relatos na literatura. O objetivo deste teste foi determinar por quanto tempo a nanoemulsão carregada com óleo de cravo e a dispersão de óleo de cravo autoemulsificado apresentam atividade larvicida. O ensaio foi realizado utilizando-se em cada sistema duas vezes o valor da CL_{90} do óleo de cravo, previamente determinado no ensaio larvicida. Este valor foi utilizado, uma vez que, deseja-se verificar 100 % de mortalidade no início do teste.

Os experimentos foram realizados em triplicata com 10 larvas do mosquito *Ae. albopictus* no terceiro e quarto estágios de desenvolvimento em cada amostra. Após 24 horas de exposição, os níveis de mortalidade das larvas foram registrados e a concentração de óleo de cravo residual dos dois sistemas foi determinada por espectrofotômetro UV-vis, retirando-se uma alíquota de 100 μ L das dispersões remanescentes, as dispersões teste contendo as larvas foram filtradas em um tecido do tipo *voil* e a dispersão restante foi transferida para um novo béquer de vidro.

Dez novas larvas do mosquito foram adicionadas às dispersões remanescentes e, dia a dia, após 24 horas de exposição, as dispersões contendo as larvas eram filtradas e transferidas para um novo béquer e a concentração de óleo de cravo residual analisada.

Também, foram utilizados três controles negativos em triplicata com 10 larvas em cada amostra: um controle era a nanoemulsão branco, outro era a dispersão branco, descritos anteriormente, e um controle com somente água destilada. Após 24 horas de exposição das larvas aos controles negativos, estas eram filtradas e, 10 novas larvas eram adicionadas as dispersões remanescentes.

Outro ensaio, contendo a nanoemulsão carregada com óleo de cravo e uma dispersão de óleo de cravo nas mesmas concentrações (duas vezes o valor da CL_{90} do óleo de cravo, previamente determinado) foi realizado sem a presença de larvas do mosquito *Ae. albopictus* e a cada 24 horas a nanoemulsão e a dispersão eram filtradas e transferidas para novos béqueres de vidro, alíquotas de 100 μ L eram retiradas da

nanoemulsão e da dispersão de óleo de cravo remanescentes. Após, a concentração de óleo de cravo residual era determinada em UV-vis.

A eficiência da nanoemulsão e da dispersão de óleo de cravo autoemulsificado foram acompanhadas até que nenhuma amostra apresentasse mortalidade de larvas. Para o cálculo da eficiência, utilizou-se a Equação 2 descrita abaixo.

$$Eficiência (\%) = \frac{Larvas\ mortas}{Larvas\ totais} \times 100 \quad (2)$$

3.2.8 Análise de espectrofotometria de UV-vis

Alíquotas de 100 μ L retiradas da nanoemulsão contendo óleo de cravo e da dispersão de óleo de cravo autoemulsificado na presença e sem a presença de larvas do mosquito, utilizadas nos ensaios de eficiência da atividade larvicida foram diluídas em etanol e analisadas em um espectrofotômetro UV-vis, na faixa de 350 a 190 nm. A concentração do óleo de cravo residual liberado pelas gotículas de nanoemulsão e a concentração residual de óleo de cravo autoemulsificado da dispersão padrão foram determinadas medindo-se a absorbância do pico característico do eugenol (280 nm) e relacionando-as a concentração através de uma curva de calibração. Este procedimento foi repetido todo dia após 24 horas de exposição, até que a mortalidade das larvas não tenha sido observada.

A concentração de óleo de cravo residual foi calculada usando uma curva de calibração de acordo com a Equação 3.

$$Abs = (16,458 \times C_{co}) + 0,0621 \quad (3)$$

Onde, *Abs* é a absorbância e C_{co} é a concentração de óleo de cravo em $mg \cdot mL^{-1}$. Com um coeficiente de correlação de $R^2 = 0,99$.

3.2.9 Análise estatística

Testes de normalidade, homogeneidade de variância e os valores de CL_{50} e CL_{90} foram calculados utilizando o software BioStat Pro 5.9.8 (Analyst Soft Inc.). A análise de Probit foi realizada através de dados de mortalidade das larvas, coletados após 24 e 48 horas de exposição a diferentes concentrações de soluções de teste para estabelecer a concentração letal 50 e 90%.

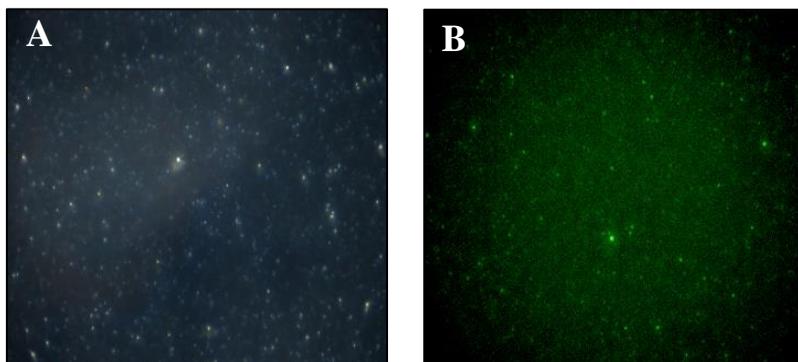
Os desvios padrão ou intervalos de confiança dos valores de concentrações letais obtidos devem ser inferiores a 25 % ou $p < 0,05$. Também foram realizadas análises de variância ANOVA, seguidas de teste Tukey num intervalo de confiança de 95% utilizando o software Statistica.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Visualização das nanogotas de óleo de cravo com corante fluorescente

Na Figura 16 podem ser visualizadas as nanogotas de óleo de cravo da nanoemulsão, utilizando microscópio óptico e magnificação de 400x. As duas figuras são da mesma amostra de nanoemulsão, porém, de regiões diferentes. A figura (a) foi tirada em fundo escuro e a figura (b) em fundo verde.

Figuras 16 – Nanogotas carregadas com óleo de cravo. (a) Nanoemulsão em fundo escuro e (b) nanoemulsão em fundo verde.



Fonte: Autor (2017).

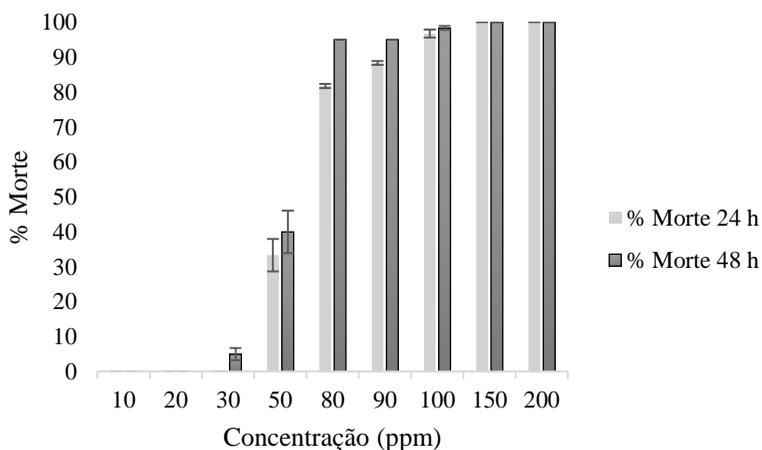
A partir das imagens obtidas verifica-se a formação de nanogotas contendo óleo de cravo no sistema de nanoemulsão.

3.3.2 Concentrações letais do óleo de cravo

Para determinar a CL_{50} e CL_{90} do óleo de cravo, as larvas de mosquito foram expostas a concentrações de 10, 20, 30, 50, 80, 90, 100, 150 e 200 ppm da dispersão de óleo de cravo autoemulsificado, e o controle negativo foi testado na maior concentração, 200 ppm. Esta faixa de concentrações foi testada, uma vez que, deve-se utilizar uma concentração em que nenhuma mortalidade seja observada (10 ppm) e uma concentração que todas as larvas apresentem mortalidade (200 ppm).

Na Figura 17 são apresentadas as mortalidades das larvas de mosquito observadas nos tempos de 24 e 48 horas de exposição em função das concentrações testadas.

Figura 17 – Mortalidade das larvas de *Aedes albopictus* nos tempos de 24 e 48 horas de exposição em função das concentrações testadas de óleo de cravo autoemulsificado.



De acordo com os resultados obtidos, em 24 horas, a mortalidade inicia na concentração de 50 ppm com uma mortalidade de $33,3\% \pm 4,6$ e somente numa concentração de 150 ppm a mortalidade total é observada. Já, em 48 horas, a mortalidade iniciou em 30 ppm ($5\% \pm 1,7$) e a mortalidade total foi a mesma observada em 24 horas. No controle negativo, nenhuma morte foi observada, o que indica que o agente larvicida é o óleo de cravo.

3.3.2.1 Análise estatística

A partir dos resultados obtidos, testes de normalidade, homogeneidade de variância e análise de variância ANOVA foram realizados. De acordo com o teste de normalidade por *Kolmogorov-Smirnov* ($p > 0,05$), os dados apresentam distribuição normal. E, de acordo com o teste de homogeneidade de variância (teste F), apresentou $p > 0,05$ indicando que a homogeneidade de variância é igual. A fim de se verificarem os efeitos do aumento da concentração e do tempo na mortalidade das larvas, um teste de variância ANOVA seguido de teste Tukey foi realizado.

Tabela 1 – Análise estatística da mortalidade das larvas de *Aedes albopictus* em função da concentração de óleo de cravo autoemulsificado.

Concentração (ppm)	Mortalidade média 24 h	Mortalidade média 48 h
0*	0 ± 0,0 cA	0 ± 0,0 cA
10	0 ± 0,0 cA	0 ± 0,0 cA
20	0 ± 0,0 cA	0 ± 0,0 cA
30	0 ± 0,0 cA	1 ± 1,7 cA
50	7 ± 4,6 bA	8 ± 6,1 bA
80	16 ± 0,6 aA	19 ± 0,0 aA
90	18 ± 0,6 aA	19 ± 0,00 aA
100	19 ± 1,1 aA	20 ± 0,6 aA
150	20 ± 0,0 aA	20 ± 0,0 aA
200	20 ± 0,0 aA	20 ± 0,0 aA

* Mortalidade no controle negativo.

Médias com letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$) pelo teste Tukey.

Médias com letras maiúsculas iguais na linha, não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$) pelo teste Tukey.

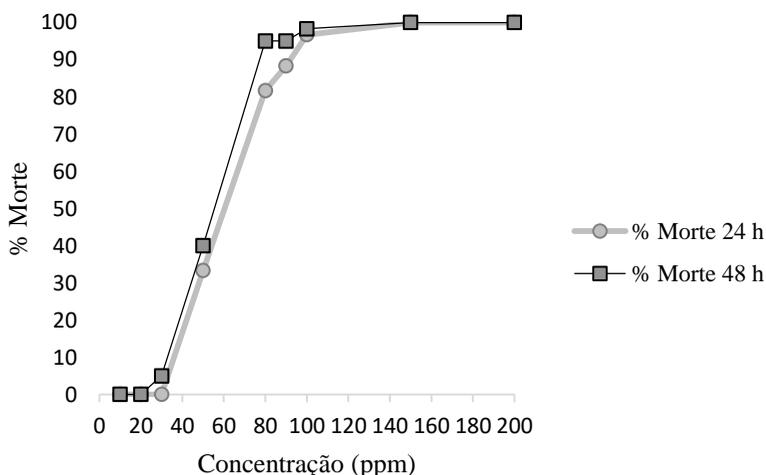
Segundo o teste Tukey, concentrações inferiores a 50 ppm não têm efeito sobre a mortalidade das larvas. E concentrações acima de 80 ppm, não tem diferença estatística ($p > 0,05$) entre si, ou seja, a partir de 80 ppm o aumento da concentração de óleo de cravo não aumenta a mortalidade.

