



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Campus de Araraquara

MATHEUS BACELAR PAIXÃO IGNACIO

**EFEITO REPELENTE DE NANOEMULSÕES CONTENDO  
ÓLEOS DE *Melaleuca alternifolia* E *Azadirachta indica*  
FRENTE À *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE)**

Araraquara, SP

2024

**MATHEUS BACELAR PAIXÃO IGNACIO**

**EFEITO REPELENTE DE NANOEMULSÕES CONTENDO  
ÓLEOS DE *Melaleuca alternifolia* E *Azadirachta indica*  
FRENTE À *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Parasitologia.

Orientadora: Dra. Mara Cristina Pinto

Coorientador: Dr. Marlus Chorilli

**Araraquara, SP**

**2024**

---

**I24e**

Ignacio, Matheus Bacelar Paixão.

Efeito repelente de nanoemulsões contendo óleos de *Melaleuca alternifolia* e *Azadirachta indica* frente à *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) / Matheus Bacelar Paixão Ignácio – Araraquara, 2024.

57 f. : il.

Orientador(a): Mara Cristina Pinto

Coorientador(a): Marlus Chorilli

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Concentração: Parasitologia.

1. Flebotomíneos. 2. Hematófagos. 3. Inseto. 4. *Lutzomyia longipalpis*. 5. Óleos essenciais. 6. Repelente. I. Pinto, Mara Cristina. orient. II. Título.

---

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP - Campus de Araraquara

**CAPES: 33004030081P7**

**Esta ficha não pode ser modificada**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Efeito repelente de nanoemulsões contendo óleos de *Melaleuca alternifolia* e *Azadirachta indica* frente à *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae)

**AUTOR:** MATHEUS BACELAR PAIXÃO IGNACIO

**ORIENTADORA:** MARA CRISTINA PINTO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARA CRISTINA PINTO (Participação Virtual)  
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. FERNANDA ISADORA BONI (Participação Virtual)  
Departamento de Farmácia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. FREDY GALVIS OVALLOS (Participação Virtual)  
Departamento de Epidemiologia / Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP)

Araraquara, 18 de julho de 2024

## **Agradecimentos**

Com muita gratidão, gostaria de demonstrar meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que tornaram possível a realização desta jornada acadêmica e de pesquisa.

Inicialmente, a minha família em especial minha mãe e minha tia Mônica pelo apoio, carinho, compreensão, ao incentivo e pelos conselhos por toda a minha trajetória até a momento e por muito mais.

Aos meus amigos, Jociel, Isabel e Tulio que foram meu porto seguro, alívio emocional e pela confiança durante toda essa jornada.

A minha orientadora, Dra Mara Cristina Pinto pela oportunidade, pelos conselhos e pela paciência.

Ao meu Coorientador Dr Marlus Chorilli pelas ideias, pelo conhecimento e por me apresentar a um novo mundo de conhecimento da área da Farmácia.

Aos meus colegas de laboratório de Parasitologia, pela paciência, pelo apoio, pelas trocas de ideias e pelas histórias.

Aos voluntários pelo tempo e paciência.

Ao Dr. Jonatas Lobato Duarte pela ajuda no preparo das formulações, pelas ideias e pela paciência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante o mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Os flebotomíneos são insetos hematófagos, pertencentes à Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, que podem transmitir bactérias, vírus e também protozoários como os causadores das leishmanioses. As leishmanioses fazem parte das doenças negligenciadas, que se caracterizam por atingir populações de vulnerabilidade, assim como apresentam lacunas em pesquisas que consigam trazer avanços na terapia, diagnóstico e profilaxia. Um dos métodos de controlar os vetores é a utilização de inseticidas. Outras estratégias, individuais, incluem a utilização de telas ou a aplicação de repelentes. Os óleos de plantas possuem atividades inseticidas que podem ocorrer de diversas formas: causando morte, deformações em qualquer estágio de desenvolvimento, além de ter função de repelência, em especial os óleos essenciais. Para flebotomíneos há poucos estudos que avaliem a eficácia de óleos como potenciais repelentes. O óleo de *Azadirachta indica* apresentou indícios de repelência para espécies de flebotomíneos do Velho Mundo, enquanto para *Melaleuca alternifolia* há poucos estudos nessa área. Ressalta-se ainda que um limitante para o uso de óleos essenciais como repelentes é o reduzido tempo de eficácia devido à alta volatilidade. Neste contexto, A nanotecnologia se apresenta como uma ferramenta interessante como abordagem para liberar os voláteis de forma mais lenta. Avaliou-se dois óleos, *M. alternifolia* e *A. indica*, e formulação de nanoemulsões que contenham esses óleos, para avaliar sua possível ação de repelência frente à espécie *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da leishmaniose visceral. O hidrogel de *M. alternifolia* apresentou no início do teste a maior porcentagem de repelência, igualando-se ao DEET, de aproximadamente 71%, em comparação com o hidrogel de *A. indica* que obteve no início uma média de porcentagem de repelência de aproximadamente 44%. Nos dois hidrogéis houve um decaimento de efetividade ao longo do tempo. Uma nova formulação foi desenvolvida na tentativa de prolongar o efeito repelente da *M. alternifolia*. Essa formulação apresentou uma média de porcentagem de repelência de aproximadamente 87%, no início do teste, sendo maior que o DEET, e igualou-se a ele na primeira hora, mas apresentou o padrão de perda de atividade ao longo do tempo.

**Palavras-chave:** Flebotomíneos; hematófagos; inseto; *Lutzomyia longipalpis*; óleos essenciais; repelente.

## ABSTRACT

Sandflies are blood-sucking insects, belonging to the Order Diptera, Family Psychodidae, Subfamily Phlebotominae, which can transmit bacteria, viruses and also protozoa such as those that cause leishmaniasis. Leishmaniasis is one of the neglected diseases, which are characterized by affecting vulnerable populations, as well as presenting gaps in research that can bring advances in therapy, diagnosis and prophylaxis. One of the methods of controlling vectors is the use of insecticides. Other individual strategies include the use of screens or the application of repellents. Plant oils have insecticidal activities that can occur in different ways: causing death, deformation at any stage of development, in addition to having a repellent function, especially essential oils. For sand flies, there are few studies that evaluate the effectiveness of oils as potential repellents. *Azadirachta indica* oil showed signs of repellency for Old World sand fly species, while for *Melaleuca alternifolia* there are few studies in this area. It should also be noted that a limiting factor for the use of essential oils as repellents is the reduced effectiveness time due to high volatility. In this context, nanotechnology presents itself as an interesting tool as an approach to release volatiles more slowly. Two oils, *M. alternifolia* and *A. indica*, and the formulation of nanoemulsions containing these oils were evaluated to evaluate their possible repellency action against the species *Lutzomyia longipalpis*, the main vector of visceral leishmaniasis. The *M. alternifolia* hydrogel presented the highest percentage of repellency at the beginning of the test, equal to DEET, at approximately 71%, compared to the *A. indica* hydrogel, which obtained an average repellency percentage of approximately 44% at the beginning. In both hydrogels there was a decline in effectiveness over time. A new formulation was developed in an attempt to prolong the repellent effect of *M. alternifolia*. This formulation presented an average repellency percentage of approximately 87% at the beginning of the test, being higher than DEET, and was equal to it in the first hour, but showed a pattern of loss of activity over time.

**Keywords:** Essential oils; hematophagous; insect; *Lutzomyia longipalpis*; repellent; sandflies.

## Lista de Figuras

|                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Ciclo de vida de flebotomíneos.....                                                                                                          | 11 |
| Figura 2 – Comparação entre fêmea e macho de Flebotomíneos.....                                                                                         | 12 |
| Figura 3 – Imagem da árvore pertencente a espécie <i>Melaleuca alternifolia</i> .....                                                                   | 15 |
| Figura 4 – Imagem da árvore pertencente a espécie <i>Azadirachta indica</i> .....                                                                       | 16 |
| Figura 5 – Exemplo teórico de nanoemulsões do tipo óleo em água ou tipo água em óleo.....                                                               | 18 |
| Figura 6 – As duas nanoemulsões depois do acréscimo e da agitação do polímero.....                                                                      | 23 |
| Figura 7 – Gaiola feita com tecido <i>voil</i> usada nos testes.....                                                                                    | 25 |
| Figura 8 – Luvas feitas com tecido <i>voil</i> usada nos testes.....                                                                                    | 26 |
| Figura 9 – Nanoemulsões contendo óleo de <i>Melaleuca alternifolia</i> com valor de EHL 15, 16 e 16,7 após 24h.....                                     | 27 |
| Figura 10 – Nanoemulsões contendo óleo de <i>Azadirachta indica</i> com valor de EHL 15, 16 e 16,7 após 24h.....                                        | 29 |
| Figura 11 – Reologia de fluxo dos Hidrogéis.....                                                                                                        | 32 |
| Figura 12 – Reologia oscilatória dos Hidrogéis.....                                                                                                     | 33 |
| Figura 13 – Porcentagem média de repelência do óleo de <i>M. alternifolia</i> diluído com álcool 70% referente ao pouso de <i>Lu. longipalpis</i> ..... | 35 |
| Figura 14 – Porcentagem média de repelência do óleo de <i>A. indica</i> diluído com álcool 70% referente ao pouso de <i>Lu. longipalpis</i> .....       | 35 |
| Figura 15 – Porcentagem média de repelência da formulação contendo <i>M. alternifolia</i> referente ao pouso de <i>L. longipalpis</i> .....             | 37 |
| Figura 16 – Porcentagem média de repelência da formulação contendo <i>A. indica</i> referente ao pouso de <i>L. longipalpis</i> .....                   | 37 |
| Figura 17 – Porcentagem média de repelência da nova formulação contendo <i>M. alternifolia</i> referente ao pouso de <i>Lu. longipalpis</i> .....       | 39 |
| Figura 18 – Comparação entre as formulações contendo <i>M. alternifolia</i> referente                                                                   |    |

**ao pouso de *Lu. longipalpis*.....40**

**Figura 19 – Comparação entre as formulações contendo *A. indica* referente ao  
pouso de *Lu. longipalpis*.....41**

## Lista de Tabelas

|                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Equilíbrio Hidrófilo Lipofílico (EHL) das formulações preparadas.....                                                                                          | 22 |
| Tabela 2 – Tamanhos de gotícula, Índice de polidispersidade e potencial zeta da nanoemulsão contendo <i>Melaleuca alternifolia</i> depois de 24h e depois de 30 dias..... | 28 |
| Tabela 3 – Tamanhos de gotícula, Índice de polidispersidade e potencial zeta da nanoemulsão contendo <i>Azadirachta indica</i> depois de 24h e depois de 30 dias.....     | 30 |
| Tabela 4 – Tamanhos de gotícula, Índice de polidispersidade e potencial zeta da nanoemulsão de Melaleuca 2x depois de 24h e depois de 30 dias.....                        | 30 |
| Tabela 5 – Índice de consistência (K) e Comportamento de fluxo (n) para os Hidrogéis.....                                                                                 | 32 |
| Tabela 6 – Porcentagem de repelência dos testes realizados em 06 voluntários com álcool 70%.....                                                                          | 34 |
| Tabela 7 – Porcentagem de repelência dos testes realizados em 07 voluntários com o óleo de <i>M. alternifolia</i> diluído com álcool 70%.....                             | 34 |
| Tabela 8 – Porcentagem de repelência dos testes realizados em 07 voluntários com o óleo de <i>A. indica</i> diluído com álcool 70%.....                                   | 34 |
| Tabela 9 – Porcentagem de repelência dos testes realizados em 07 voluntários com o Hidrogel contendo <i>M. alternifolia</i> .....                                         | 36 |
| Tabela 10 – Porcentagem de repelência dos testes realizados em 07 voluntários com o Hidrogel contendo <i>A. indica</i> .....                                              | 36 |
| Tabela 11 – Porcentagem de repelência dos testes realizados em 07 voluntários com o produto comercial contendo DEET.....                                                  | 36 |
| Tabela 12 – Porcentagem de repelência dos testes realizados em 07 voluntários com o Hidrogel contendo Melaleuca 2x.....                                                   | 38 |

## SUMÁRIO

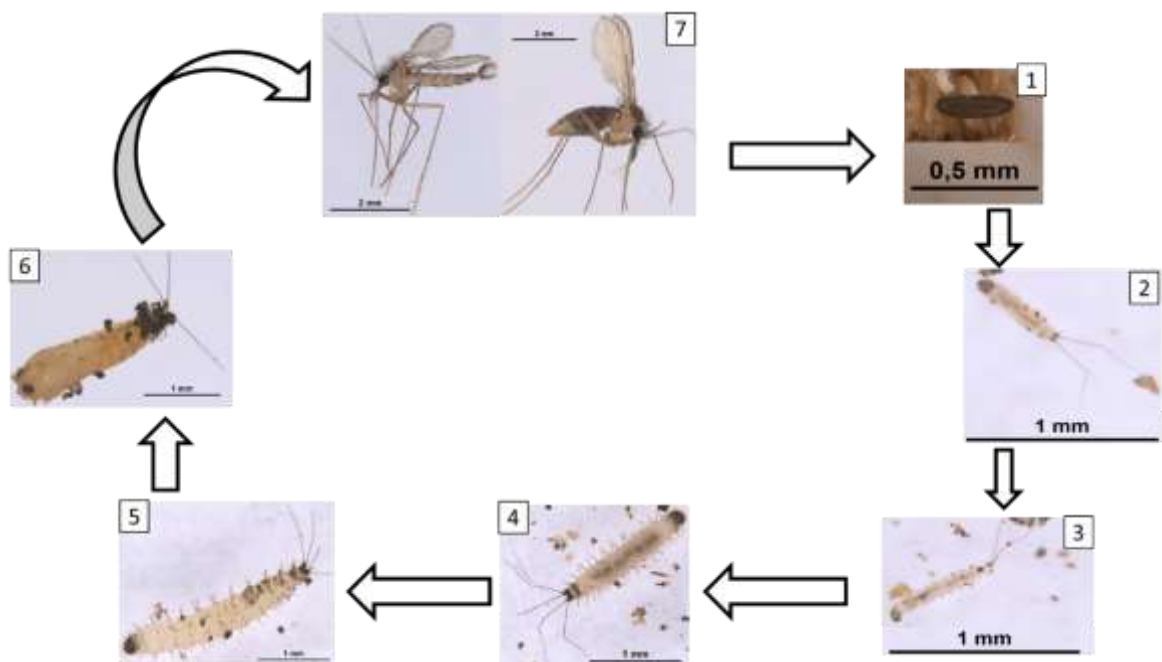
|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução.....                                                                                          | 11 |
| 1.1 <i>Melaleuca alternifolia</i> e <i>Azadirachta indica</i> .....                                         | 14 |
| 1.2 Nanotecnologia e Nanoemulsões.....                                                                      | 17 |
| 1.3 Nanoemulsões e Repelente.....                                                                           | 19 |
| 2. Justificativa.....                                                                                       | 20 |
| 3. Objetivos.....                                                                                           | 20 |
| 3.1 Objetivo Geral.....                                                                                     | 20 |
| 3.2 Objetivos Específicos.....                                                                              | 20 |
| 4. Material e Métodos.....                                                                                  | 20 |
| 4.1 Listas de materiais.....                                                                                | 21 |
| 4.2 Preparo das nanoemulsões contendo óleos <i>Melaleuca alternifolia</i> e <i>Azadirachta indica</i> ..... | 21 |
| 4.3 Caracterização das nanoemulsões.....                                                                    | 22 |
| 4.3.1 Aspecto visual.....                                                                                   | 22 |
| 4.3.2 Diâmetro hidrodinâmico médio, IPD e potencial zeta.....                                               | 23 |
| 4.3.3 Preparo dos Hidrogéis.....                                                                            | 23 |
| 4.3.4 Reologia de fluxo.....                                                                                | 24 |
| 4.3.5 Reologia oscilatória.....                                                                             | 24 |
| 4.4 Teste de Repelência dos óleos.....                                                                      | 24 |
| 4.4.1 Aspecto éticos.....                                                                                   | 24 |
| 4.4.2 Testes de repelência.....                                                                             | 24 |
| 5. Resultados e Discussão.....                                                                              | 27 |
| 5.1 Obtenção e caracterização das nanoemulsões.....                                                         | 27 |
| 5.2 Reologia de fluxo.....                                                                                  | 30 |
| 5.3 Reologia oscilatória.....                                                                               | 32 |

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.4 Teste de repelência.....                                                          | 33 |
| 6. Conclusão.....                                                                     | 42 |
| Referências.....                                                                      | 43 |
| ANEXO.....                                                                            | 49 |
| ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA.....                                           | 49 |
| ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....                             | 53 |
| ANEXO C - LAUDO DE QUALIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Azadirachta indica</i> .....     | 55 |
| ANEXO D - LAUDO DE QUALIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melaleuca alternifolia</i> ..... | 55 |

## 1. INTRODUÇÃO

Os flebotomíneos são insetos pertencentes à Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae. Esses dípteros apresentam cores que podem ser de castanho claro a negro com cerdas no corpo todo e possuem o tamanho de 0,3 a 0,4 cm. Quando em descanso, apresentam as asas eretas em forma de lança. Possuem mais de 500 espécies descritas nas Américas (Monteiro *et al.*, 2012; Galati, 2018). Os flebotomíneos são holometábolos, apresentando quatro estágios larvais, pupa e adultos. A eclosão do ovo pode ocorrer de 7 a 17 dias após a postura e o seu desenvolvimento completo pode ocorrer de 30 a 100 dias (Figura 1). Essa variação ocorre de acordo com a espécie e das condições de temperatura e umidade (Monteiro *et al.*, 2012).

**Figura 1** – Ciclo de vida de flebotomíneos. 1- Ovo; 2- Larva estágio 1; 3- Larva estágio 2; 4- Larva estágio 3; 5- Larva estágio 4; 6- Pupa; e 7- Adultos.



Fonte: Santana e Ignacio (2024)

Os machos são fitófagos, já as fêmeas além de serem fitófagas também são hematófagas (Figura 2). As fêmeas precisam da alimentação sanguínea para obter proteína para a maturação dos ovos (Oliveira *et al.*, 2013). Por possuírem hábitos hematófagos podem ser transmissores de bactérias que causam a bartonelose, vírus como as arboviroses e também protozoários como os causadores das leishmanioses (Monteiro *et al.*, 2012).

**Figura 2** – Comparação entre fêmea e macho de Flebotomíneos. **A:** macho e **B:** fêmea.



Fonte: Santana e Ignacio (2024)

Nas Américas, a espécie *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor do agente etiológico da leishmaniose visceral, sendo o vetor mais importante da *Leishmania infantum* (Oliveira *et al.*, 2013).

Dependendo da espécie de *Leishmania*, a doença pode se apresentar como leishmaniose tegumentar e visceral. A leishmaniose tegumentar apresenta-se com diferentes manifestações clínicas sendo leishmaniose cutânea caracterizada por úlceras cutâneas, por vezes acompanhadas de lesões satélites e/ou linfangite nodular; leishmaniose mucocutânea envolvendo mucosa e tecidos conjuntivos subjacentes, tais como estruturas cartilaginosas, em combinação com leishmaniose cutânea e leishmaniose difusa com pápulas que se espalham pelo corpo. A leishmaniose visceral afeta órgãos internos, como fígado, baço e medula óssea podendo ser letal (De Vries; Schallig, 2022). Essas doenças são endêmicas em mais de 98 países nos trópicos, subtropicos e na bacia do Mediterrâneo, com aproximadamente um milhão de novos casos de infecção e 20.000 a 30.000 mortes ocorrendo anualmente e associadas, principalmente, à leishmaniose visceral. Mais de 90% da carga global de leishmaniose visceral ocorre no Brasil, Eritreia, Sudão do Sul, Sudão, Etiópia, Quênia, Somália e Índia, enquanto no Brasil, Peru, Venezuela, Bolívia, Colômbia, Argélia,

Síria, Irã, Afeganistão e Paquistão observa-se a maior morbimortalidade causada por leishmaniose cutânea (Balaska *et al.*, 2021).

Uma das maneiras de controlar os vetores se dá pelo uso de inseticidas, sendo seu sucesso dependente do comportamento dos insetos. Apesar de sua praticidade, o uso de inseticidas, apresenta problemas que podem limitar o controle de flebotomíneos como o surgimento de resistência, o abandono de programas de combate ao vetor, os altos custos, além de afetarem a saúde humana, dos animais e a biosfera em geral (Nieves *et al.*, 2010).

Dessa forma, é necessário que outras alternativas sejam utilizadas para evitar a aplicação de inseticidas e, ao mesmo tempo, diminuir a transmissão das leishmanioses. Dentre as possibilidades, estratégias que impeçam o contato entre o vetor e o ser humano, tais como a utilização de telas ou a aplicação de repelentes se destacam, sendo relevantes para impedir a transmissão. Os repelentes, como medida de proteção individual, se apresentam como uma boa alternativa preventiva para evitar o contato dos vetores (Nieves *et al.*, 2010).

Os repelentes devem ser aplicados sobre a pele, roupas e superfícies onde irão afastar os vetores. Os mais usados ao redor do mundo são os repelentes químicos. Para o repelente ter sua maior efetividade, é necessário que possua algumas características, sendo elas: ter uma eficácia de longo prazo contra vários tipos de artrópodes; não causar irritações na pele; não causar danos às roupas; não danificar plásticos de uso cotidiano; resistir à água e ao suor e não deixar a pele oleosa; não ser tóxico; ter preço acessível para uma utilização frequente; e não causar danos ao meio ambiente (Ribas; Carreno, 2010).

Os óleos essenciais de plantas se apresentam como possibilidades interessantes, pois possuem atividades inseticidas que podem ocorrer de diversas formas: causando morte, deformações em qualquer estágio de desenvolvimento, além de ter função de repelência. A procura por substância com menor toxicidade, e que tenham ação repelente para flebotomíneos, é uma área que necessita ser amplamente explorada (Lima *et al.*, 2008). A extração dos óleos essenciais para uso como repelente vem sendo feita a partir de extratos da planta inteira ou de órgãos específicos, como folha, fruto, flor, raiz e casca (Paula *et al.*, 2004).

Segundo a Farmacopeia Europeia, um óleo essencial é um produto odorífero, geralmente de composição complexa, obtido a partir de uma matéria-prima vegetal extraída por hidrodestilação, destilação a vapor ou por um processo mecânico adequado. Os óleos essenciais são misturas complexas de metabólitos secundários de plantas aromáticas e também são líquidos, solúveis em solventes orgânicos e solúveis em lipídios, alguns deles são incolores e outros variam do amarelo claro ao laranja avermelhado (Haro-gonzález *et al.*, 2021).

Os óleos essenciais compreendem compostos orgânicos voláteis e semivoláteis que determinam o aroma, sabor e fragrância específicos das plantas. Eles são voláteis e instáveis à temperatura ambiente. Por outro lado, os óleos vegetais consistem em ésteres de glicerol e ácidos graxos e são não voláteis e estáveis à temperatura ambiente. Além de serem comestíveis na sua forma refinada ou virgem, os óleos vegetais desempenham um papel crucial na prevenção terapêutica e profilática de doenças como inflamação, diabetes e outras (Lammari *et al.*, 2021).

Para a repelência de uma espécie de flebotomíneo das Américas, *Migonemyia migonei*, alguns óleos essenciais foram avaliados: *Hyptis suaveolens*, *Pimenta racemosa*, *Piper marginatum*, *Monticaria albobrunnea*, *Pseudognaphalium caeruleum*, *Espeletia shultzei*, *Plectranthus amboinicus* e *Cinnamomum zeylanicum*. Destes, *P. caeruleum* e *C. zeylanicum* apresentaram uma proteção de três horas (Nieves *et al.*, 2010). Um dos entraves para a utilização de óleos essenciais como repelentes para flebotomíneos é o curto período de atividade dos compostos (Pugliese *et al.*, 2021).

### **1.1 *Melaleuca alternifolia* e *Azadirachta indica***

*Melaleuca alternifolia* (Figura 3) é uma espécie arbórea pertencente à família Myrtaceae mais conhecida pelo nome “tea tree”; é originária da Austrália, Ilhas do Oceano Índico e China (Oliveira *et al.*, 2012). É encontrada em regiões tropicais e subtropicais, florescendo em áreas de pântano e próximo de rios. A espécie *M. alternifolia* pode alcançar até 5 metros de altura, possui ritidoma fino, leve e flexível, folhas alongadas, pontiagudas, estreitas e alternas, além de flores sésseis com coloração branca. São pertencentes ao grupo das Angiospermas e são Eudicotiledôneas (Nepomoceno; Pietrobon, 2020).