Também, o tempo de exposição de 48 horas não apresenta diferença significativa. Desta forma, as concentrações limites do óleo de cravo para a mortalidade das larvas do mosquito *Aedes albopictus* foram 50 e 80 ppm em 24 horas de exposição.

De acordo com o teste Tukey pode ser observado na Figura 18 o comportamento sigmoidal da mortalidade das larvas em função do tempo e da concentração de óleo de cravo. Este comportamento é normalmente observado em análises biológicas.

3.3.2.2 Análise Probit

Figura 18 – Comportamento sigmoidal da atividade larvicida do óleo de cravo.



A partir dos resultados obtidos de mortalidade das larvas em função da concentração, as concentrações letais CL_{50} e CL_{90} do óleo de cravo autoemulsificado foram determinadas através de uma análise Probit (análise de sobrevivência que fornece respostas do tipo sim ou não).

De acordo com a análise, em 24 horas de exposição a CL_{50} do óleo de cravo autoemulsificado em *Ae. albopictus* foi de $60,0 \pm 3,5$ ppm e a CL_{90} foi de $88,5 \pm 6,1$ ppm. E, para um tempo de exposição de 48 horas, a CL_{50} foi de $53,7 \pm 3,1$ ppm e a CL_{90} foi de $75,4 \pm 5,4$ ppm.

Bhat e Kempraj (2009) utilizando folhas de óleo de cravo (*Syzygium aromaticum*) e larvas do mosquito *Ae. albopictus* no quarto

estágio de desenvolvimento, encontraram valores de CL_{50} de $5,30 \text{ mg.mL}^{-1}$ (5.300 ppm) e CL_{95} de $7,03 \text{ mg.mL}^{-1}$ (7.030 ppm).

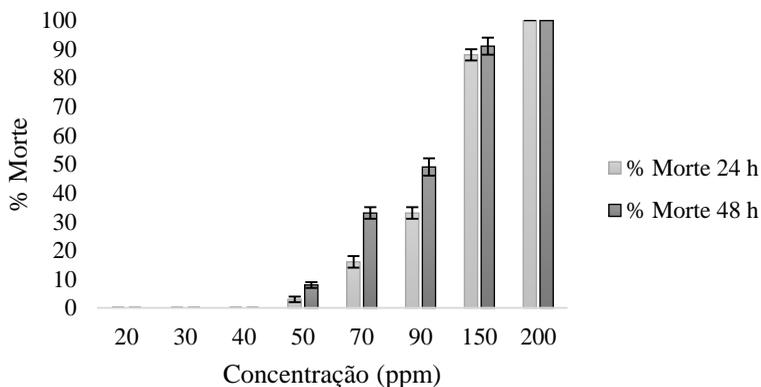
Barbosa e colaboradores (2012) utilizando larvas de *Aedes aegypti* no terceiro estágio de desenvolvimento encontraram LC_{50} de 62,3 ppm para o óleo de cravo (*Syzygium aromaticum*). Nascimento (2012) obteve LC_{50} de 63,4 ppm utilizando botões florais do óleo de cravo (*Syzygium aromaticum*) em larvas de *Ae. aegypti* no terceiro estágio. Fayemiwo et al. (2014), utilizaram óleo de cravo (*Syzygium aromaticum*) em larvas de *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* e obtiveram valores de CL_{50} 92,5 ppm e CL_{95} 137,8 ppm para *Aedes aegypti*, já para *Culex quinquefasciatus* os valores foram de CL_{50} 124,5 ppm e CL_{95} 173,8 ppm.

3.3.3 Concentrações letais da nanoemulsão carregada com óleo de cravo

Para determinar as concentrações letais da nanoemulsão carregada com óleo de cravo, a partir de uma nanoemulsão de 7 mg.mL^{-1} diluições foram preparadas até as concentrações finais de 20, 30, 40, 50, 70, 90, 150 e 200 ppm. Um controle negativo testado na concentração máxima usada, de 200 ppm também foi avaliado. A nanoemulsão utilizada apresentou um diâmetro de partícula (D_p) de $146,5 \pm 0,5 \text{ nm}$ e índice de polidispersão (PDI) de $0,2 \pm 0,01$.

Na Figura 19 são apresentadas as mortalidades observadas nos tempos de 24 e 48 horas de exposição em função das diferentes concentrações testadas.

Figura 19 – Mortalidade das larvas de *Aedes albopictus* nos tempos de 24 e 48 horas de exposição em função das concentrações de óleo de cravo testadas em sistema de nanoemulsão.



Na Figura 19 pode-se observar que as mortalidades das larvas em função das concentrações de nanoemulsão carregada com óleo de cravo iniciam em 50 ppm para ambos os tempos de 24 horas ($3 \pm 1,0$ %) e 48 horas ($8 \pm 1,0$ %). E, também a mortalidade máxima é observada em 200 ppm. Nenhuma morte foi observada no controle negativo.

3.3.3.1 Análise estatística

A partir dos resultados obtidos para a nanoemulsão, o teste de normalidade por *Kolgomorov-Smirnov* ($p > 0,05$), indicou que os dados apresentam distribuição normal. E, de acordo com o teste de homogeneidade de variância (teste F), com $p > 0,05$ indicou que a homogeneidade de variância é igual.

Para verificar os efeitos do aumento da concentração e do tempo na mortalidade das larvas, para a nanoemulsão carregada com óleo de cravo, um teste de variância ANOVA seguido de teste Tukey foi realizado.

Tabela 2 – Análise estatística da mortalidade das larvas de *Aedes albopictus* em função da concentração de óleo de cravo na nanoemulsão.

Concentração (ppm)	Mortalidade média 24 h	Mortalidade média 48 h
0*	$0 \pm 0,0$ dA	$0 \pm 0,0$ dA
20	$0 \pm 0,0$ dA	$0 \pm 0,0$ dA
30	$0 \pm 0,0$ dA	$0 \pm 0,0$ dA
40	$0 \pm 0,0$ dA	$0 \pm 0,0$ dA
50	$1 \pm 1,0$ cdA	$2 \pm 1,0$ dA
70	$3 \pm 2,0$ cB	$7 \pm 2,0$ cA
90	$7 \pm 2,0$ bB	$10 \pm 3,0$ bA
150	$18 \pm 2,0$ aA	$18 \pm 3,0$ aA
200	$20 \pm 0,0$ aA	$20 \pm 0,0$ aA

* Mortalidade no controle negativo.

Mortalidades médias em função da concentração da nanoemulsão com óleo de cravo, com letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$) pelo teste Tukey em um mesmo tempo.

Mortalidades médias com letras maiúsculas iguais na linha, não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$) pelo teste Tukey para mesma concentração em tempos diferentes.

Através da análise de variância seguida de teste Tukey, pode-se concluir que em concentrações inferiores a 50 ppm tanto para os tempos de 24 e 48 horas de exposição, a mortalidade não é alterada de forma significativa. Porém, com o aumento das concentrações de 70 para 150 ppm, um aumento significativo na mortalidade é observado.

Em relação ao aumento do tempo de exposição, nas concentrações de 70 e 90 ppm a mortalidade apresenta alterações significativas. Assim, as concentrações limites da nanoemulsão carregada com óleo de cravo para a mortalidade das larvas de *Aedes albopictus* são 70 e 150 ppm.

3.3.3.2 Análise Probit

A partir da análise Probit das mortalidades obtidas em função da concentração da nanoemulsão carregada com óleo de cravo, as concentrações letais CL_{50} e CL_{90} do sistema nanoemulsionado em 24 horas de exposição foram de $99,6 \pm 4,2$ ppm e $152,1 \pm 10,4$ ppm respectivamente, e para 48 horas de exposição foram de $87,3 \pm 3,8$ ppm e $139,5 \pm 10,0$ ppm respectivamente.

Rodrigues et al. (2014) avaliaram a atividade larvicida do óleo de copaíba em sistema de nanoemulsão com larvas do mosquito *Ae. aegypti*. Na concentração de 250 ppm obtiveram mortalidades de 73,3 e 93,3 % em 24 e 48 horas de exposição. Os autores relataram que a LC_{50} do sistema não pode ser estimada devido a menor concentração testada (200 ppm) apresentar mortalidade de 70 e 90 % em 24 e 48 horas de teste.

Duarte et al. (2015) avaliaram a atividade larvicida da nanoemulsão contendo óleo essencial de alecrim em *Ae. aegypti*, a nanoemulsão apresentou mortalidade de 80 % em 24 horas e 90 % em 48 horas de exposição a uma concentração de 250 ppm.

Na literatura não são encontrados relatos da avaliação larvicida do óleo de cravo ou seu composto majoritário; o eugenol em sistemas de encapsulação.

3.3.4 Comparação das mortalidades obtidas com o óleo cravo autoemulsificado e em nanoemulsão

Para fins de comparação entre os valores de mortalidade obtidos no óleo autoemulsificado e no sistema de nanoemulsão, uma análise de variância seguida de teste Tukey foi realizada utilizando-se as concentrações em comum nos dois sistemas, somente no tempo de

exposição de 24 horas, uma vez que, no tempo de 48 horas, diferenças estatísticas significativas não foram observadas.

Tabela 3 – Análise estatística comparando as mortalidades das larvas de *Aedes albopictus* com óleo de cravo autoemulsificado e em nanoemulsão, em função da concentração no tempo de 24 horas.

Concentração (ppm)	Mortalidade média OC autoemulsificado	Mortalidade média OC nanoemulsão
0*	0 ± 0,0 a	0 ± 0,0 a
20	0 ± 0,0 a	0 ± 0,0 a
30	0 ± 0,0 a	0 ± 0,0 a
50	7 ± 4,6 a	2 ± 1,0 b
90	18 ± 0,6 a	8 ± 2,0 b
150	20 ± 0,0 a	19 ± 2,0 a
200	20 ± 0,0 a	21 ± 0,0 a

* Mortalidade no controle negativo.

Mortalidades médias em função de diferentes concentrações em um mesmo tempo, com letras minúsculas iguais na coluna e na linha, não diferem entre si estatisticamente ($p > 0,05$) pelo teste Tukey.

Comparando a mortalidade das larvas obtidas com o óleo de cravo autoemulsificado e em nanoemulsão, verifica-se que somente as concentrações de 50 e 90 ppm apresentam diferença estatística significativa entre os sistemas avaliados. No sistema de nanoemulsão as concentrações de 50 e 90 ppm não tiveram diferença significativa, porém, acima de 90 ppm maiores mortalidades são observadas.