**Figura 3** – Imagem da árvore pertencente a espécie *Melaleuca alternifolia*.



Fonte: Jardineiros.net (2022)

Uma das utilizações da *M. alternifolia* está na extração do óleo essencial, retirado das diversas partes vegetativas, mas principalmente das folhas. Essa planta é valorizada pelo potencial de suas propriedades bactericida, antiviral, antifúngica, inseticida e antitumoral (Nepomoceno; Pietrobon, 2020); além de possuir uma forte atividade repelente contra mosquitos, como *Aedes aegypti*, mosca do mato australiana, mosquito-pólvora, barata americana e alemã, percevejos, pulgas e piolhos (Silva; Mejia, 2011; Ajmal *et al.*, 2022). Segundo Ajmal *et al.* (2022) a substância encontrada na tea tree conhecida, como terpinen-4-ol, possui um poder forte de repelência contra adultos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, entretanto, até o momento, existem poucos estudos avaliando seu efeito repelente para flebotomíneos.

O óleo essencial de *M. alternifolia* é obtido através do processo de destilação a vapor e contém por volta de 100 componentes químicos. Encontram-se nele duas substâncias que se destacam, sendo o cineol que é um monoterpeno éter cíclico com limite máximo estabelecido de 15% de concentração e o terpinen-4-ol que é um monoterpeno álcool monocíclico, principal responsável por suas propriedades medicinais, especialmente as antimicrobianas, com concentração acima de 30%. Para o óleo essencial ser considerado de qualidade superior, é necessário que contenha entre 2 a 5% de cineol e 40 a 47% de terpinen-4-ol (Silva; Mejia, 2011).

*Azadirachta indica*, também chamada por “neem”, pertence à Família Meliaceae e tem sido usada por séculos no Oriente como: planta medicinal, repelente, material para construção, combustível, adubo e praguicida. Cresce em regiões que possuem clima tropical e subtropical. A árvore pode chegar entre 15 a 20 m de altura, possui tronco semi-reto a reto, de 30 a 80 cm de diâmetro, de coloração marrom-avermelhada (Mossini; Kemmelmeier, 2005).

A árvore de neem (Figura 4) possui como metabólito secundário o composto azadiractina, que é um tetranortriterpenóide, e apresenta elevada ação inseticida e acaricida, com mínima toxicidade ao homem e animais domésticos, além de não prejudicar o ambiente. Há uma facilidade na extração dos compostos, pois não há uma necessidade de destruir a planta, já que se usa as sementes e as folhas para a extração (Brito *et al.*, 2006).

**Figura 4** – Imagem da árvore pertencente a espécie *Azadirachta indica*.



Fonte: Blog o botânico aprendiz na terra dos espantos (2022)

Azadiractina presente na *A. indica* é formada por um grupo de isômeros relacionados que são denominados AZ-A. A azadiractina apresenta efeito negativo na metamorfose dos insetos, ação repelente, inibição do crescimento, redução da fertilidade, mortalidade, esterilização, mudanças na aptidão biológica, e bloqueando o desenvolvimento de patógenos transmitidos por vetores (De Souza Chagas; Da Silva

Vieira, 2007; Zatelli *et al.*, 2022). Espécies como *Heliothis virescens* (Lagarta-das-maçãs) (Viegas Júnior, 2003), *Locusta migratoria* (Gafanhoto-migratório), *Spodoptera littoralis* (Lagarta do algodão), *Ephestia kuehniella* (Traça da farinha), *Apis mellifera* (Abelha-europeia) e *Epilachna varivestis* (Besouro do feijão mexicano) são exemplos de insetos que sofrem com os efeitos da azadirachtina (Gonzales, 1992). O efeito de inibição de crescimento, causado pela azadiractina é observado em insetos pertencente às ordens Orthoptera, Heteroptera, Homoptera, Hymenoptera, Coleoptera, Lepidoptera e Diptera (Gonzales, 1992).

Segundo Zatelli *et al.* (2022) alguns estudos que utilizaram produtos com óleo de neem mostram uma eficácia na redução da tentativa de alimentação dos flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* sp. em humanos, sendo acima de 90% por períodos que variam entre sete e nove horas após a aplicação de produtos em concentrações variáveis.

O efeito repelente de *A. indica* para flebotomíneos foi demonstrado em alguns estudos com espécies do Velho Mundo, mas nada há ainda para as espécies das Américas. Segundo Mota *et al.* (2022) o óleo de *A. indica* mostrou repelência para *Phlebotomus orientalis*, tanto em laboratório quanto no campo. Já em relação às espécies de flebotomíneos do Novo Mundo, óleos de neem e *Eucalyptus* spp. mostraram atividades larvicida e adulticida para *Lu. longipalpis*. No entanto, são escassas as informações sobre sua atividade repelente contra espécies de flebotomíneos do novo mundo, especialmente o *Lu. longipalpis*.

Na Índia, o óleo de neem mostrou repelência contra *Phlebotomus papatasi* e *Phlebotomus argentipes* quando comparado com outros repelentes químicos como DEET (Kebede; Gebre-michael; Balkew, 2010).

Os óleos de *A. indica* e de *Melia azedarach* em um nível de concentração baixa apresentaram atividade de repelência contra *P. orientalis* no laboratório. Já no campo, o óleo *A. indica* mostrou atividade de repelência alta contra *P. orientalis* e *Phlebotomus bergeroti* em Melka-Worer, na Etiópia Oriental (Kebede; Gebre-michael; Balkew, 2010).

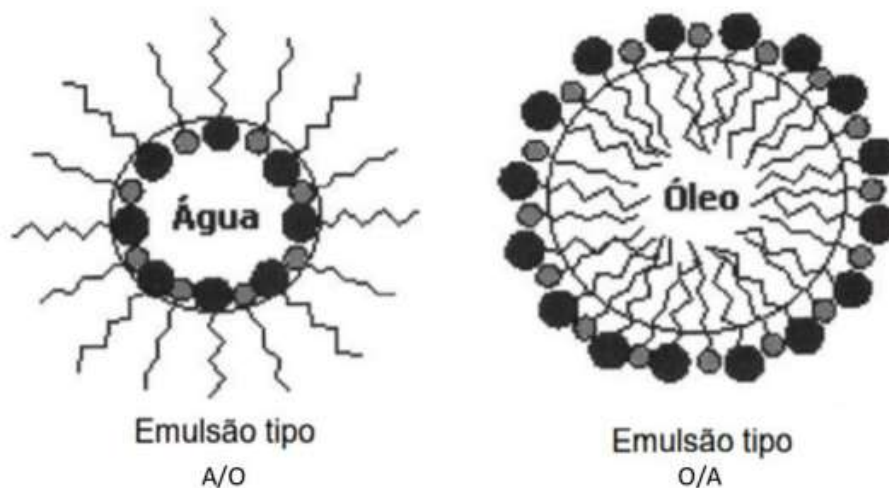
## 1.2 NANOTECNOLOGIA E NANOEMULSÕES

A nanotecnologia tem várias aplicações, principalmente na área médica e farmacêutica. Envolve a manipulação e investigação de materiais e fenômenos que

se encontram em escala nanométrica (De Villiers *et al.*, 2009). Devido às suas propriedades fundamentais e à variedade de sistemas nanométricos, a nanotecnologia é utilizada em diversas áreas do conhecimento, com destaque para sistemas que utilizam nanoemulsões.

As nanoemulsões são uma classe de emulsões cujo tamanho da gotícula se encontra na escala nanométrica, particularmente em torno de 20 – 500 nm. Podem apresentar aparência translúcida quando o tamanho da gotícula é inferior a 200 nm, ou leitosa quando o tamanho está entre 200 – 500 nm. Elas são misturas de pelo menos dois líquidos imiscíveis que são estabilizadas por um tensoativo, também são sistemas termodinamicamente instáveis, mas que possuem estabilidade cinética. São forçadamente formados e suas propriedades dependem de condições termodinâmicas e do método de preparo (Oliveira, 2008). Nanoemulsões podem ser do tipo óleo em água ou tipo água em óleo (Figura 5) dependendo se o óleo é divergido como gotículas em água ou vice-versa (McClements, 2012).

**Figura 5** – Exemplo teórico de nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A) ou tipo água em óleo (A/O).



Fonte: Blog fármaco técnico (2010)

No caso da aplicação de nanoemulsões em compostos com ação repelente para insetos, a vantagem é o tempo prolongado de liberação dos compostos voláteis. Os dados da literatura apontam os esforços da associação de possíveis óleos com ação repelentes em nanopartículas, especialmente voltados para os mosquitos (Mattos da Silva e Ricci-junior, 2020).

Uma das maneiras de controlar a liberação dos voláteis de óleos essenciais de plantas para testes de repelência é encapsulando os óleos essenciais em nanoemulsões (Mohd narawi *et al*, 2020).

Para flebotomíneos, não existem trabalhos que tenham investigado esse tema.

### 1.3 NANOEMULSÕES E REPELENTE

No trabalho de Mohd narawi *et al* (2020) foi testado óleo essência de *Myristica fragrans* para *Aedes aegypti*; foi feita uma formulação contendo surfactante Montanov 82, co-solvente que era o glicerol, água destilada e óleo essencial a 20%. A formulação apresentou uma média de porcentagem de repelência de 54,57% em 8h para *Ae. aegypti*.

Um dos problemas de repelentes a base de óleos essenciais é a necessidade de repetição da aplicação, pois esses repelentes fornecem uma eficiência curta em comparação com os químicos. Portanto, o desenvolvimento de formulações com produtos que controlam a liberação, como creme, gel, loção, polímeros ou microcápsulas, é importante para prolongar a repelência de produtos derivados de plantas (Junkum *et al*, 2021).

No trabalho realizado por Junkum *et al* (2021) foi utilizado óleo essencial de *Ligusticum sinense* para *Aedes aegypti*, *Anopheles minimus*, e *Culex quinquefasciatus*. Foi feita uma formulação contendo o óleo, um fixador (vanilina), surfactante (Tween 20), co-surfactante (glicerol) e o dobro de água destilada. Na formulação também era incorporado um gel. A formulação apresentou média de tempo de proteção de 5,5 h para *Ae. aegypti*, 11,5 h para *An. minimus* e 11,25 h para *Cx. quinquefasciatus*.

No trabalho realizado por Sakulku *et al* (2009) foi utilizado óleo essencial de citronela para *Ae. aegypti*. Foram preparadas nanoemulsões contendo 20% de óleo de citronela, glicerol (0%, 50%, 75% e 100%) e surfactante (Montanov 82) em concentração de 2,5%, 5% e 10%. A formulação denominada de F6 que continha 50% de glicerol e 10% do surfactante foi o que apresentou a melhor média de tempo de proteção de 2,8 +/- 0,6 h para *Ae. aegypti*.

## 2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses fazem parte das doenças negligenciadas, que se caracterizam por atingir populações de vulnerabilidade, assim como apresentam lacunas em pesquisas que, efetivamente, consigam trazer avanços na terapia, diagnóstico e profilaxia como, por exemplo, uma vacina.

Por serem doenças cujos agentes etiológicos são transmitidos por flebotomíneos, uma forma de controle das enfermidades seria focar em ações para o controle dos vetores. Seja na aplicação de inseticidas, ou na interrupção do contato, como a utilização de telas nas casas, ou a proteção individual, visto que em muitos casos a infecção ocorre fora do ambiente domiciliar.

Os estudos com óleos essenciais como repelentes para flebotomíneos são incipientes e, aqueles que utilizam a nanotecnologia para incrementar uma possível ação repelente são escassas.

O óleo de *A. indica* apresentou indícios de repelência para espécies de flebotomíneos do Velho Mundo, enquanto para *M. alternifolia* não há estudos nessa área. Ressalta-se ainda que um limitante para o uso de óleos essenciais como repelentes é seu reduzido tempo de eficácia e as nanoemulsões podem ser uma estratégia para aumentar o tempo de repelência.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Verificar a eficácia de *Melaleuca alternifolia* e *Azadirachta indica* na repelência de *Lutzomyia longipalpis*.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Avaliar a atividade de repelência dos óleos de *M. alternifolia* e *A. indica* frente à espécie *Lu. longipalpis*.

Desenvolver nanoemulsões e hidrogéis com os óleos de *M. alternifolia* e *A. indica* e avaliar os respectivos tempos de repelência dos óleos frente ao *Lu. longipalpis*.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Araraquara.

#### 4.1 Listas de materiais

##### ▪ Materiais da nanoemulsão:

- Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*: adquirido pela empresa, Terra Flor aromaterapia. A empresa forneceu laudo de qualidade do produto;
- Óleo *Azadirachta indica*: adquirido pela Benjamin Primores Naturais. A empresa forneceu laudo de qualidade dos produtos;
- Tween 20;
- Span 80;
- Carboximetilcelulose (CMC);

##### ▪ Materiais do teste de repelência:

- Produto comercial contendo DEET;
- Álcool 70%;
- Extran 5%;
- Álcool isopropílico;
- Gaiola feita com tecido *voil* (20X20X20cm)
- Luva feita com tecido *voil*

#### 4.2 Preparo das nanoemulsões contendo óleos *Melaleuca alternifolia* e *Azadirachta indica*

As nanoemulsões foram preparadas no laboratório Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP com a colaboração do Dr. Marlus Chorilli de acordo com metodologia já estabelecida pelo grupo (Zanesco-fontes *et al*, 2021).

As nanoemulsões foram preparadas através de um método de baixo aporte de energia. Inicialmente uma fase oleosa composta dos tensoativos Tween 20 e Span 80 e do óleo essencial foram pesadas em um frasco de vidro e homogeneizada por agitação magnética. Em seguida a fase aquosa foi adicionada, por gotejamento, sobre a fase oleosa em agitação magnética. Três formulações foram preparadas para cada óleo (Tabela 1).

**Tabela 1** – Equilíbrio Hidrófilo Lipofílico (EHL) das formulações preparadas.

|                 | <b>EHL 15</b> | <b>EHL 16</b> | <b>EHL 16,7</b> |
|-----------------|---------------|---------------|-----------------|
| <b>Span 80</b>  | 0.07g         | 0.03g         | 0g              |
| <b>Tween 20</b> | 0.43g         | 0.47          | 0.5g            |
| <b>Óleo</b>     | 0.5g          | 0.5g          | 0.5g            |
| <b>Água</b>     | 9g            | 9g            | 9g              |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em virtude dos resultados do teste dois serem promissores com *M. alternifolia*, uma nova formulação foi desenvolvida com um aumento de 10% do volume do óleo. Essa formulação continha 0,06 g de Span 80, 0,94g de Tween 20, 1g de óleo e 8g de água, além de ter sido sonificada por dois minutos em amplitude de 50; essa formulação foi denominada de Melaleuca 2x.

### **4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES**

#### **4.3.1 Aspecto visual**

As formulações obtidas foram avaliadas visualmente após 24 horas, 07, 14, 21 dias de preparação. Foram observados sinais de instabilidade como cremagem, sedimentação e separação de fases além de aspectos físicos como cor, transparência e fluidez.

#### **4.3.2 Diâmetro hidrodinâmico médio, Índice de polidispersividade (IPd) e potencial zeta**

O diâmetro hidrodinâmico médio, IPd e potencial zeta das NE foram avaliados utilizando método de espalhamento dinâmico de luz (DLS), em aparelho Zetasizer 3000 HSA (Malvern Instruments), por meio de um laser de 10 mW HeNe operado a 633 nm com um ângulo de incidência de detecção de 173°, a 25°C. A análise de dados foi realizada em modo automático. Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão (DP). A carga superficial das dispersões foi determinada pela mobilidade eletroforetica das partículas dispersas submetidas a um campo elétrico. As análises foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer 3000 HSA. Foram avaliadas após 24h e 30 dias depois de preparadas. As NEs foram diluídas 1:25 para fazer as análises.

#### 4.3.3 Preparo dos Hidrogéis contendo as NE

Os Hidrogéis (Figura 6) foram preparados dispersando 3% (m/v) de carboximetilcelulose nas nanoemulsões previamente obtidas sob agitação. Os hidrogéis foram armazenados por 24 horas para completo intumescimento dos polímeros.

**Figura 6** – As duas nanoemulsões depois do acréscimo e da agitação do polímero.



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.3.4 Reologia de fluxo

Os experimentos foram realizados em um reômetro Discovery Hybrid HR-1 (TA Instruments, Newcastle, EUA) utilizando geometria do tipo cone-placa (40 mm, 2°). As medidas foram feitas a temperatura de  $32,0 \pm 0,1$  ° C utilizando taxa de cisalhamento de 0,1-100 s<sup>-1</sup> por um período de 120 s para curva ascendente e 120 s para a curva descendente com taxa de cisalhamento de 100-0 s<sup>-1</sup>. A equação a seguir foi usada para calcular o valor de n para caracterizar o comportamento do fluxo e k para caracterizar a viscosidade do material.

$$\tau = k \times \gamma^n$$

Onde:  $\tau$  = taxa de cisalhamento, k = índice de consistência,  $\gamma$  = tensão de cisalhamento

#### 4.3.5 Reologia oscilatória

A reologia oscilatória foi feita utilizando um reômetro Discovery Hybrid HR-1 (instrumentos TA) e geometria do tipo cone-placa (40 mm, 2 °) e a temperatura foi mantida a  $32,0 \pm 0,1$  °C. Para as análises oscilatórias, a região viscoelástica linear (LVR) foi determinada usando uma faixa de amplitude de 0–50 Pa e uma frequência de 1 Hz. Uma amplitude de 1 Pa determinada no interior do LVR e uma faixa de frequência de 0–10 Hz foi usada para determinar os módulos elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ).

#### **4.4 Teste de Repelência dos óleos**

##### **4.4.1. Aspecto éticos**

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP (CEP-FCF) (CAAE - 65806122.8.0000.5426). Os voluntários que participaram foram informados sobre a pesquisa, sua metodologia empregada e o sobre possíveis efeitos colaterais dos produtos antes de assinar o termo de consentimento.

##### **4.4.2. Testes de repelência**

No teste de repelência foi realizado testes com formulações diferentes sendo elas:

Teste 1: Para avaliar a eficácia da nanoemulsões foram feitas formulações apenas com os óleos diluídos em álcool. Para isso, os óleos de *M. alternifolia* e *A. indica* foram preparadas através de um método de baixo aporte de energia. Essas formulações foram compostas por 0,5g de óleo e 9,5g de álcool 70%. Essa mistura se faz necessária pois o óleo deve ser diluído para não causar irritação na pele dos voluntários.

Teste 2: Foi testado os Hidrogéis contendo as nanoemulsões de *M. alternifolia* e de *A. indica*.

Teste 3: Foi testado a formulação denominada de Melaleuca 2x. Em virtude dos resultados do teste dois serem promissores para *M. alternifolia*.

Uma metodologia foi desenvolvida no laboratório de Parasitologia para que os voluntários não tivessem contato com os insetos.

Foram utilizadas gaiolas feitas com tecido *voil* (Figura 7) tendo as medidas 20X20x20cm com abertura para inserir a mão do voluntario e os insetos. A mão do

voluntario foi revestida por uma luva feita com tecido *voil* (Figura 8) com o intuito de evitar o contato com o inseto.

O tecido *voil* permite a liberação de compostos voláteis humanos atrativos para os insetos, sendo possível mensurar a aproximação (pouso) dos mesmos.

**Figura 7** – Gaiola feita com tecido *voil* usada nos testes.



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 8** – Luvas feitas com tecido *voil* usada nos testes.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para cada teste foram utilizadas 60 fêmeas de flebotomíneos no total e em cada tempo foram usados 10 insetos diferentes. O repelente comercial que tem princípio ativo DEET (N, N-dietil m-toluamida) foi utilizado como controle positivo nos experimentos.

O antebraço e a mão dos voluntários foram previamente lavados com extran 5% seguido de álcool isopropílico 50%, ambos diluídos em água deionizada. Um dos antebraços e mão foram o controle (sendo somente higienizado) e o outro o tratamento.

Os testes tinham duração total de duas horas. Foi avaliada a atividade repelente no momento em que foi feita a aplicação (T0), uma hora após a aplicação (T60') e duas horas após a aplicação (T120'). Nos tempos descritos, os dois braços ficaram por cinco minutos na gaiola (primeiro o controle e depois o tratamento) e foi mensurada a quantidade de pousos observados na luva para fazer o cálculo de porcentagem de repelência.

Foram avaliados sete voluntários para cada teste. Exceto no teste com Álcool 70% que foi feito com seis voluntários.

A porcentagem de repelência foi avaliada pelo número de pousos. O cálculo da porcentagem de repelência é calculado de acordo com a seguinte fórmula:  $\%R = \{(Nc - Nt)/Nc\} \times 100$

Onde Nc é o número total de pousos no antebraço controle negativo e Nt o número total de pousos no antebraço tratado com os compostos testados.

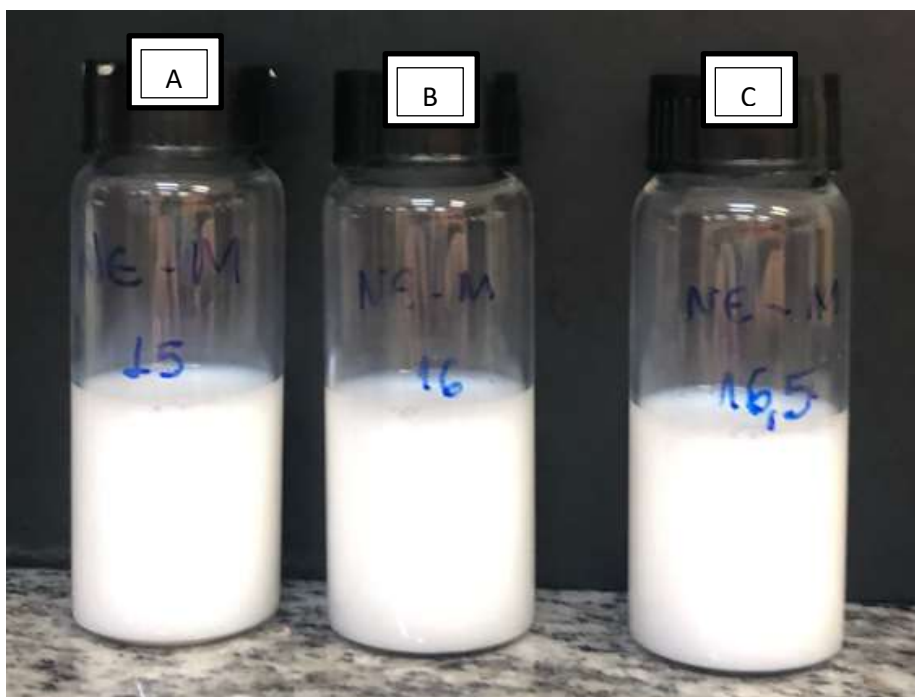
Para testar as diferenças estatísticas entre porcentagens de repelência nos tempos avaliados foram utilizados o teste de Análise de Variância (ANOVA) e o pós teste de Tukey, utilizando o programa estatístico GraphPad Pris 5.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

Depois das 24 horas de preparação (Figura 9), a formulação com valor de EHL (Equilíbrio Hidrófilo Lipofílico) de 16 foi a que apresentou as melhores características visuais, além de um aspecto mais para o azulado, característico de nanoemulsões (Ortiz-zamora *et al.*, 2020). Deste modo, a formulação com valor de EHL 16 para *M. alternifolia* foi selecionada para as análises por espalhamento dinâmico da luz.

**Figura 9** – Nanoemulsões contendo óleo de *M. alternifolia* com valor de EHL 15, 16 e 16,7 após 24h. **A:** EHL 15, **B:** EHL 16, e **C:** EHL 16,7.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Como pode ser observado na tabela 2 depois de 24 horas (D1) a formulação de EHL 16 apresentou tamanho de gotícula de  $129,5 \pm 1,966$  nm, confirmado assim a aparência translúcida e depois de 30 dias não houve uma variação que causasse uma diferenciação no tamanho de gotícula, assim como no IPd e no potencial zeta,

mostrando não houve separação de fases da nanoemulsão, além de indicar a assimilação do óleo.