Nas concentrações de 50 e 90 ppm as mortalidades observadas na nanoemulsão foram inferiores às observadas no óleo autoemulsificado, isto porque, no sistema de nanoemulsão o óleo está aprisionado nas gotas, juntamente com o surfactante e o coestabilizador e sua liberação não acontece de forma imediata, já, no óleo autoemulsificado a concentração inicial de óleo de cravo na fase aquosa é maior do que no sistema de nanoemulsão. Isto ocorre porque a estabilidade cinética e termodinâmica da dispersão é menor, e isto resulta em uma maior concentração do óleo de cravo na fase aquosa e por consequência um valor de CL menor.

3.3.4.1 Comparação das concentrações letais do óleo cravo autoemulsificado e em sistema de nanoemulsão

Após, os valores das concentrações letais CL_{50} e CL_{90} tanto do óleo de cravo autoemulsificado, como do óleo em nanoemulsão serem calculadas através da análise Probit, uma análise de variância seguida de teste Tukey foi realizada, com o objetivo de avaliar e comparar os efeitos da mortalidade das larvas em função da concentração de óleo de cravo nos dois sistemas.

Tabela 4 – Análise estatística comparando as concentrações letais em função das mortalidades do óleo de cravo autoemulsificado e em nanoemulsão, nos tempos de 24 e 48 horas em larvas de *Aedes albopictus*.

CL (ppm)	24 horas		48 horas	
	CL OC Autoemulsificado	CL OC Nanoemulsão	CL OC Autoemulsificado	CL OC Nanoemulsão
50*	60,0±3,5 bB	99,6±4,2 aB	53,7±3,1 bA	87,3±3,8 aB
90**	88,5±6,1 bA	152,1±10,4 aA	75,4±5,4 bA	139,5±10,0 aA

* CL_{50} = Concentração letal (ppm) que mata 50 % das larvas expostas.

** CL_{90} = Concentração letal (ppm) que mata 90 % das larvas expostas.

Letras minúsculas comparam na linha os diferentes sistemas (óleo de cravo autoemulsificado e nanoemulsão carregada com óleo de cravo) ao longo do tempo, ($p>0,05$) não diferem entre si estatisticamente pelo teste Tukey.

Letras maiúsculas comparam na coluna concentrações letais para um mesmo tempo e mesmo sistema. Letras maiúsculas iguais na coluna, não diferem entre si estatisticamente ($p>0,05$) pelo teste Tukey.

Comparando as concentrações letais obtidas nos dois sistemas verifica-se que tanto na CL_{50} como na CL_{90} dentro de cada sistema, estes não apresentaram diferença significativa com o aumento do tempo de exposição. Porém, entre os sistemas há diferença significativa, em que, o sistema de óleo autoemulsificado apresentou os menores valores de concentração letal quando comparados aos valores para o óleo encapsulado, devido sua disponibilidade imediata no meio. Quanto menor o valor obtido para a concentração letal, mais eficiente é a substância testada.

3.3.5 Eficiência da atividade larvicida ao longo do tempo

Após a CL_{90} (88,5 ppm) em 24 horas do óleo de cravo autoemulsificado em mosquitos da espécie *Ae. albopictus*, ter sido

determinada, utilizou-se duas vezes este valor (177 ppm) no teste de eficiência da atividade larvicida ao longo do tempo tanto para o ensaio com óleo de cravo autoemulsificado, (com e sem a presença de larvas) bem como para a nanoemulsão (com e sem larvas). Controles negativos contendo a dispersão padrão branco e a nanoemulsão branco também foram avaliados.

O valor de duas vezes a CL_{90} foi utilizado com o intuito da mortalidade inicial ser de 100 % e sua diminuição ser observada ao longo do tempo. Para fins de comparação, não foi utilizado o valor da CL_{90} da nanoemulsão (152,1 ppm) para avaliar a eficiência da atividade larvicida do sistema nanoemulsionado, devido seu valor ser superior ao da concentração letal do óleo autoemulsificado (88,5 ppm). Na Tabela 5 são apresentadas as mortalidades observadas para os diferentes sistemas, sendo que a mortalidade foi acompanhada por 33 dias.

Tabela 5 – Eficiência da atividade larvicida do óleo de cravo autoemulsificado e em nanoemulsão ao longo do tempo em *Aedes albopictus*.

D ^{ig}	Mortalidade CN (%)	Mortalidade OC autoemulsificado	Eficiência (%)	Mortalidade OC nanoemulsão	Eficiência (%)
0	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0,0	0 ± 0,0	0,0
1	0 ± 0,0	30 ± 0,0	100,0	30 ± 0,0	100,0
2	0 ± 0,0	30 ± 0,0	100,0	30 ± 0,0	100,0
3	0 ± 0,0	30 ± 0,0	100,0	30 ± 0,0	100,0
4	0 ± 0,0	30 ± 0,0	100,0	30 ± 0,0	100,0
5	0 ± 0,0	30 ± 0,0	100,0	30 ± 0,0	100,0
6	0 ± 0,0	29 ± 0,6	96,7	28 ± 0,0	93,3
7	0 ± 0,0	23 ± 1,2	76,7	26 ± 1,5	86,7
8	0 ± 0,0	29 ± 0,6	96,7	28 ± 0,6	93,3
9	0 ± 0,0	30 ± 0,0	100,0	20 ± 5,8	66,7
10	3 ± 0,6	29 ± 0,6	96,7	29 ± 0,6	96,7
11	0 ± 0,0	27 ± 0,0	90,0	28 ± 0,6	93,3
12	0 ± 0,0	30 ± 0,0	100,0	29 ± 0,6	96,7
13	3 ± 0,6	29 ± 0,6	96,7	20 ± 0,6	66,7
14	0 ± 0,0	16 ± 2,5	53,3	22 ± 2,1	73,3

15	0 ± 0,0	19 ± 1,5	63,3	19 ± 1,2	63,3
16	0 ± 0,0	19 ± 3,1	63,3	10 ± 2,1	33,3
17	3 ± 0,6	17 ± 0,6	56,7	3 ± 1,7	10,0
18	0 ± 0,0	6 ± 2,6	20,0	0 ± 0,0	0,0
19	0 ± 0,0	4 ± 1,2	13,3	0 ± 0,0	0,0
20	0 ± 0,0	4 ± 0,6	13,3	3 ± 1,0	10,0
21	0 ± 0,0	2 ± 0,6	6,7	4 ± 1,5	13,3
22	0 ± 0,0	12 ± 3,5	40,0	8 ± 0,6	26,7
23	0 ± 0,0	9 ± 5,2	30,0	0 ± 0,0	0,0
24	0 ± 0,0	2 ± 0,6	6,7	0 ± 0,0	0,0
25	0 ± 0,0	2 ± 0,6	6,7	1 ± 0,6	3,3
26	0 ± 0,0	6 ± 1,0	20,0	1 ± 0,6	3,3
27	3 ± 0,6	2 ± 0,6	6,7	2 ± 0,0	6,7
28	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0,0	0 ± 0,0	0,0
29	0 ± 0,0	2 ± 1,2	6,7	0 ± 0,0	0,0
30	3 ± 0,6	1 ± 0,6	3,3	0 ± 0,0	0,0
31	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0,0	1 ± 0,6	3,3
32	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0,0	0 ± 0,0	0,0
33	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0,0	0 ± 0,0	0,0

O óleo de cravo autoemulsificado apresentou aproximadamente 100 % de mortalidade das larvas por 13 dias e o óleo encapsulado por 12 dias. A partir do 18º dia de teste, os valores de mortalidade foram inferiores a 50 % para os dois sistemas avaliados. O teste foi realizado e acompanhado até o dia em que nenhuma morte foi verificada.

Uma observação importante é que o óleo de cravo em sua forma livre não pode ser utilizado em sistemas aquosos em função da sua hidrofobicidade, assim, precisa estar disperso no meio para não formar uma película e asfixiar as larvas. Assim, o óleo de cravo sem nenhum tratamento, não pode ser aplicado como larvicida.

3.3.5.1 Óleo de cravo residual

Para quantificar a concentração de óleo de cravo residual no teste de eficiência da atividade larvicida ao longo do tempo em cada sistema, alíquotas de 100 µL foram retiradas dia a dia em triplicata de cada amostra do teste, sendo elas, óleo de cravo autoemulsificado com e sem larvas e nanoemulsão carregada com óleo de cravo com e sem larvas.

Após diluição das alíquotas, as amostras foram lidas em espectrofotômetro UV-vis e relacionou-se a concentração com a absorbância através de uma curva de calibração descrita no item 3.2.8.

Pode-se verificar através da eficiência de mortalidade obtida para os dois sistemas e a quantificação de óleo de cravo residual (os valores obtidos estão descritos no Apêndice A) que a curva de calibração utilizada não pode ser a mesma para os dois sistemas, uma nova curva de calibração nas condições da nanoemulsão carregada com óleo de cravo deve ser realizada a fim de que a quantificação do óleo residual possa ser feita de forma precisa, também, o equipamento utilizado (espectrofotômetro UV- vis) não foi o mais adequado, uma vez que as larvas estão em constante crescimento e liberam seus exoesqueletos e excreções na água, o que acaba aumentando a turbidez e modificando a coloração do meio, conseqüentemente prejudicando a quantificação de óleo de cravo.

3.4. CONCLUSÕES

As concentrações letais CL_{50} e CL_{90} do óleo de cravo autoemulsificado e em sistema de nanoencapsulação foram obtidas. Os valores para o óleo de cravo autoemulsificado foram $CL_{50} 60,0 \pm 3,5$ ppm e $CL_{90} 88,5 \pm 6,1$ ppm em 24 horas e $CL_{50} 53,7 \pm 3,1$ ppm e $CL_{90} 75,4 \pm 5,4$ ppm em 48 horas de exposição. A nanoemulsão carregada com óleo de cravo apresentou valores de $CL_{50} 99,6 \pm 4,2$ ppm e $CL_{90} 152,1 \pm 10,4$ ppm em 24 horas e $CL_{50} 87,3 \pm 3,8$ ppm e $CL_{90} 139,5 \pm 10,0$ ppm em 48 horas de exposição.

Segundo análise estatística não houve diferença significativa entre os tempos de exposição de 24 e 48 horas do teste larvicida.

Os valores das concentrações letais para o sistema de nanoemulsão carregada com óleo de cravo foram maiores em comparação ao óleo de cravo autoemulsificado, uma vez que o óleo de cravo está aprisionado nas gotas da nanoemulsão e não disponível de forma imediata.

No teste de eficiência da atividade larvicida ao longo do tempo o óleo de cravo autoemulsificado foi eficiente aproximadamente 100 % durante 13 dias e o óleo em sistema de nanoemulsão apresentou a mesma eficiência durante 12 dias.

CAPÍTULO IV

4 DESENVOLVIMENTO DE LÁTEX POLIMÉRICO COM IMPREGNAÇÃO EM SUBSTRATO TÊXTIL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REPELENTE EM *Aedes albopictus*.

4.1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo é apresentada a síntese de nanopartículas poliméricas carregadas com óleo de cravo através de polimerização em miniemulsão. O látex obtido (nanopartículas dispersas em água) foi caracterizado quanto ao tamanho de partícula, eficiência de encapsulação e estabilidade sob armazenagem.

O polímero obtido por polimerização em miniemulsão através dos monômeros estireno e acrilato de butila foi caracterizado em relação as massa molares, teor de gel e conversão. A incorporação do óleo de cravo na estrutura do polímero foi verificada por FTIR.

O látex obtido foi impregnado em substratos têxteis de algodão e sua atividade repelente foi avaliada em mosquitos da espécie *Ae. albopictus* e comparada ao óleo de cravo não encapsulado. A concentração final de óleo de cravo impregnada nos tecidos de algodão foi de 0,5 % para os dois sistemas avaliados.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Reagentes

Estireno (Sty), acrilato de butila (BuA), iniciador organossolúvel AIBN (Azobisisobutironitrila), surfactante aniônico lauril sulfato de sódio (SLS), coestabilizador (Crodamol™ GTCC), óleo essencial da folha de cravo (Ferquima), tensoativo aniônico (EM 8007), carbonato de sódio (Na_2CO_3) e água destilada.

4.2.2 Dispersão padrão de óleo de cravo

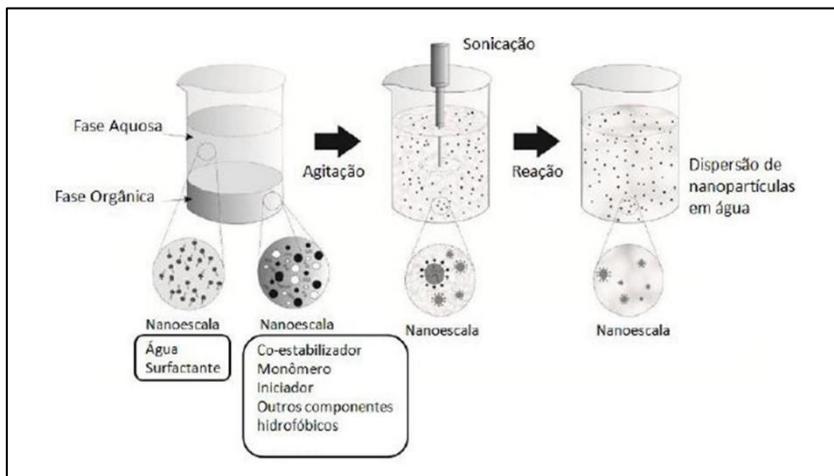
Uma dispersão padrão com concentração final de 0,5 % de óleo de cravo foi utilizada na impregnação do substrato têxtil, com o objetivo de avaliar a atividade repelente do óleo de cravo autoemulsificado. A metodologia de preparo utilizada com algumas modificações foi descrita por Santos et al. (2011).

4.2.3 Polimerização via miniemulsão

A fase aquosa foi preparada com o surfactante aniônico SLS (lauril sulfato de sódio) e água destilada. A fase orgânica foi preparada com os monômeros estireno (Sty) e acrilato de butila (BuA), iniciador organossolúvel AIBN, coestabilizador (Crodamol™ GTCC) com ou sem óleo de cravo. A fase orgânica foi agitada em agitador magnético por 30 minutos a 300 rpm para solubilizar completamente o iniciador. Após a solubilização, a fase aquosa foi vertida na fase orgânica e agitadas com agitador magnético por 30 minutos a 500 rpm formando uma emulsão. A emulsão formada foi sonicada em um dispersor ultrassônico (Fischer Scientific) por 4 minutos a uma amplitude de 60% em um regime de pulso de 15 segundos on e 5 segundos off em banho de gelo. A miniemulsão obtida (em um béquer de 25 mL) foi distribuída em tubos de vidro com tampa de rosca, aproximadamente 10 mL em cada tubo, e estes foram imersos em um banho termocriostático à temperatura de reação de 70 °C durante 6 horas. Na Tabela 6 estão descritos os reagentes utilizados nas formulações dos látices produzidos via polimerização em miniemulsão. O esquema do procedimento da polimerização em miniemulsão pode ser visualizado na Figura 20.

As reações de polimerização em miniemulsão foram realizadas no Laboratório de Controle e Processos de Polimerização (LCP), localizado na Universidade Federal de Santa Catarina.

Figura 20 – Esquema do procedimento de polimerização em miniemulsão.



Fonte: Adaptado de Hoelscher (2016).

Tabela 6 – Formulações dos látices obtidos via polimerização em miniemulsão a 70 °C durante 6 horas de reação. Formulações com 25 % de teor de sólidos e 10 % de óleo de cravo em relação à massa total de reagentes.

Reagentes (g)	Formulações			
	FC1	FC2*	FC3	FC4
<i>Fase orgânica</i>				
Estireno (Sty)	2,5	1,25	2,5	1,25
Acrilato de butila (BuA)	-	1,25	-	1,25
AIBN	0,05	0,05	0,05	0,05
Crodamol	2,45	2,45	0,45	0,45
Óleo de cravo (OC)	-	-	2	2
<i>Fase aquosa</i>				
SLS	0,025	0,025	0,025	0,025
Água destilada	15	15	15	15

* A formulação FC2 também será chamada de látex branco.

4.3 CARACTERIZAÇÃO

4.3.1 Conversão gravimétrica

Para calcular a conversão, 1 g de látex foi pesada e armazenada por 48 horas em uma estufa de convecção forçada a 60 °C para a completa evaporação do monômero não polimerizado.

4.3.2 Tamanho médio de partículas

O tamanho médio da intensidade das gotas (Dp) e o índice de polidispersão (PDI) foram determinados por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) usando um equipamento Zetasizer Nano S (Malvern Instruments, Worcester, Reino Unido). As amostras foram dispersas a 633 nm com um ângulo de 173 °. Uma gota de látex foi colocada em uma cubeta de quartzo e diluída em água destilada antes da medida.

4.3.3 Eficiência de encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação do óleo de cravo nas formulações dos látices foi calculada como a relação entre a quantidade de óleo preso e a quantidade inicial adicionada à emulsão. A quantificação de óleo livre na dispersão foi feita por ultracentrifugação utilizando filtro de limite de peso molecular nominal de 100 kDa (Amicon® Ultra, Millipore) acoplado a um Eppendorf. A análise foi realizada pela adição

de 300 µL de látex no Amicon® Ultra e centrifugado a 13,400 rpm por 10 minutos.

O látex com o óleo carregado foi retido pelo filtro e água e óleo livre foram permeados. Uma alíquota do permeado foi diluída em etanol, transferida para uma cubeta e analisada a 280 nm em espectrofotômetro UV-vis. Para o cálculo da eficiência de encapsulação do óleo de cravo carregado, foi utilizada a Equação 4.

$$EE \text{ óleo carregado (\%)} = \frac{c_{\text{inicial}} - c_{\text{livre}}}{c_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (4)$$

Onde, C_{inicial} é a quantidade inicial (mg) de óleo de cravo adicionado à miniemulsão e C_{livre} é a quantidade (mg) de óleo de cravo livre presente na alíquota filtrada e determinada por UV-vis.

4.3.4 Látex com corante fluorescente

Com o objetivo de comprovar que o óleo de cravo está aprisionado nas nanopartículas poliméricas do látex, preparou-se uma miniemulsão como descrita no item 4.2.3 juntamente com a adição de corante Coumarin 6 (corante hidrofóbico de cor verde) na fase orgânica. Após a etapa de polimerização, o látex foi analisado em microscópio óptico (Olympus BX41) com sistema de epifluorescência e filtro verde, com lente objetiva e magnificação de 400x.

A análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) no Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.3.5 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

As massas molares médias ponderais (M_w) e numérica (M_n) foram determinadas por análise de GPC. O preparo das amostras consistiu em diluir 0,02g de polímero em 4 mL de tetraidrofurano (THF), a solução obtida foi filtrada em um filtro de nylon, com poro de 0,45 micrometros (µm). O equipamento utilizado foi um cromatógrafo de alto desempenho (HPLC, modelo LC 20-A, Shimadzu) equipado com três colunas Shim Pack GPC 800 Series (GPC 801, GPC 804, GPC 807). Tetraidrofurano foi utilizado como eluente com vazão de 1 mL.min⁻¹ a 40 °C. Padrões de poliestireno com massas molares entre 580 a $9,225 \times 10^{-6}$ g.mol⁻¹ foram utilizadas na calibração do equipamento.

A análise foi realizada no Laboratório de Controle e Processos de Polimerização (LCP – UFSC).

4.3.6 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas no equipamento IRPrestige - 21 (Shimadzu), com transmitância na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras. Os polímeros obtidos foram macerados e misturados em pastilha de brometo de potássio (KBr) e posteriormente analisados. Esta análise permite detectar os grupos funcionais de cada composto.

4.3.7 Teor de gel

Para quantificar o teor de gel dos polímeros formados 0,02 g de cada formulação de látex (FC1, FC2 FC3 e FC4), previamente secas em estufa a 50 °C foram diluídas em 4 mL de THF. A solução obtida foi filtrada em um filtro de nylon com poro de 0,45 μm e este foi deixado em estufa a 50 °C até peso constante. O teor de gel foi calculado pela Equação 5. O gel é o produto formado em reações de reticulação das cadeias poliméricas, a reticulação ocorre quando cadeias lineares ou ramificadas são interligadas por ligações covalentes e produzem polímeros com elevada massa molar.

$$\text{Teor de gel (\%)} = \frac{\text{polímero reticulado}}{\text{massa de polímero}} \times 100 \quad (5)$$

Onde, polímero reticulado é a diferença entre o peso do filtro após evaporação e o filtro vazio.

4.4 SUBSTRATO TÊXTIL PARA IMPREGNAÇÃO EM FOULARD

O substrato têxtil utilizado na avaliação da repelência foi tecido 100 % algodão. Cada amostra de tecido foi confeccionada nas medidas de 25 cm por 33 cm. Para posterior teste de repelência utilizando os substratos têxteis, nas amostras de tecido, foram feitos 20 furos de 1 cm de diâmetro cada, com distância de 5 cm entre cada furo (Figura 21), segundo metodologia adaptada da Organização Mundial da Saúde (2013).

Figura 21 – Tecido 100 % algodão confeccionado para teste de repelência.



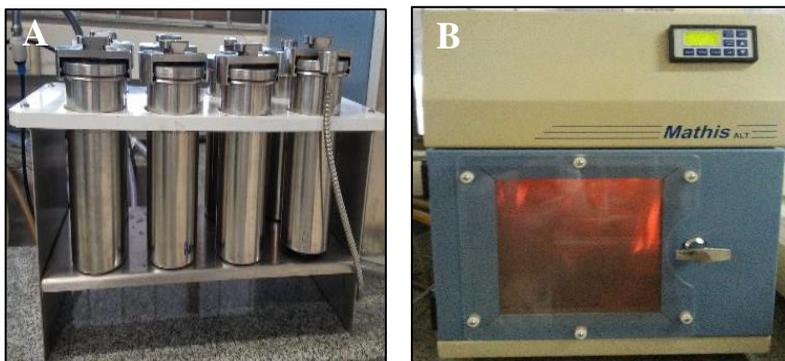
Fonte: Do autor (2017).

4.4.1 Purga

As amostras de tecido de algodão, já com os furos confeccionados, foram submetidas ao processo de purga em banho de canecos, com a finalidade de fazer a degomagem do tecido, eliminar gorduras, sujidades e demais impurezas e também deixar o tecido suficientemente hidrofílico para posterior etapa de impregnação. A purga foi realizada com tensoativo aniônico (EM 8007) na concentração de 10 g.L^{-1} e carbonato de sódio (Na_2CO_3) na concentração de 2 g.L^{-1} em um banho de canecos (Mathis - ALT), a uma temperatura de $70 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 40 minutos sob agitação. A metodologia utilizada foi a descrita por Oliveira (2015).