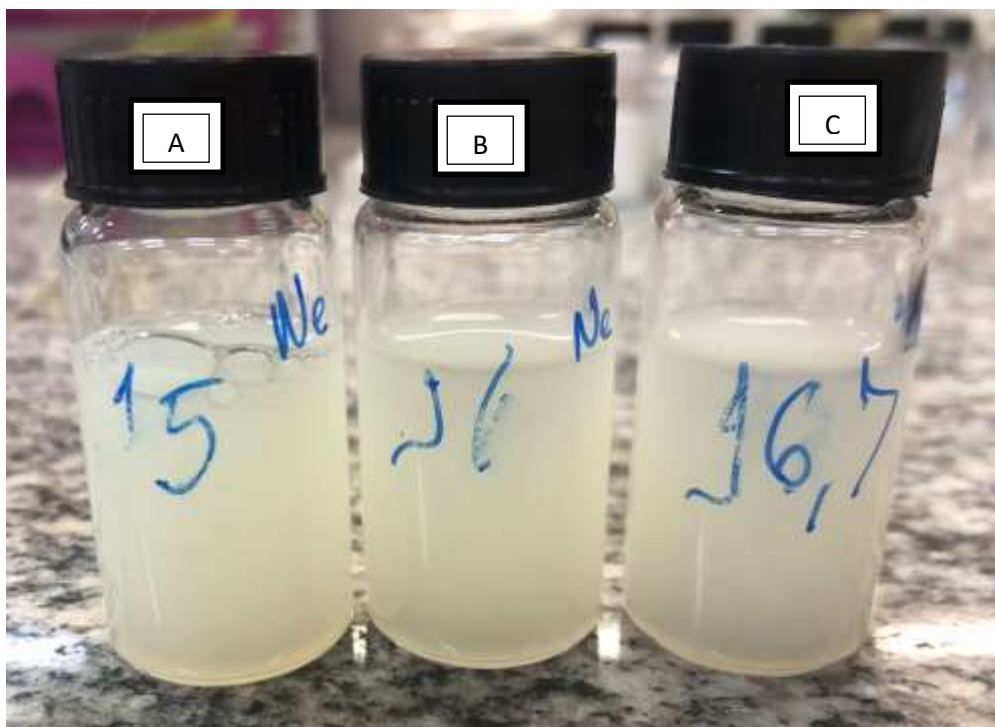
**Tabela 2** – Tamanhos de gotícula, Índice de polidispersidade e potencial zeta da nanoemulsão contendo *M. alternifolia* depois de 24h e depois de 30 dias.

| EHL 16 |               |                               |                     |
|--------|---------------|-------------------------------|---------------------|
| Tempo  | Tamanho (nm)  | Índice de polidispersão (IPd) | Potencial zeta (mV) |
| D1     | 129,5 ± 1,966 | 0,204 ± 0,041                 | -12,1 ± 0,265       |
| D30    | 129,5 ± 1,493 | 0,183 ± 0,015                 | -12,3 ± 0,232       |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Já para o óleos de *A. indica* depois das 24 horas de preparação (Figura 10), a formulações EHL 16 e 16,7 apresentaram sinais de instabilidade que denominado de cremagem além de apresentarem aspectos leitosos e mais viscosos que é característico de emulsões com gotículas na escala micrométrica, já a formulação com valor de EHL de 15 não apresentou sinais de cremagem, essa formulação também apresentou as melhores características visuais, como aspecto mais para o azulado que é um sinal característicos de nanoemulsões. Deste modo, a formulação com valor de EHL 15 para *A. indica* foi selecionada para as análises por espalhamento dinâmico da luz.

**Figura 10** – Nanoemulsões contendo óleo de *A. indica* com valor de EHL 15, 16 e 16,7 após 24h. **A:** EHL 15, **B:** EHL 16, e **C:** EHL 16,7.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Como pode ser observado na tabela 3 depois de 24 horas (D1) a formulação de EHL 15 apresentou tamanho de gotícula de  $144,1 \pm 7,3\text{nm}$ , indicando a aparência translúcida e depois de 30 dias houve uma mudança no tamanho de gotícula, apesar da diferença do tamanho não houve mudança no aspecto da formulação. Já com relação ao IPd e o potencial zeta não houve uma variação que causasse uma diferenciação na formulação. Diferentemente da formulação contendo *M. alternifolia*, a melhor formulação para *A. indica* foi a com EHL 15, que possui em sua composição maior quantidade de Span 80, o tensoativo mais lipofílico.

**Tabela 3** – Tamanhos de gotícula, Índice de polidispersidade e potencial zeta da nanoemulsão contendo *A. indica* depois de 24h e depois de 30 dias.

### EHL 15

| Tempo | Tamanho (nm)  | Índice de polidispersão (IPd) | Potencial zeta (mV) |
|-------|---------------|-------------------------------|---------------------|
| D1    | 144,1 ± 7,3   | 0,317 ± 0,075                 | -22.0 ± 0,155       |
| D30   | 129,3 ± 2,084 | 0,354 ± 0,021                 | -22,3 ± 0,075       |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como pode ser observado na tabela 4 depois de 24 horas (D1) a formulação de Melaleuca 2x apresentou tamanho de gotícula de  $178,7 \pm 2,69\text{nm}$ , indicando a aparência translúcida e depois de 30 dias houve uma mudança no tamanho de gotícula, apesar da diferença do tamanho não houve mudança no aspecto da formulação. Já com relação ao IPd e o potencial zeta não houve uma variação que causasse uma diferenciação na formulação.

**Tabela 4** – Tamanhos de gotícula, Índice de polidispersidade e potencial zeta da nanoemulsão de Melaleuca 2x depois de 24h e depois de 30 dias.

| Tempo | Tamanho (nm)  | Índice de polidispersão (IPd) | Potencial zeta (mV) |
|-------|---------------|-------------------------------|---------------------|
| D1    | 178,7 ± 2,69  | 0,03 ± 0,02                   | -7.0 ± 0,68         |
| D30   | 187,83 ± 2,28 | 0,04 ± 0,01                   | -9,03 ± 0,42        |

Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5.2 Reologia de fluxo

Um dos parâmetros relevantes na caracterização das formulações semissólidas é a reologia, pois concede informações importantes e sobre o comportamento das formulações como desempenho e aplicação na pele. Além de avaliar características como fluxo, espalhabilidade e viscosidade da formulação, também ajuda a avaliar

estabilidade, propriedades físico-químico e sensorial das formulações durante o armazenamento (Duarte, 2023).

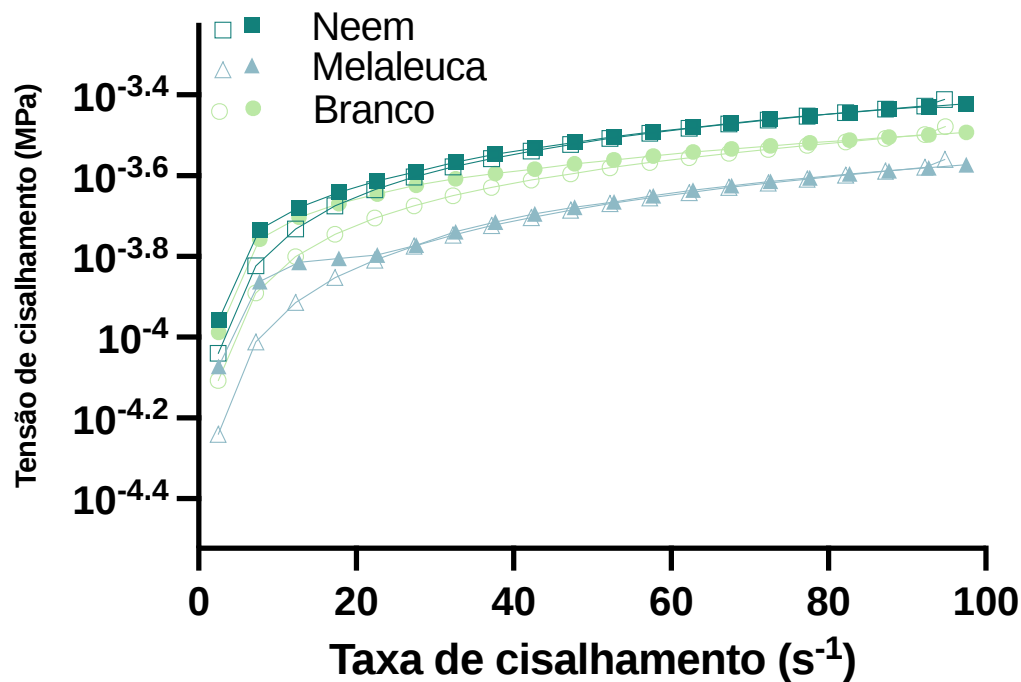
A tixotropia é uma diminuição da viscosidade aparente quando submetido a uma elevação na taxa de cisalhamento, é reversível, dependente do tempo e isotérmica (Sonebi; Yahia, 2020). Durante o processo de cisalhamento acontece a desestruturação do sistema sendo a tixotropia, no caso dos hidrogéis ocorre o afrouxamento das cadeias poliméricas (representado pela curva ascendente). Quando é retirada a tensão de cisalhamento, o processo inicial de recuperação da estrutura é demorado (demostrado pela área de histerese entre as curvas ascendente e descendente), necessitando de tempo para reestruturação das cadeias poliméricas (Ortan *et al.*, 2011). Esse comportamento foi observado para os dois hidrogéis contendo os óleos de *M. alternifolia* e *A. indica* (Figura 11 e Tabela 5).

O desejável para formulações de aplicação sobre a pele é que tenha comportamento de redução da viscosidade quando submetido a cisalhamento, pois assim terão uma característica que facilitará a espalhabilidade e a retirada do produto (Herrada-manchón; Fernández; Aguilar, 2023).

O comportamento de fluxo ( $n$ ) representa a reologia do fluido. Quando  $n=1$  os fluidos são classificados como fluidos newtonianos e  $n \neq 1$  são classificados como fluidos não newtonianos. Os valores dos índices de fluxo mostram que há uma relação linear entre a taxa de cisalhamento e a tensão de cisalhamento para fluidos Newtonianos (Ansari *et al.*, 2020). Quando o fluido vai se tornando mais viscoso, o índice de consistência ( $k$ ) aumenta; e quando um fluido vai se tornando menos viscoso, o valor de " $n$ " diminui. E quando o valor de " $n$ " é igual a 1, o fluido é considerado Newtoniano. Já se o valor de " $n$ " for maior que 1, o fluido é denominado como dilatante significando que a viscosidade aparente aumenta em quanto a taxa de cisalhamento aumenta. Se o valor " $n$ " estiver entre zero e 1, o fluido é denominado como pseudoplástico, mostrando afinamento por cisalhamento significando que a viscosidade aparente diminui em quanto a taxa de cisalhamento aumenta (Fonseca-santos *et al.*, 2019).

Os dois Hidrogéis testados apresentaram o valor de  $n < 1$ , mostrando que as duas formulações contendo os óleos são classificados com pseudoplástico.

**Figura 11** – Reologia de fluxo dos Hidrogéis. Símbolos preenchidos: ida, símbolos não preenchidos: volta.



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Tabela 5** – Índice de consistência (K) e Comportamento de fluxo (n) para os Hidrogéis.

| Formulações | Índice de consistência (Pa.s) | Comportamento de fluxo (n) | R <sup>2</sup> |
|-------------|-------------------------------|----------------------------|----------------|
| Melaleuca   | 69,00                         | 0,324                      | 0,998          |
| Neem        | 134,9                         | 0,268                      | 0,999          |
| Branco      | 108,3                         | 0,276                      | 0,998          |

Fonte: Elaborado pelo autor.

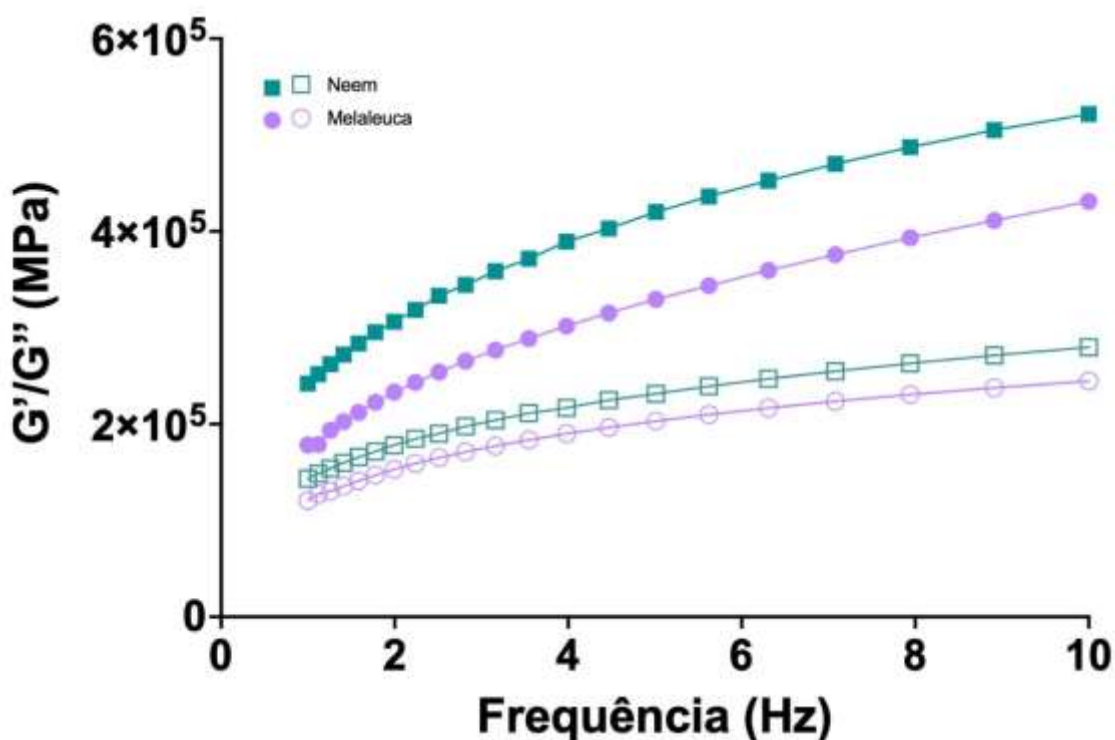
### 5.3 Reologia oscilatória

Os modelos de armazenamento e de perdas representam a reologia oscilatória e também são denominados de  $G'$  e  $G''$ , além de fornecerem informações sobre a viscoelasticidade das formulações e de suas organizações internas. O  $G'$  avalia a energia de deformação armazenada durante o processo de cisalhamento enquanto  $G''$  avalia a energia dissipada durante o cisalhamento. Se  $G'' > G'$  significa que a amostra se comporta mais como um líquido viscoso, já enquanto  $G' > G''$  significa que a amostra se comporta mais como um sólido elástico (Duarte, J., 2023).