Na Figura 22 podem ser visualizados os equipamentos utilizados no processo de purga.

Figura 22 – Equipamento utilizados no processo de purga. (a) Canecos e (b) banho de canecos.



Fonte: Do autor (2017).

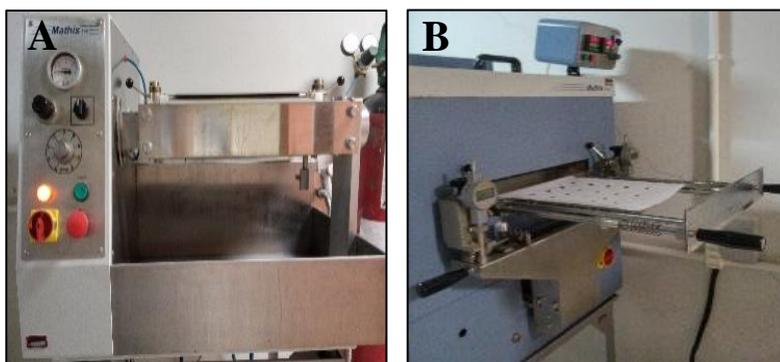
4.4.1.1 Impregnação em Foulard

A impregnação dos tecidos foi realizada em um foulard (Mathis - FVH). Após a impregnação, os tecidos foram secos em um forno de termofixação (rama), marca Mathis, modelo LTE-S. A metodologia utilizada foi semelhante à de Rodrigues et al. (2008). Depois de impregnados, os tecidos foram armazenados em sacos plásticos e mantidos a temperatura ambiente. Na Tabela 8 estão descritas as condições da impregnação e os equipamentos utilizados podem ser visualizados na Figura 23.

Tabela 7 - Condições do processo de impregnação dos tecidos.

Substrato	Tecido 100% algodão
Equipamento	Foulard
Pressão	1 bar
Velocidade do rolo	1 m/minuto
Volume de banho	0,2 L
Concentração de óleo de cravo	0,5 %
Pick-up	100 %
Condições de secagem	80 °C, por 5 minutos

Figura 23 – Equipamentos utilizados no processo de impregnação. (a) Foulard e (b) rama.



Fonte: Do autor (2017).

O processo de purga e impregnação dos tecidos foram realizados no Laboratório de Transferência de Massa (LabMASSA) localizado na Universidade Federal de Santa Catarina.

4.4.1.2 *Pick-up*

O termo *pick-up* refere-se em porcentagem quanto o tecido arrastou em massa do seu peso seco em banho e pode ser calculado através da Equação 6. (Oliveira, 2015).

$$Pick - up (\%) = \left(\frac{\text{peso tecido úmido} - \text{peso tecido seco}}{\text{peso tecido seco}} \right) \times 100 \quad (6)$$

Onde, peso tecido seco é o peso do tecido antes da rama.

4.4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O substrato têxtil com e sem impregnação de látex contendo óleo de cravo foi analisado em microscopia eletrônica de varredura (MEV), o equipamento utilizado foi o JEOL JSM-6390LV, com voltagem de aceleração de 10 kV, em diferentes magnificações. As amostras foram previamente recobertas com ouro pela técnica de *sputtering*. O equipamento está localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REPELENTE EM *Aedes albopictus*

No teste de avaliação da atividade repelente, foram utilizados 15 mosquitos fêmea da espécie *Ae. albopictus* sem alimentação prévia com repasto sanguíneo. Os mosquitos utilizados no teste pertencem ao grupo de mosquitos descrito na seção 3.2.5 do Capítulo 3.

4.5.1 Substratos avaliados no teste de repelência

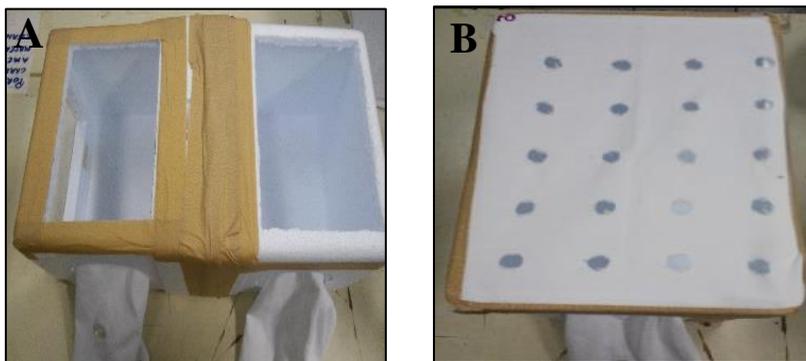
No teste de repelência, foram avaliados os seguintes substratos: tecido 100 % algodão somente com processo de purga (tecido branco), tecido impregnado com dispersão padrão de óleo na concentração final de 0,5 % de óleo de cravo, tecido impregnado com látex branco (formulação FC2) e tecido impregnado com látex na concentração final de óleo de cravo de 0,5 % (formulação FC4).

4.5.1.1 Teste de repelência

Na Figura 24 é mostrado o aparato experimental utilizado no teste de repelência. O aparato consiste em duas caixas de isopor com medidas de 29 cm por 21 cm, com dois orifícios, um para colocar os mosquitos na caixa e outro para colocação da mão (estímulo). Na Figura 23b é mostrado o tecido pronto para avaliação da repelência, que é colocado entre as duas caixas de isopor e unidas com fita adesiva.

Cada substrato foi avaliado em triplicata, durante 45 minutos de exposição. Os testes de repelência foram realizados no dia 0 (dia da impregnação dos substratos), 7; 14 e 21 dias após impregnação. A metodologia utilizada no teste foi adaptada da Organização Mundial da Saúde (2013).

Figura 24 – (a) Aparato para realização do teste de repelência e (b) tecido para teste.



Fonte: Do autor (2017).

Para o cálculo do índice de repelência a Equação 7 foi utilizada.

$$\text{Índice de repelência (\%)} = \frac{X-Y}{Z} \times 100 \quad (7)$$

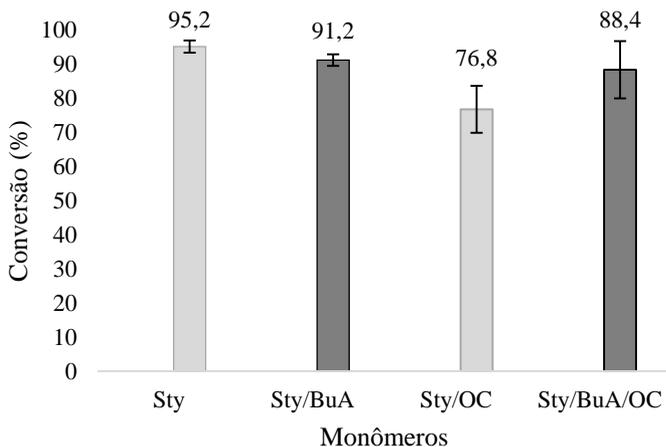
Onde, X é o número de mosquitos repelidos nos tecidos tratados, Y é o número de mosquitos repelidos nos brancos e Z é o número total de mosquitos utilizados no teste.

4.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.6.1 Conversão dos monômeros em polímeros

A conversão dos monômeros em polímeros pode ser observada na Figura 25.

Figura 25 – Conversão dos monômeros em polímeros através de reação de polimerização em miniemulsão à 70 °C por 6 horas.



A partir dos resultados de conversão obtidos por reação de polimerização em miniemulsão; quando o óleo de cravo foi incorporado na formulação observa-se uma diminuição da conversão. Isto ocorre porque o eugenol, composto majoritário do óleo de cravo, apresenta atividade antioxidante e captura radicais livres presente no meio reacional, inibindo a reação de polimerização via radicais livres (FUJISAWA; KADOMA, 1997). Para o processo de impregnação do substrato têxtil e avaliação da atividade repelente as formulações contendo poliestireno, poliácrlato de butila e óleo de cravo foram utilizadas devido as propriedades adquiridas dos polímeros, como maleabilidade, elasticidade e aderência.

4.6.2 Diâmetro de partícula (Dp), estabilidade e eficiência de encapsulação (EE)

O tamanho de partícula (Dp), dispersão (PDI) e eficiência de encapsulação (EE) dos látices obtidos com diferentes monômeros via polimerização em miniemulsão estão descritas na Tabela 9.

Tabela 8 – Tamanho de partícula (Dp), dispersão (PDI) e eficiência de encapsulação (EE) dos látices obtidos por miniemulsão utilizando diferentes monômeros.

		Formulação			
Dia		Sty	Sty/BuA	Sty/OC	Sty/BuA/OC
Dp (nm)	0	129,6 ±0,6	138,9±2,1	144,8±0,5	142,9±0,6
	7	128,7±0,4	138,4±0,9	144,5±0,1	142,5± 1,3
	60	128,3±0,2	136,7±0,2	141,3±0,3	143,6 ± 0,6
PDI	0	0,105±0,002	0,091 ± 0,008	0,090 ± 0,009	0,098 ± 0,024
	7	0,114±0,002	0,115 ± 0,035	0,103 ± 0,013	0,112 ± 0,014
	60	0,086±0,011	0,087 ± 0,007	0,105 ± 0,001	0,102 ± 0,003
EE(%)	0	-	-	84,0	87,7
	7	-	-	82,6	84,1
	60	-	-	82,9	85,9

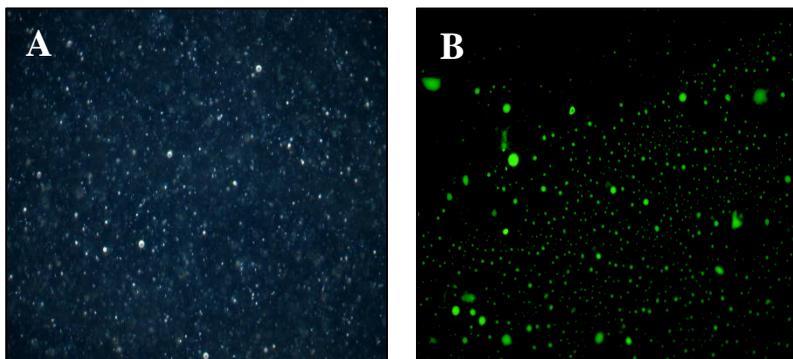
Observa-se que o tamanho de partículas não sofre alterações com o passar do tempo, assim como o índice de polidispersão também não é alterado e após a polimerização altos níveis de encapsulação do óleo de cravo são obtidos, os quais se mantêm constantes ao longo do tempo. Estes dados estão relacionados a alta estabilidade coloidal do látex, o qual não sofreu modificações no período avaliado.

4.6.3 Nanopartículas poliméricas fluorescentes

Na Figura 26 podem ser visualizadas as nanopartículas de óleo de cravo presentes no látex, utilizando microscópio óptico e magnificação de 400x. As duas figuras são da mesma amostra de látex, porém, de

regiões diferentes. A Figura (a) foi tirada em fundo escuro e a Figura (b) em fundo verde.

Figuras 26 – Nanopartículas carregadas com óleo de cravo. (a) Látex em fundo escuro e (b) látex em fundo verde.



Fonte: Do autor (2017).

A partir das imagens obtidas pode-se afirmar que as nanopartículas carregadas com óleo de cravo estão presentes na formulação do látex.

4.6.4 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

Na Tabela 10 estão descritos os valores de pesos molecular dos polímeros obtidos.

Tabela 9 – Peso molecular numérico médio e ponderal dos polímeros obtidos via miniemulsão.

Formulação	Mn* (kDa)	Mw** (kDa)
Sty	68,5	438,6
Sty/BuA	75,5	294,4
Sty/OC	16,6	30,6
Sty/BuA/OC	17,8	34,9

Mn* = peso molecular numérico médio

Mw** = peso molecular ponderal médio

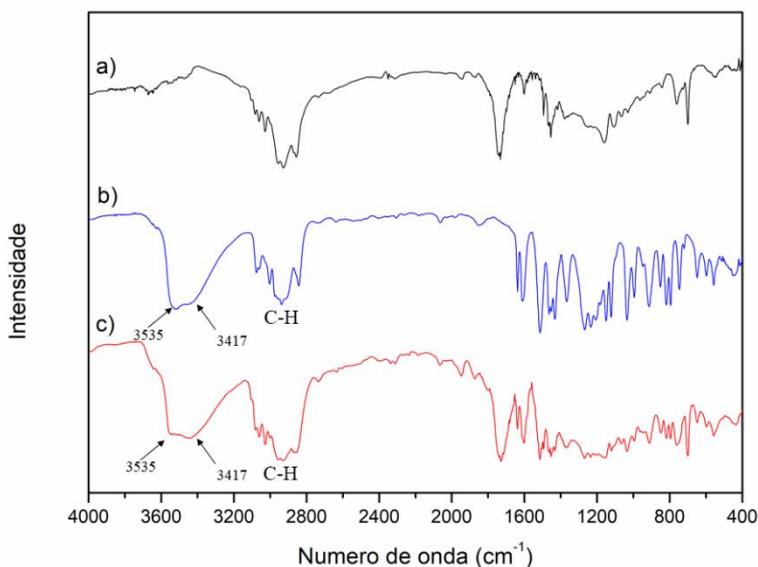
De acordo com a análise, nas formulações sem a presença de óleo de cravo altos valores de peso molecular dos polímeros são obtidos, já,

nas formulações com o óleo de cravo, por este apresentar insaturações em sua estrutura, o eugenol age como um agente terminador de cadeia no processo de polimerização em miniemulsão via radicais livre levando assim a baixas massas molares dos polímeros formados (STEINMACHER et al., 2010; BRESOLIN, 2013).

4.6.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR obtidos para os polímeros e para o eugenol podem ser visualizados na Figura 27.

Figura 27 – Espectros de FTIR obtidos. (a) Espectro do poliestireno e poliácrlato de butila. (b) Espectro do óleo de cravo. (c) Espectro do poliestireno, poliácrlato de butila e óleo de cravo.



Com os espectros dos polímeros obtidos via polimerização em miniemulsão a partir do estireno, acrilato de butila e óleo de cravo, na Figura (c) pode-se confirmar a presença de grupos químicos funcionais do eugenol (Figura b).

O espectro de FTIR obtido para o eugenol mostra as bandas para os modos vibracionais de alongamento dos grupos hidroxila (OH) e dos anéis aromáticos que são típicos no intervalo de 3100 cm^{-1} a 3600 cm^{-1} e

se fazem presentes na estrutura química do eugenol. A banda em 3535 cm^{-1} e 3417 cm^{-1} estão associadas aos modos de vibração do anel aromático e grupos OH respectivamente, estas bandas são sinais característico das moléculas de eugenol. O conjunto de bandas próximo de 3000 cm^{-1} correspondem aos modos vibracionais de estiramento das ligações de hidrocarbonetos (C-H) presente nas moléculas de eugenol (GARG et al., 2010; PILETTI et al., 2017).

Na Figura (c) o espectro de FTIR obtido para os polímeros poliestireno e poliacrilato de butila confirmam a presença da incorporação do óleo de cravo na sua estrutura química.

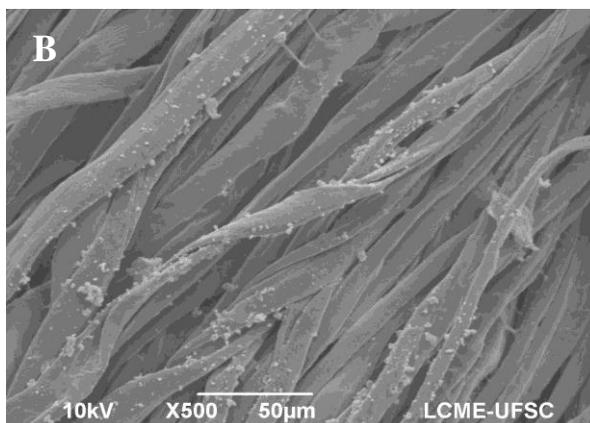
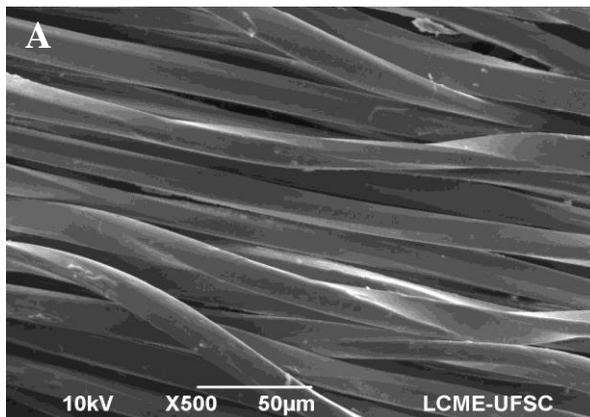
4.6.6 Teor de gel

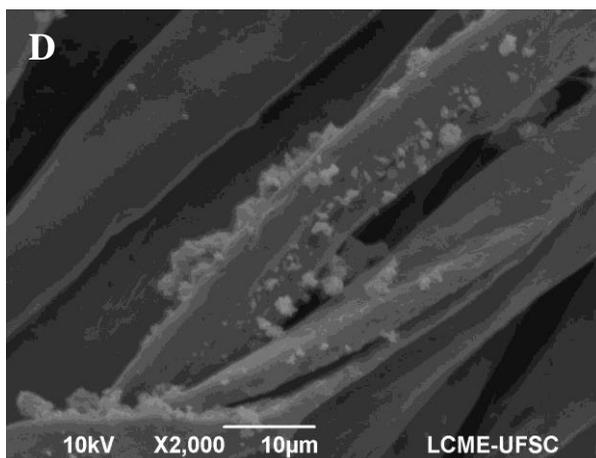
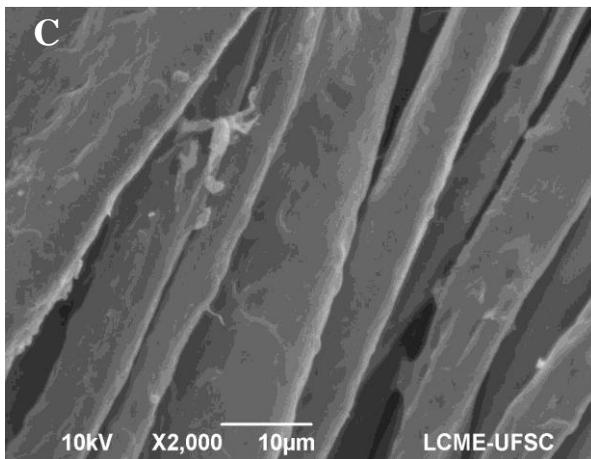
O teor de gel foi calculado de acordo com a Equação 5 e os valores obtidos foram abaixo de 5 % e encontram-se dentro da faixa de erro da medida.

4.6.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A fim de verificar a presença das nanopartículas poliméricas carregadas com óleo de cravo no substrato têxtil após o processo de impregnação, micrografias do tecido seco em rama após impregnação do látex foram realizadas e podem ser visualizadas na Figura 28.

Figura 28 – Micrografias dos tecidos de algodão sem tratamento e impregnados com nanopartículas de óleo de cravo. (a) e (c) Tecidos de algodão sem tratamento nas magnificações de 500 e 2000x. (b) e (d) Tecidos de algodão impregnados com nanopartículas de óleo de cravo com magnificações de 500 e 2000x.





Através das micrografias pode-se verificar a presença das nanopartículas de óleo de cravo impregnadas no tecido de algodão após secagem do tecido em rama a 80° C. Observam-se aglomerados de nanopartículas no tecido em função da evaporação da água do látex.

4.6.8 Atividade repelente em *Aedes albopictus*

Os substratos descritos no item 4.5.1 foram submetidos a um teste de repelência com 15 mosquitos fêmea de *Ae. albopictus*, cada substrato foi avaliado em triplicata durante 45 minutos de exposição, os testes de

repelência foram realizados no dia da impregnação (dia 0) e 7; 14 e 21 dias após a impregnação. No teste eram contabilizados quantos mosquitos fêmea passavam de um compartimento do aparato experimental para o outro através dos furos nos substratos avaliados. A média de mosquitos repelidos e os índices de repelência estão descritos na Tabela 11.

Tabela 10 – Média de mosquitos repelidos e índice de repelência dos substratos têxteis avaliados em *Aedes albopictus*.

Dias após impregnação	Média mosquitos repelidos				Índice de repelência (%)		
	Tecido branco	Tecido OC Autoemulsificado	Látex branco**	Tecido Látex OC	Tecido impregnado com OC	Tecido impregnado com Látex OC	Tecido impregnado com Látex OC
0*	9,3±2,9	9,7±3,8	9,0±2,6	8,0±1,7	2	0	0
7	8,0±3,6	10,7±3,2	7,3±4,2	9,7±2,5	17,8	15,6	15,6
14	8,3±3,2	12,0±2,0	9,3±2,0	11,3±3,0	24,4	13,3	13,3
21	10,6±3,5	11,0±2,0	9,3±2,5	9,3±2,5	4,4	0	0

* No dia da impregnação.

** Formulação FC2

A partir dos resultados obtidos pode-se observar que o tecido impregnado com óleo de cravo autoemulsificado foi mais eficiente como repelente em comparação ao óleo de cravo encapsulado (látex). Porém, quando se avalia separadamente a média de mosquitos nos controles (tecido branco e látex branco) em alguns dias de teste o controle apresentou maior atividade repelente do que o sistema com o agente repelente (óleo de cravo).

Alguns fatores podem ter contribuído para este resultado, como por exemplo: os testes não foram realizados sempre na mesma sala, a temperatura da sala de testes não era controlada, o aparato experimental (caixas de isopor) eram as mesmas utilizadas tanto para os tecidos brancos como para os sistemas com óleo de cravo, isto, pode ter levado a uma contaminação do sistema com óleo de cravo, devido ser volátil e apresentar odor marcante, uma vez que o tecido contendo o óleo entrou em contato com a caixa, esta pode permanecer com o cheiro de óleo de cravo, e qualquer indicio de óleo pode afetar nos testes seguintes, porque é através dos receptores olfatórios (antenas) que os mosquitos capturam odores e este os repele. Também, a criação de mosquitos *Ae. albopictus* usada nos testes já estava sendo utilizada e mantida há praticamente um ano, novos mosquitos eram introduzidos na criação para evitar a homozigose e garantir a variabilidade genética dos mosquitos, mas a criação utilizada poderia já estar debilitada ou susceptível e os resultados não podem ser relacionados somente ao efeito repelente do óleo de cravo. Desta forma, os dados obtidos no índice de repelência para cada sistema não podem ser validados, conseqüentemente, novos ensaios com caráter investigativo precisam ser realizados e as condições de testes e variáveis devem ser controladas e minimizadas para que interferências não ocorram.