No caso das formulações preparadas com os óleos de *M. alternifolia* e de *A. indica* contendo o carboximetilcelulose (CMC) apresentaram  $G'$  maior que  $G''$ , indicando uma menor capacidade de absorção de energia sob carregamento oscilatório (Figura 12). Isso sugere que esses hidrogéis podem ser mais elásticos.

É importante notar que os dois hidrogéis exibiram valores de  $G'$  maiores do que  $G''$ , indicando que eles são elásticos, o que é vantajoso para utilizações tópicas dos produtos, pois apresentam capacidade de manter sua forma e aderir à pele de maneira eficaz. Na literatura demonstra que formulações que tem  $G' > G''$  apresentam estruturas altamente organizadas (Calixto *et al.*, 2018).

**Figura 12** - Reologia oscilatória dos Hidrogéis. Símbolos preenchidos –  $G'$  e símbolos não preenchidos –  $G''$



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 5.4 TESTE DE REPELÊNCIA

Teste 1: Óleos diluídos em álcool 70%

Os resultados do teste de repelência referentes ao pouso dos óleos diluídos em álcool 70% mostraram que o óleo de *M. alternifolia* apresentou a maior repelência do início até as duas horas quando comparada com o óleo de *A. indica* (Tabelas 6, 7 e 8

e Figuras 13 e 14). O óleo de *M. alternifolia* diluído em álcool 70% obteve uma média de porcentagem de repelência inicial de 87,2% e após duas horas apresentou uma média de porcentagem de repelência de 46,9%; já o óleo de *A. indica* diluído em álcool 70% obteve uma média de porcentagem de repelência inicial de 38,5% e após duas horas apresentou uma média de porcentagem de repelência de 34,6%.

Com o intuito de avaliar a eficácia da nanoemulsão, como avaliar seu tempo de duração e melhora de bioatividade, foram realizados testes com os óleos diluídos em álcool 70%.

**Tabela 6** – Porcentagem de repelência dos testes realizados em 06 voluntários com álcool 70%.

| Voluntário | V1    | V2    | V3    | V4 | V5    | V6    | V7    | Média |
|------------|-------|-------|-------|----|-------|-------|-------|-------|
| 0h         | 33,8% | 11,5% | 22,6% | -  | 0%    | 26%   | 31%   | 20,8% |
| 1h         | 19,4% | 29%   | 10%   | -  | 0%    | 35%   | 25,7% | 19,9% |
| 2h         | 13,7% | 6,3%  | 15,4% | -  | 21,4% | 15,1% | 2,4%  | 12,4% |

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Tabela 7** – Porcentagem de repelência dos testes realizados em 07 voluntários com o óleo de *M. alternifolia* diluído com álcool 70%.

| Voluntário | V1    | V2    | V3    | V4    | V5    | V6    | V7    | Média |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 0h         | 94%   | 83,8% | 73,2% | 96%   | 89,5% | 90,6% | 90,4% | 88,2% |
| 1h         | 62,7% | 62%   | 63,5% | 46,7% | 63%   | 58,5% | 66,7% | 60,4% |
| 2h         | 42,5% | 50%   | 24%   | 60,5% | 53,6% | 28%   | 65,2% | 46,3% |

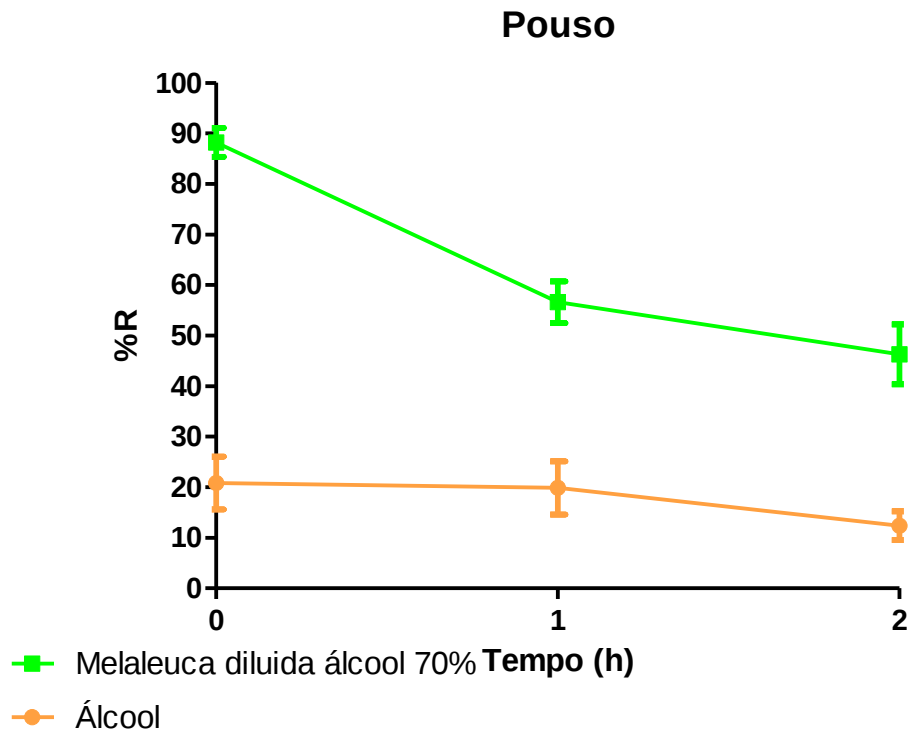
Fonte: Elaborado pelo autor.

**Tabela 8** – Porcentagem de repelência dos testes realizados em 07 voluntários com o óleo de *A. indica* diluído com álcool 70%.

| Voluntário | V1    | V2    | V3    | V4  | V5    | V6  | V7    | Média |
|------------|-------|-------|-------|-----|-------|-----|-------|-------|
| 0h         | 56,1% | 13,6% | 30,5% | 40% | 38%   | 49% | 61,4% | 41,2% |
| 1h         | 22,6% | 50,5% | 18%   | 25% | 37,7% | 48% | 34%   | 33,7% |
| 2h         | 3,5%  | 34,8% | 13,3% | 11% | 38,5% | 49% | 37,3% | 26,8% |

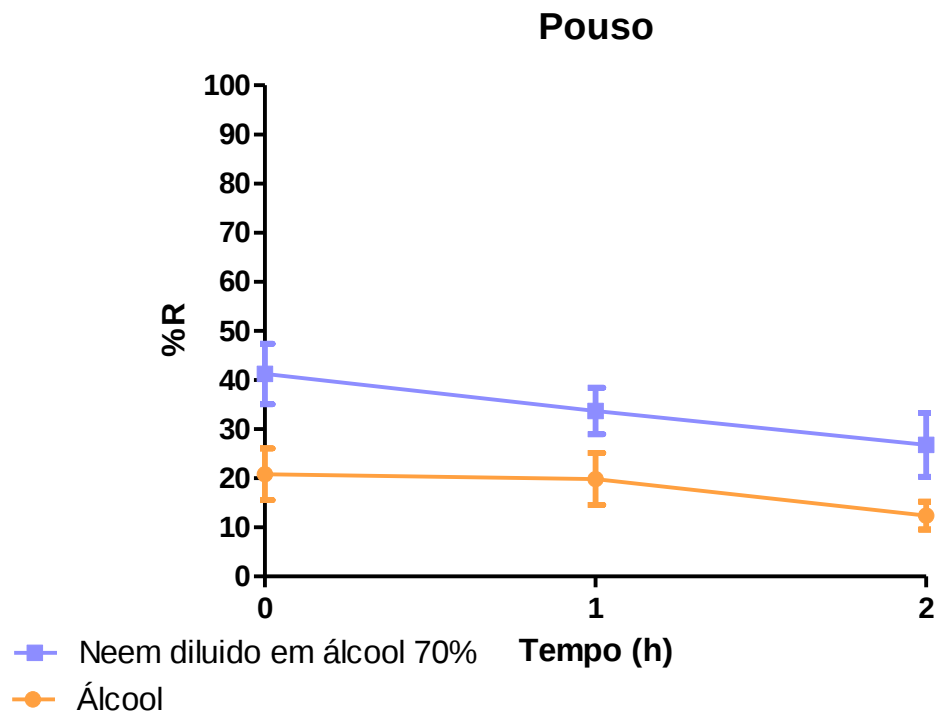
Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 13** – Porcentagem média de repelência do óleo de *M. alternifolia* diluído com álcool 70% referente ao pouso de *Lu. longipalpis*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 14** – Porcentagem média de repelência do óleo de *A. indica* diluído com álcool 70% referente ao pouso de *Lu. longipalpis*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Teste 2: Hidrogéis contendo as nanoemulsões (05g de óleo)

Os resultados dos testes de repelência referentes ao pouso mostraram que as duas formulações, de *M. alternifolia* e de *A. indica* apresentaram repelência para *Lu. longipalpis* (Tabelas 9, 10 e 11 e Figuras 15 e 16). Entretanto, *M. alternifolia* apresentou maior porcentagem de repelência, sendo aproximadamente 71% no primeiro momento, e após duas horas apresentou uma porcentagem aproximada de 34%.

A formulação de *M. alternifolia* apresentou uma porcentagem inicial igual da porcentagem de repelência do produto comercial, mas com o passar do tempo o produto comercial manteve a repelência, enquanto a repelência de *M. alternifolia* diminuiu. A formulação de *A. indica* apresentou, desde o primeiro momento, uma porcentagem menor, quando comparada ao produto comercial.

**Tabela 9** – Porcentagem de repelência dos testes realizados em 07 voluntários com o Hidrogel contendo *M. alternifolia*.

| <b>Voluntário</b> | <b>V1</b> | <b>V2</b> | <b>V3</b> | <b>V4</b> | <b>V5</b> | <b>V6</b> | <b>V7</b> | <b>Média</b> |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| 0h                | 39,1%     | 58%       | 84,8%     | 84%       | 83%       | 81,8%     | 67,5%     | 71,2%        |
| 1h                | 0%        | 44,4%     | 26,7%     | 41,2%     | 43,3%     | 58,1%     | 60,5%     | 39,2%        |
| 2h                | 36%       | 0%        | 40%       | 48,3%     | 47%       | 33,3%     | 32,3%     | 33,8%        |

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Tabela 10** – Porcentagem de repelência dos testes realizados em 07 voluntários com o Hidrogel contendo *A. indica*.

| <b>Voluntário</b> | <b>V1</b> | <b>V2</b> | <b>V3</b> | <b>V4</b> | <b>V5</b> | <b>V6</b> | <b>V7</b> | <b>Média</b> |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| 0h                | 57,1%     | 30,3%     | 61,2%     | 48,5%     | 9,8%      | 60%       | 44,7%     | 44,5%        |
| 1h                | 0%        | 30,6%     | 16,3%     | 46%       | 10,5%     | 53%       | 34,4%     | 27,3%        |
| 2h                | 60%       | 0%        | 23%       | 61%       | 16%       | 49%       | 32,4%     | 34,5%        |

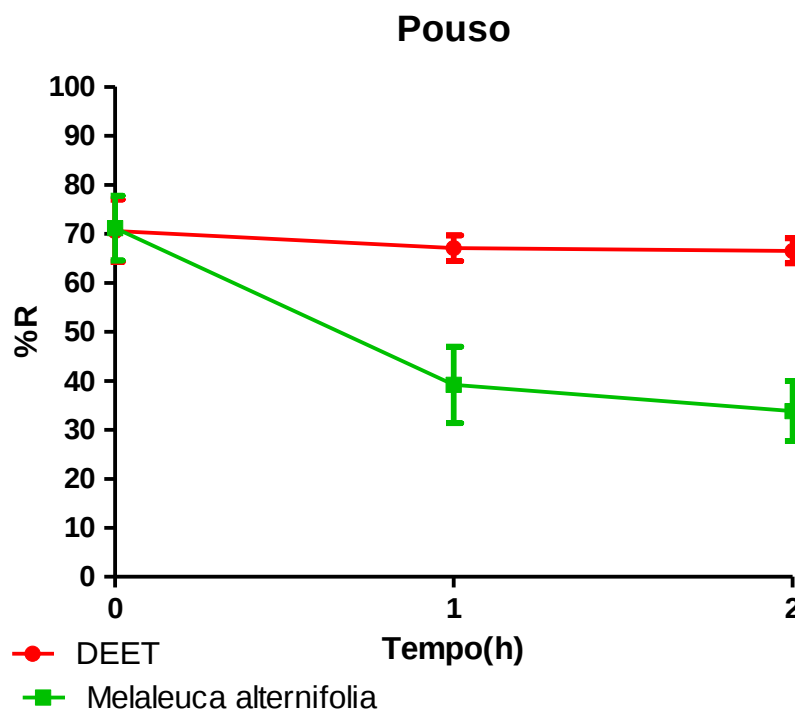
Fonte: Elaborado pelo autor.

**Tabela 11** – Porcentagem de repelência dos testes realizados em 07 voluntários com o produto comercial contendo DEET.

| <b>Voluntário</b> | <b>V1</b> | <b>V2</b> | <b>V3</b> | <b>V4</b> | <b>V5</b> | <b>V6</b> | <b>V7</b> | <b>Média</b> |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| 0h                | 86%       | 46%       | 75%       | 86%       | 85,4%     | 52,4%     | 63,4%     | 70,6%        |
| 1h                | 65,4%     | 55%       | 63,3%     | 68,4%     | 71,4%     | 69%       | 77%       | 67,1%        |
| 2h                | 68%       | 65%       | 54,5%     | 66,7%     | 65%       | 77,1%     | 69,4%     | 66,5%        |

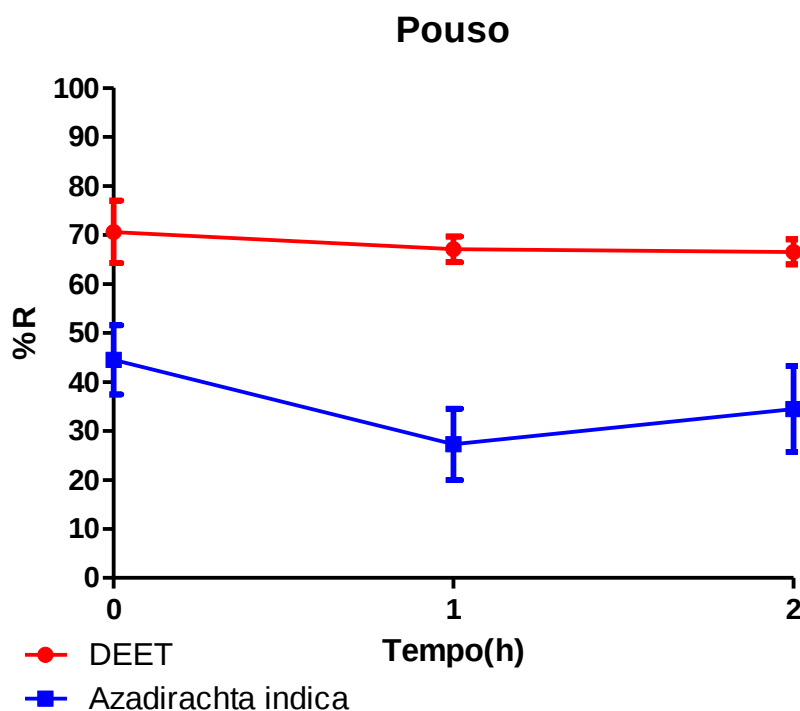
Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 15** – Porcentagem média de repelência da formulação contendo *M. alternifolia* referente ao pouso de *L. longipalpis*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 16** – Porcentagem média de repelência da formulação contendo *A. indica* referente ao pouso de *L. longipalpis*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Teste 3: Hidrogel contendo nanoemulsão de *M. alternifolia* (1g de óleo)

Após os resultados promissores de repelência do óleo de *M. alternifolia*, foi desenvolvido uma nova formulação com um aumento de 10% no volume do óleo. Essa formulação foi denominada de Melaleuca 2x.

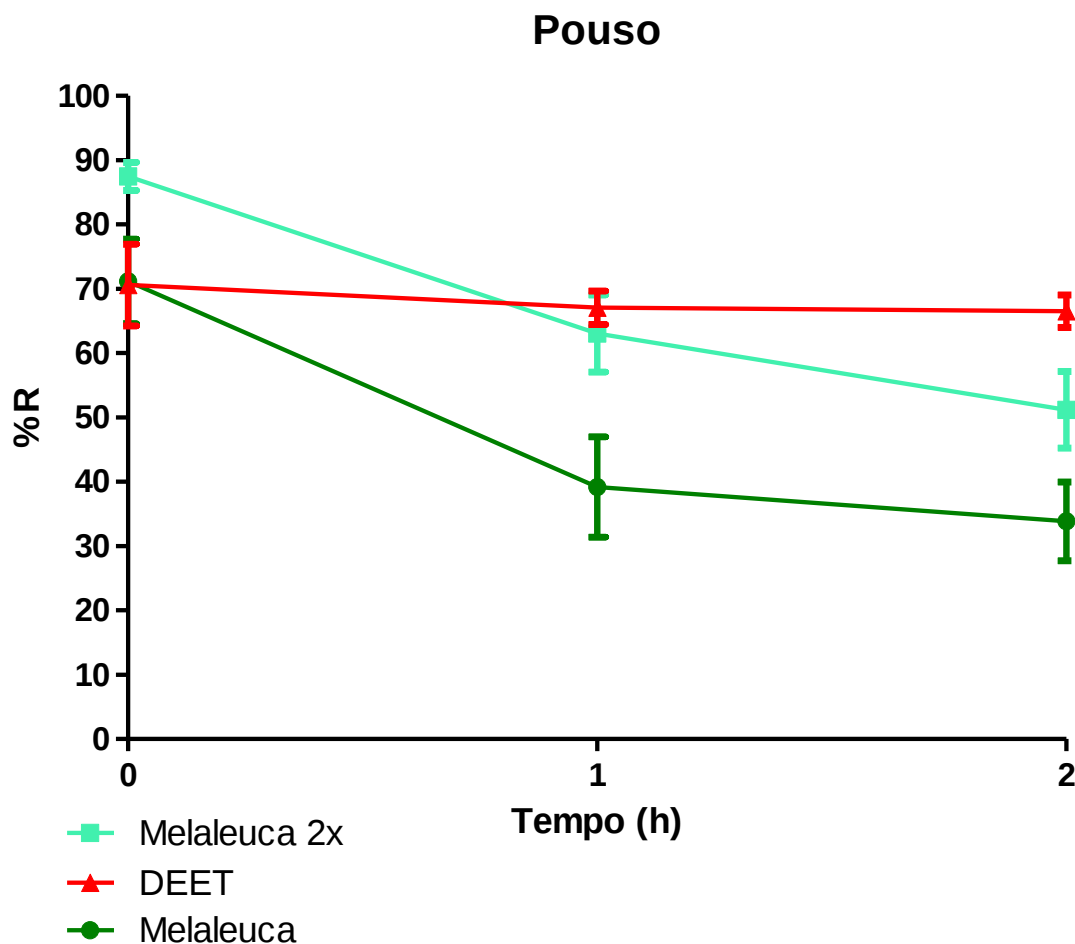
Os resultados do teste de repelência referente ao pouso da nova formulação apresentaram uma melhora na porcentagem de repelência (Tabela 12 e Figura 17) principalmente no momento inicial, com uma porcentagem de 87,7%, maior que a do produto comercial de 70,6%. A nova formulação não manteve a porcentagem de repelência ao longo do tempo, mas, estatisticamente, igualou-se ao produto comercial na primeira hora ( $p>0,05$ ).

**Tabela 12** – Porcentagem de repelência dos testes realizados em 07 voluntários com o Hidrogel contendo Melaleuca 2x.

| Voluntário | V1    | V2    | V3    | V4    | V5    | V6    | V7    | Média |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 0h         | 83,4% | 79,5% | 91,1% | 89,1% | 95,7% | 91%   | 82,6% | 87,5% |
| 1h         | 60,5% | 50%   | 34,3% | 77,8% | 72,2% | 74%   | 72,5% | 63%   |
| 2h         | 66,7% | 54,2% | 20,7% | 50%   | 54%   | 67,5% | 45,3% | 51,2% |

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 17** – Porcentagem média de repelência da nova formulação contendo *M. alternifolia* referente ao pouso de *Lu. longipalpis*.

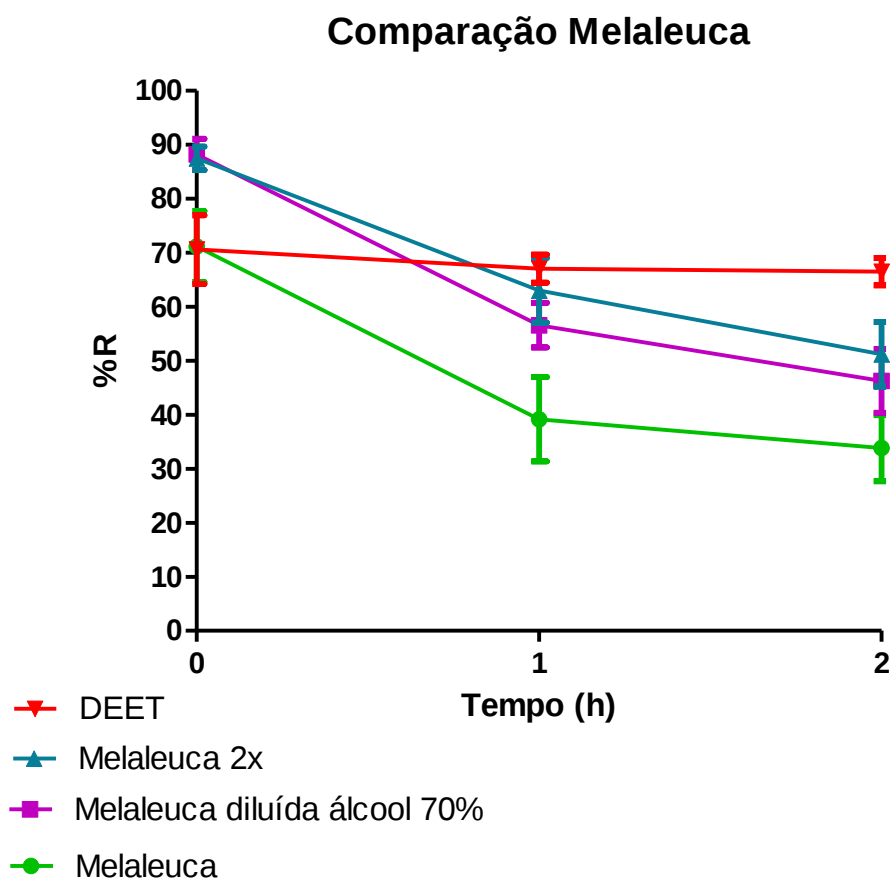


Fonte: Elaborado pelo autor.

Quando se compara os três testes para *M. alternifolia* observa-se que a formulação denominada de Melaleuca 2x foi a que apresentou a maior média de porcentagem de repelência do início até as duas horas de teste (Figura 18). A formulação contendo a nanoemulsão apresentou média de porcentagem de repelência menor comparada com a formulação do óleo diluído com álcool 70%.