4.4 CONCLUSÕES

Nanopartículas poliméricas carregadas com óleo de cravo foram obtidas através de polimerização em miniemulsão, apresentando diâmetro médio entre 120 e 150 nm. Elevada eficiência de encapsulação, maior que 80 % e o látex obtido apresentou estabilidade coloidal durante o período avaliado de dois meses.

O óleo de cravo foi encapsulado como pode ser visualizado nas imagens de microscopia e incorporado na cadeia polimérica.

O látex obtido foi eficientemente impregnado em substratos têxteis de algodão, sendo confirmado nas micrografias de microscopia eletrônica de varredura.

Os índices da atividade repelente dos substratos têxteis avaliados foram baixos, devido o tecido de algodão sem tratamento ter apresentado repelência, devido possível contaminação do aparato experimental, desta forma novos ensaios com maior controle das variáveis que podem ter levado a este resultado precisam ser controladas e minimizadas.

CAPÍTULO V

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, as concentrações letais CL_{50} e CL_{90} do óleo de cravo em diferentes sistemas de encapsulação foram determinadas, sendo que o sistema de nanoemulsão apresentou os maiores valores devido o óleo estar aprisionado nas gotas.

A partir da CL_{90} do óleo de cravo autoemulsificado ter sido determinada, um teste para verificar a eficiência da atividade larvicida do óleo de cravo nos diferentes sistemas ao longo do tempo foi realizado utilizando-se duas vezes o valor da CL_{90} com o objetivo de se verificar inicialmente a mortalidade de 100 % das larvas do mosquito *Ae. albopictus*. O óleo de cravo autoemulsificado apresentou eficiência de aproximadamente 100 % durante 13 dias e o óleo de cravo em nanoemulsão apresentou a mesma eficiência por 12 dias. O teste foi acompanhado durante 33 dias, em que nos últimos dois dias nenhuma mortalidade foi verificada.

A concentração de óleo de cravo residual nas dispersões remanescentes do teste de eficiência de atividade ao longo do tempo não pode ser eficientemente determinada por UV-vis, devido ser necessário a realização de uma curva de calibração nas condições da nanoemulsão e porque as larvas estão em constante desenvolvimento liberando seu exoesqueleto e excreções, o que aumenta a turbidez do meio, prejudicando a leitura da absorbância. Um método de quantificação alternativo poderia ser feito através de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC).

Também foi desenvolvido um látex carregado com óleo de cravo por polimerização em miniemulsão, este apresentou diâmetro de partícula entre 120 e 150 nm, eficiência de encapsulação maior que 80 % e manteve sua estabilidade coloidal no período avaliado de dois meses.

Através dos espectros de FTIR verificou-se a incorporação do óleo de cravo na estrutura do polímero obtido através dos monômeros estireno e acrilato de butila.

O látex com nanopartículas de óleo de cravo foi eficientemente impregnado em substratos de algodão utilizando-se um equipamento do tipo foulard, a partir das micrografias do tecido com o tratamento verifica-se a incorporação das nanopartículas poliméricas e a formação de aglomerados em função da evaporação da água presente no látex.

Como etapa final deste trabalho, o substrato têxtil de algodão impregnado com o látex obtido foi avaliado quanto a sua atividade repelente e comparado ao óleo de cravo autoemulsificado impregnado. Os resultados da atividade repelente não foram validados, devido o tecido sem tratamento ter apresentado repelência, devido provável contaminação do aparato experimental, desta forma, novos ensaios de caráter investigativo precisam ser realizados bem como a minimização e controle das variáveis presentes durante o teste.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros, destacam-se:

- Encapsular diferentes compostos e óleos essenciais com ação larvicida, repelente e ovicida pela técnica de polimerização em miniemulsão.
- Avaliar a atividade repelente de outros óleos essenciais e compostos químicos após impregnação em diferentes substratos têxteis.
- Incorporar nanopartículas poliméricas contendo agente larvicida e repelente em formulações de tinta para revestimento.
- Avaliar a atividade repelente das tintas obtidas em diferentes superfícies.
- Avaliar a liberação dos agentes encapsulados.

CAPÍTULO VI

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D. L. Utilização de óleos essenciais como tecnologia alternativa aos inseticidas sintéticos para o controle do *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE). **Dissertação de Mestrado**, p. 57, 2011.

ANDERSON, K. B.; THOMAS, S. J.; ENDY, T. P. The emergence of zika virus a narrative review. **Annals of Internal Medicine**, v. 165, n. 3, p. 175–183, 2016.

ANTONIETTI, M.; LANDFESTER, K. Polyreactions in miniemulsions. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 27, n. 4, p. 689–757, 2002.

ARAÚJO, H. R. C. de A. Caracterização morfológica dos hemócitos do *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus* e a resposta imune dos hemócitos do *Aedes aegypti* após a infecção pelo Dengue virus. **Tese de doutorado**, p. 1–191, 2011.

ASBAHANI, A. El; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; ADDI, E. H. A.; CASABIANCA, H.; MOUSADIK, A. El; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAISSARI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 2015.

ASSAMI, K.; PINGRET, D.; CHEMAT, S.; MEKLATI, B. Y.; CHEMAT, F. Ultrasound induced intensification and selective extraction of essential oil from *Carum carvi* L. seeds. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 62, p. 99–105, 2012.

ASUA, J. M. Miniemulsion polymerization. **Progress in Polymer Science**, v. 27, n. 7, p. 1283–1346, 2002.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BARBOSA, J. D.; SILVA, V. B.; ALVES, P. B.; GUMINA, G.; SANTOS, R. L.; SOUSA, D. P.; CAVALCANTI, S. C. Structure-activity relationships of eugenol derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Pest Management Science**, v. 68, n. 11, p.

1478–1483, 2012.

BHAT, S. K.; KEMPRAJ, V. Biocidal potential of clove oils against *Aedes albopictus* - A comparative study. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 24, p. 6933–6937, 2009.

BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; JAENISCH, T.; WINT, G. R. W.; SIMMONS, C. P.; SCOTT, T. W.; FARRAR, J. J.; HAY, S. I. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–7, 2013.

BRESOLIN, C. D. C. Modelagem matemática e validação experimental de reações de polimerização em miniemulsão com iniciador organossolúvel. **Tese de doutorado**, p. 156, 2013.

CALDERÓ, G.; GARCÍA-CELMA, M. J.; SOLANS, C. Formation of polymeric nano-emulsions by a low-energy method and their use for nanoparticle preparation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 353, n. 2, p. 406–411, 2011.

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015.

CANTRELL, L.; PRIDGEON, J. W.; FRONCZEK, F. R.; BECNEL, J. J. Structure – Activity Relationship Studies on Derivatives of Eudesmanolides from *Inula helenium* as Toxicants against *Aedes aegypti* Larvae and Adults Although there is a safe and effective vaccine for the yellow fever virus , epidemic transmission still occ. **Chemistry and biodiversity**, v. 7, p. 1681–1697, 2010.

CONSOLI, ROU TRAUT AGB & LOURENÇO DE OLIVEIRA, R.; CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no brasil**. [s.l.: s.n.]

CORTÉS-ROJAS, D. F.; DE SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Clove (*Syzygium aromaticum*): A precious spice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 2, p. 90–96, 2014.

DELMAS, T.; PIRAUX, H.; COUFFIN, A. C.; TEXIER, I.; VINET, F.; POULIN, P.; CATES, M. E.; BIBETTE, J. How to prepare and stabilize very small nanoemulsions. **Langmuir**, v. 27, n. 5, p. 1683–1692, 2011.

DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: Review. **Parasitology Research**, v. 113, n. 2, p. 565–592, 2014.

DIMA, C.; DIMA, S. Essential oils in foods: Extraction, stabilization, and toxicity. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 29–35, 2015.

DUARTE, J. L.; AMADO, J. R. R.; OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; CRUZ, R. A. S.; FERREIRA, A. M.; SOUTO, R. N. P.; FALC??O, D. Q.; CARVALHO, J. C. T.; FERNANDESA, C. P. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 2, p. 189–192, 2015.

ENAN, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 130, p. 325–337, 2001.

FATHI, M.; MARTÍN, Á.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 39, n. 1, p. 18–39, 2014.

FATHI, M.; MOZAFARI, M. R.; MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 23, n. 1, p. 13–27, 2012.

FAYEMIWO, K. A.; ADELEKE, M. A.; OKORO, O. P.; AWOJIDE, S. H.; AWONIYI, I. O. Larvicidal efficacies and chemical composition of essential oils of *Pinus sylvestris* and *Syzygium aromaticum* against mosquitoes. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 1, p. 30–34, 2014.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KÜHNLE, A. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, n. 1–3, p. 53–58, 2004.

FUJISAWA, S.; KADOMA, Y. Action of eugenol as a retarder against polymerization of methyl methacrylate by benzoyl peroxide. **Biomaterials**, v. 18, n. 9, p. 701–703, 1997.

GARG, A.; GUPTA, B.; PRAKASH, R.; SINGH, S. Preparation and characterization of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex of eugenol: differential pulse voltammetry and (1)H-NMR. **Chemical &**

pharmaceutical bulletin, v. 58, n. October, p. 1313–1319, 2010.

GARG, A.; SINGH, S. Enhancement in antifungal activity of eugenol in immunosuppressed rats through lipid nanocarriers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 87, n. 2, p. 280–288, 2011.

GAVAHIAN, M.; FARAHNAKY, A.; FARHOOSH, R.; JAVIDNIA, K.; SHAHIDI, F. Extraction of essential oils from *Mentha piperita* using advanced techniques: Microwave versus ohmic assisted hydrodistillation. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 50–58, 2015.

GOODYER, L. I.; CROFT, A. M.; FRANCES, S. P.; HILL, N.; MOORE, S. J.; ONYANGO, S. P.; DEBBOUN, M. Expert review of the evidence base for arthropod bite avoidance. **Journal of Travel Medicine**, v. 17, n. 3, p. 182–192, 2010.

GRAYSON, D. H. Monoterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 17, n. 4, p. 385–419, 2000.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 3, p. 480–96, 1 jul. 1998.

GÜLÇİN, I.; ELMASTAŞ, M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Antioxidant activity of clove oil - A powerful antioxidant source. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 489–499, 2012.

GUPTA, A.; ERAL, H. B.; HATTON, T. A.; DOYLE, P. S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft matter**, v. 12, n. 11, p. 2826–2841, 2016.

HANUS, M. J.; HARRIS, A. T. Nanotechnology innovations for the construction industry. **Progress in Materials Science**, v. 58, n. 7, p. 1056–1102, 2013.

ISMAN, M. B. Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World. **Annu.rev.Entomol.**, v. 51, p. 45–66, 2005.

KAMATOU, G. P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M. Eugenol - From the remote Maluku Islands to the international market place: A review of a remarkable and versatile molecule. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6953–6981, 2012.

- KATZ, T. M.; MILLER, J. H.; HEBERT, A. A. Insect repellents: Historical perspectives and new developments. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 5, p. 865–871, 2008.
- LAHLOU, M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 6, p. 435–448, 2004.
- LEE, J. H.; YEO, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. **Chemical Engineering Science**, v. 125, p. 75–84, 2015.
- LEONOR DUARTE PINHO. Protecção individual à picada de mosquitos: avaliação laboratorial e no campo do efeito repelente de vestuário tratado com inseticidas ou repelentes. **Dissertação de Mestrado**, p. 102, 2011.
- LÓPEZ, Ó.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. G.; GIL, M. V. New trends in pest control: the search for greener insecticides. **Green Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 431, 2005.
- MAIA, M. F.; MOORE, S. J. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. **Malaria journal**, v. 10 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S11, 2011.
- MARY KAY KINDHAUSER; TOMAS ALLEN; VERONIKA FRANK; RAVI SHANKAR SANTHANA; CRISTOPHER DYE. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. **World Health Organization**, n. April, p. 675–686, 2016.
- MASON, T. G.; WILKING, J. N.; MELESON, K.; CHANG, C. B.; GRAVES, S. M. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, n. 41, p. R635–R666, 2006.
- MENESES, A. C. de. ENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO DE CRAVO EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS E POLIMÉRICAS EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE Dissertação. **Dissertação de Mestrado**, p. 117, 2016.
- NAQQASH, M. N.; GÖKÇE, A.; BAKHSH, A.; SALIM, M. Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. **Parasitology Research**, v. 115, n. 4, p. 1363–1373, 2016.
- NASCIMENTO, A. A. Óleo essencial dos botões florais do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*): extração, caracterização e atividade

larvicida frente ao *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). **Dissertação de mestrado**, 78, 2012.

NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 372–378, 2010.

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 174–187, 2015.

PILETTI, R.; BUGIERECK, A. M.; PEREIRA, A. T.; GUSSATI, E.; DAL MAGRO, J.; MELLO, J. M. M.; DALCANTON, F.; TERNUS, R. Z.; SOARES, C.; RIELLA, H. G.; FIORI, M. A. Microencapsulation of eugenol molecules by β -cyclodextrine as a thermal protection method of antibacterial action. **Materials Science and Engineering: C**, 2017.

PISANO, M.; PAGNAN, G.; LOI, M.; MURA, M. E.; TILOCCA, M. G.; PALMIERI, G.; FABBRI, D.; DETTORI, M. A.; DELOGU, G.; PONZONI, M.; ROZZO, C. Antiproliferative and pro-apoptotic activity of eugenol-related biphenyls on malignant melanoma cells. **Molecular cancer**, v. 6, p. 8, 2007.

RĂILEANU, M.; TODAN, L.; VOICESCU, M.; CIUCULESCU, C.; MAGANU, M. A way for improving the stability of the essential oils in an environmental friendly formulation. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 6, p. 3281–3288, 2013.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J. T. Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 57, p. 405–424, 2012.

REHMAN, J. U.; ALI, A.; KHAN, I. A. Plant based products: Use and development as repellents against mosquitoes: A review. **Fitoterapia**, v. 95, p. 65–74, 2014.

RODRIGUES, E. da C. R.; FERREIR, A. M.; VILHEN, J. C. E.; ALMEIDA, F. B.; CRUZ, R. A. S.; FLORENTINO, A. C.; SOUTO, R. N. P.; CARVALHO, J. C. T.; FERNANDES, C. P. Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (*Copaifera duckei*) oleoresin. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 6, p. 699–705, 2014.

RODRIGUES, S. N.; FERNANDES, I.; MARTINS, I. M.; MATA, V. G.; BARREIRO, F.; RODRIGUES, A. E. Microencapsulation of

limonene for textile application. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 47, n. 12, p. 4142–4147, 2008.

SAMPAIO, S.; BISHOP, D.; SHEN, J. Physical and chemical properties of flax fibres from stand-retted crops desiccated at different stages of maturity. **Industrial Crops and Products**, v. 21, n. 3, p. 275–284, 2005.

SANTOS, S. R. L.; MELO, M. A.; CARDOSO, A. V.; SANTOS, R. L. C.; DE SOUSA, D. P.; CAVALCANTI, S. C. H. Structure-activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. **Chemosphere**, v. 84, n. 1, p. 150–153, 2011.

SANTOS, S. R. L.; SILVA, V. B.; BARBOSA, J. D. F. Toxic Effects on and Structure-Toxicity Relationships of Phenylpropanoids , Terpenes , and Related Compounds. **Vector-borne and zoonotic diseases**, v. 10, n. 10, p. 1049–1054, 2010.

SCHORK, F. J.; LUO, Y.; SMULDERS, W.; RUSSUM, J. P.; BUTTÉ, A.; FONTENOT, K. Miniemulsion polymerization. **Advances in Polymer Science**, v. 175, p. 129–255, 2005.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; SILVA, V. B.; SANTOS, S. R. L.; CAVALCANTI, S. C. H.; MENDONÇA, F. J. B. J. Chemometric studies on potential larvicidal compounds against *Aedes aegypti*. **Medicinal chemistry (Sharīqah (United Arab Emirates))**, v. 10, n. 2, p. 201–210, 2014.

SEVERINO, P.; PINHO, S. C.; SOUTO, E. B.; SANTANA, M. H. A. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic-lipophilic balance of stearic acid and stearic acid-capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 1, p. 125–130, 2011.

SHAHID-UL-ISLAM; SHAHID, M.; MOHAMMAD, F. Perspectives for natural product based agents derived from industrial plants in textile applications - A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 57, p. 2–18, 2013.

SHAN, B.; CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. **J. Agric. Food Chem.**, n. 53, p. 7749–7759,

2005.

SILVA, P. T. Da; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R. De; HOLKEM, A. T.; SCHWAN, C. L.; WIGMANN, É. F.; BASTOS, J. D. O.; SILVA, C. D. B. Da. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1304–1311, 2014.

SIVANATHAN, M. M. The Ecology and Biology of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) and the Resistance Status of *Aedes albopictus* (field strain) Against Organophosphates in Penang, Malaysia. **Masters dissertation**, n. June, p. 44, 2006.

SMOLKOVA, B.; EL YAMANI, N.; COLLINS, A. R.; GUTLEB, A. C.; DUSINSKA, M. Nanoparticles in food: Epigenetic changes induced by nanomaterials and possible impact on health. **Food and Chemical Toxicology**, v. 77, p. 64–73, 2015.

SOLÈ, I.; MAESTRO, A.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Optimization of nano-emulsion preparation by low-energy methods in an ionic surfactant system. **Langmuir**, v. 22, n. 20, p. 8326–8332, 2006.

SOLIGNAT, M.; GAY, B.; HIGGS, S.; BRIANT, L.; DEVAUX, C. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 2, p. 183–197, 2009.

SOUZA, T. M.; CUNHA, A. P.; FARIAS, D. F.; MACHADO, L. K.; MORAIS, S. M.; RICARDO, N. M. P. S.; CARVALHO, A. F. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* of m-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds. **Pest Management Science**, v. 68, n. 10, p. 1380–1384, 2012.

SPECOS, M. M. M.; GARCÍA, J. J.; TORNESELLO, J.; MARINO, P.; VECCHIA, D. M.; TESORIERO, D. M. V.; HERMIDA, L. G. Microencapsulated *citronella oil* for mosquito repellent finishing of cotton textiles. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 10, p. 653–658, 2010.

STEINMACHER, F. R.; BERNARDY, N.; MORETTO, J. B.; BARCELOS, E. I.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Kinetics of MMA and VAc miniemulsion polymerizations using miglyol and castor oil as hydrophobe and liquid core. **Chemical Engineering and Technology**,

v. 33, n. 11, p. 1877–1887, 2010.

WEBB, J. L. A. *Aedes aegypti* suppression in the Americas: historical perspectives. **The Lancet**, v. 388, n. 10044, p. 556–557, 2016.

WHO. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. **World Health Organization**, p. 1–41, 2005.

WHO. Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012–2020. **World Health Organization**, p. 43, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance. **World Health Organization**, v. 1, n. 6, p. 1–104, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for laboratory and field-testing of long-lasting insecticidal nets. **Who/Htm/Ntd/Whopes/2013.1**, p. 93, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. A global brief on vector-borne diseases. **World Health Organization**, p. 9, 2014.

XIE, S.; TAO, Y.; PAN, Y.; QU, W.; CHENG, G.; HUANG, L.; CHEN, D.; WANG, X.; LIU, Z.; YUAN, Z. Biodegradable nanoparticles for intracellular delivery of antimicrobial agents. **Journal of Controlled Release**, v. 187, p. 101–117, 2014.

XIE, Y.; YANG, Z.; CAO, D.; RONG, F.; DING, H.; ZHANG, D. Antitermitic and antifungal activities of eugenol and its congeners from the flower buds of *Syzygium aromaticum* (clove). **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 780–786, 2015.

XUE, J.; MICHAEL DAVIDSON, P.; ZHONG, Q. Antimicrobial activity of thyme oil co-nanoemulsified with sodium caseinate and lecithin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 210, p. 1–8, 2015.

APÊNDICE A – Concentração de óleo de cravo residual

Tabela 6 – Concentração residual de óleo de cravo em diferentes sistemas.

Concentração de OC residual (mg.ml ⁻¹) nos diferentes sistemas				
Dia	OC autoemulsificado sem larva	OC autoemulsificado com larva	Nano OC sem larva	Nano OC com larva
0	0,177	0,073	0,046	0,038
1	0,200	0,091	0,048	0,042
2	0,210	0,119	0,052	0,038
3	0,216	0,112	0,039	0,021
4	0,325	0,242	-0,110	-0,086
5	0,312	0,239	-0,110	-0,077
6	0,260	0,231	-0,039	-0,048
7	0,261	0,232	-0,041	-0,055
8	0,271	0,234	-0,041	-0,039
9	0,266	0,240	-0,039	-0,042
10	0,167	0,239	-0,039	-0,047
11	0,273	0,253	-0,042	-0,049
12	0,269	0,252	-0,048	-0,045
13	0,273	0,260	-0,041	-0,041
14	0,271	0,255	-0,042	-0,052
15	0,266	0,260	-0,045	-0,049
16	0,273	0,245	-0,033	-0,043
17	0,263	0,244	-0,036	-0,039
18	0,261	0,250	-0,037	-0,040
19	0,274	0,250	-0,036	-0,041
20	0,271	0,261	-0,037	-0,043
21	0,269	0,263	-0,039	-0,045
22	0,276	0,263	-0,045	-0,037
23	0,261	0,265	-0,047	-0,054
24	0,258	0,268	-0,047	-0,037
25	0,258	0,276	-0,043	-0,033

Continuação Tabela 6 – Concentração residual de óleo de cravo em diferentes sistemas.

26	0,263	0,263	-0,043	-0,024
27	0,264	0,261	-0,042	-0,023
28	0,266	0,255	-0,043	-0,024
29	0,263	0,265	-0,040	-0,026
30	0,260	0,276	-0,031	-0,050
31	0,268	0,268	-0,025	-0,020
32	0,255	0,274	-0,028	-0,046
33	0,258	0,276	-0,032	-0,039