No momento de aplicação do teste, não houve diferença estatística entre nenhum tratamento ( $p > 0,05$ ). Na primeira hora após a aplicação, não houve diferença estatística entre: DEET, Melaleuca 2X e Melaleuca diluída em álcool ( $p > 0,05$ ), esses três tratamentos foram diferentes estatisticamente do Melaleuca (teste 2) ( $p < 0,05$ ). Na segunda hora de aplicação do produto, somente houve diferença estatística entre o DEET e o Melaleuca (teste 2) ( $p < 0,05$ ); para o restante dos tratamentos não foi detectada diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

**Figura 18** – Comparação entre as formulações contendo *M. alternifolia* referente ao pouso de *Lu. longipalpis*.

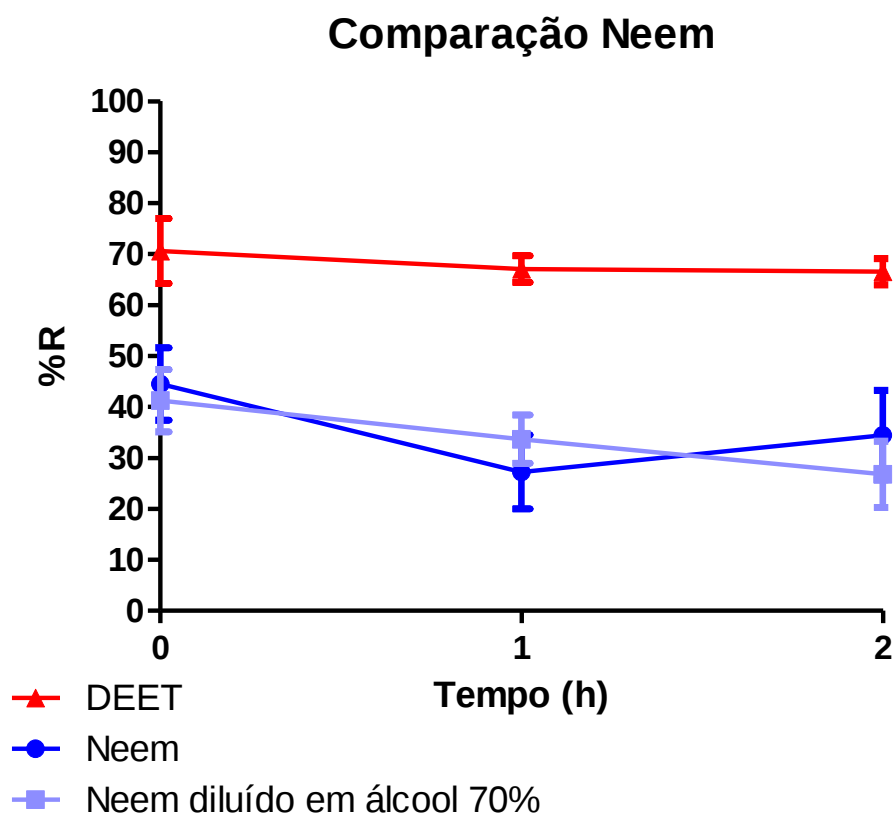


Fonte: Elaborado pelo autor.

Na comparação entre as formulações contendo *A. indica*, observa-se que as duas formulações apresentaram média de porcentagem de repelência parecidas no início e depois de duas horas, mas após uma hora a formulação diluída com álcool 70% apresentou um valor maior (Figura 19).

Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre DEET vs neem e DEET vs neem diluído em álcool 70% em todos os momentos do teste; entre neem vs neem diluído em álcool 70% não houve diferença significativa em nenhum momento do teste ( $p > 0,05$ ).

**Figura 19** – Comparação entre as formulações contendo *A. indica* referente ao pouso de *Lu. longipalpis*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O trabalho realizado por Temeyer *et al.* (2024) mostrou que para *Phlebotomus papatasi* o óleo de *M. alternifolia*, diluído em etanol, apresentou uma porcentagem de repelência de 89% em 180 min. O presente estudo também mostrou uma porcentagem de repelência elevada referente a *M. alternifolia* para *Lu. longipalpis*.

O óleo de *M. alternifolia*, diluído em metanol, foi usado como repelente para *Ae. aegypti* e apresentou 100% de proteção em 10% e 5% de concentração. O autor do artigo atribui sua atividade repelente ao composto mais ativo, o terpinen-4-ol. Terpinen-4-ol é um composto que tem um efeito repelente forte contra os adultos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (Ajmal *et al.*, 2022). Apesar da diferença dos grupos dos insetos utilizados, no presente estudo o óleo de *M. alternifolia* apresentou uma porcentagem de repelência de 70% no início contra *Lu. longipalpis*, reforçando seu potencial repelente.

O trabalho realizado por Mota *et al.* (2022) mostrou que óleo de *A. indica*, diluído em etanol, apresentou porcentagem de repelência de 41,67% para *Lu. longipalpis* com uma concentração de 38.75mg/mL, em humanos. Este dado corrobora o presente

estudo, que apresentou uma porcentagem média de repelência inicial de 44,5% com 5% de óleo essencial de *A. indica*, para *Lu. longipalpis*.

Para a espécie *Phlebotomus perniciosus*, foi demonstrado que o óleo de *A. indica* (RP03™, 2400 ppm de azadiractina) em cachorros apresentou 73,6% de repelência, uma porcentagem maior que a mostrada pelo presente estudo (Bongiorno *et al.*, 2012). Para *Phlebotomus orientalis*, o óleo de *A. indica*, diluída em óleo de coco, aplicado em humanos apresentou uma porcentagem de repelência de aproximadamente 96,28% quando utilizado em 2% de concentração em 7h e 20 min., já quando estava com uma concentração de 5% apresentou um potencial de repelência de aproximadamente 98,26% em 9h (Kebede; Gebre-michael; Balkew, 2010).

É interessante notar que mesmo o repelente comercial não apresentou 100% de repelência, mesmo no momento da aplicação, o que estimula futuras modificações nas nanoemulsões dos óleos avaliados.

## 6. CONCLUSÃO

Dentre os óleos avaliados, *M. alternifolia* apresentou maior repelência em relação à *A. indica* para *Lu. longipalpis*.

A nanoemulsão de *M. alternifolia* não prolongou a repelência, como esperado e, provavelmente, essa estrutura limitou a volatilidade dos compostos. A alteração na quantidade do produto (Melaleuca 2X) causou aumento na repelência, mas ainda não proporcionou a manutenção da repelência ao longo do tempo.

Esses resultados estimulam novas estratégias de formulação para otimizar o potencial repelente do óleo de *M. alternifolia* ou dos seus compostos isoladamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJMAL, L. *et al.* Repellent activity of trans-anethole and tea tree oil against *Aedes aegypti* and their interaction with OBP1, a protein involved in olfaction. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 2022. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Sidra-Ajmal2/publication/359933267\\_Repellent\\_activity\\_of\\_transanethole\\_and\\_tea\\_tree\\_oil\\_against\\_Aedes\\_aegypti\\_and\\_their\\_interaction\\_with\\_OBP1\\_a\\_protein\\_involved\\_in\\_olfaction/links/626a78e42e2cf87c348554d0/Repellent-activity-of-trans-anethole-and-tea-tree-oil-against-Aedes-aegypti-and-their-interaction-with-OBP1-a-protein-involved-in-olfaction.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Sidra-Ajmal2/publication/359933267_Repellent_activity_of_transanethole_and_tea_tree_oil_against_Aedes_aegypti_and_their_interaction_with_OBP1_a_protein_involved_in_olfaction/links/626a78e42e2cf87c348554d0/Repellent-activity-of-trans-anethole-and-tea-tree-oil-against-Aedes-aegypti-and-their-interaction-with-OBP1-a-protein-involved-in-olfaction.pdf). Acesso em: 12 jan. 2023.
- ANSARI, S. *et al.* Measurement of the flow behavior index of Newtonian and shear-thinning fluids via analysis of the flow velocity characteristics in a mini-channel. **SN Applied Sciences**, v. 2, p. 1-15, 2020. 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42452-020-03561-w>. Acesso em: 06 mar. 2024.
- BALASKA, S. *et al.* Chemical control and insecticide resistance status of sand fly vectors worldwide. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 8, p. e0009586, 2021. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0009586>. Acesso em: 26 maio 2024.
- BRITO, H. M. *et al.* Toxicidade de formulações de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) ao ácaro-rajado e a *Euseius alatus* De Leon e *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae). **Neotrop. Entomol.**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 500-505, Aug. 2006. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-566X2006000400012&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2006000400012&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 08 dez. 2020.
- BONGIORNO, G. *et al.* Antifeeding activity of *Azadirachta indica* (Neem) extract against sand fly bites on dogs. 2012. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20163376267>. Acesso em: 06 mar. 2024.
- BORGES, L. M. F. *et al.* Identification of non-host semiochemicals for the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae), from tick-resistant beagles, *Canis lupus familiaris*. **Ticks Tick Borne Dis.** v. 6, n. 5, p. 676-82, 2015.
- CALIXTO, G. M. F. *et al.* Polyethyleneimine and chitosan polymer-based mucoadhesive liquid crystalline systems intended for buccal drug delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, p. 820-836, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1208/s12249-017-0890-2>. Acesso em: 06 mar. 2024.
- DE SOUZA CHAGAS, A. C.; DA SILVA VIEIRA, L. Ação de *Azadirachta indica* (Neem) em nematódeos gastrintestinais de caprinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 1, p. 49-55, 2007. Disponível

em: <https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26661/28444>. Acesso em: 08 dez. 2020.

DE VILLIERS M.N., ARAMWIT, P., KWON, G.S. (Editors). **Nanotechnology in Drug Delivery**. Springer & AAPS Press. NY, USA. 2009, 663p

DE VRIES, H. JC; SCHALLIG, H. D. Cutaneous leishmaniasis: a 2022 updated narrative review into diagnosis and management developments. **American journal of clinical dermatology**, v. 23, n. 6, p. 823-840, 2022. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9472198/pdf/40257\\_2022\\_Article\\_726.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9472198/pdf/40257_2022_Article_726.pdf). Acesso em: 26 maio 2024.

DUARTE, J. L. Nanoemulsões contendo terpenos como potenciais larvicidas e repelentes contra *Aedes aegypti* (linnaeus, 1762). 2023. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/14ba00b4-442c-4e8e-a8a9-30da00801da9>. Acesso em: 06 mar. 2024.

FONSECA-SANTOS, B. *et al.* An effective mosquito-repellent topical product from liquid crystal-based tea tree oil. *Industrial Crops and Products*, v. 128, p. 488-495, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669018309956>. Acesso em: 06 mar. 2024.

GALATI, E. A. B. **Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas**. Vol I. Apostila da Disciplina Bioecologia e Identificação de Phlebotominae do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo. p. 132. 2018. Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/~egalati/>. Acesso em: 11 dez. 2020.

GONZALES, M. S. **Efeito da Azadiractina no desenvolvimento do Trypanossoma cruzi (CLONE DM-28C) EM Rhodnius prolixus STAL, 1859 (HEMIPTERA, REDUVIIDAE)**. 1992. 166 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 1992. Disponível em: <https://tede.ufrrj.br/jspui/handle/jspui/3944>. Acesso em: 29 nov. 2021.

HARO-GONZÁLEZ, J. N. *et al.* Clove essential oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, chemical composition, food applications, and essential bioactivity for human health. **Molecules**, v. 26, n. 21, p. 6387, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8588428/pdf/molecules-26-06387.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2024.

JUNKUM, A. *et al.* Ligusticum sinense nanoemulsion gel as potential repellent against *Aedes aegypti*, *Anopheles minimus*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Insects**, v. 12, n. 7, p. 596, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2075-4450/12/7/596>. Acesso em: 24 mar. 2024.

KEBEDE, Y.; GEBRE-MICHAEL, T.; BALKEW, M. Laboratory and field evaluation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and Chinaberry (*Melia azedarach* L.) oils as repellents against *Phlebotomus orientalis* and *P. bergeroti* (Diptera: Psychodidae) in

Ethiopia. **Acta tropica**, v. 113, n. 2, p. 145-150, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X09003295>. Acesso em: 16 jan. 2023.

LAMMARI, N. *et al.* Plant oils: From chemical composition to encapsulated form use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 601, p. 120538, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378517321003434?via%3Dihub>. Acesso em: 06 jun. 2024.

LIMA, R. *et al.* Composição dos óleos essenciais de Anis-estrelado *Illicium verum* L. e de Capim-limão *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: Avaliação do Efeito Repelente sobre *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae). **BioAssay**, v. 3, 2008. Disponível em: <http://www.seb.org.br/biosay/arquivos/journals/1/articles/56/public/56-266-1-PB.pdf>. Acesso em: 20 out. 2020.

MATTOS DA SILVA, M. R.; RICCI-JÚNIOR, E. An approach to natural insect repellent formulations: From basic research to technological development. **Acta tropica**, p. 105419, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X19311970>. Acesso em: 29 nov. 2021.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, p. 1719-1729, 2012. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/David\\_Mcclements/publication/255765585\\_Nanoemulsions\\_versus\\_microemulsions\\_Terminology\\_differences\\_and\\_similarities/links/54d37e490cf28e06972844d6.pdf](https://www.researchgate.net/profile/David_Mcclements/publication/255765585_Nanoemulsions_versus_microemulsions_Terminology_differences_and_similarities/links/54d37e490cf28e06972844d6.pdf). Acesso em: 14 dez. 2020.

MOHD NARAWI, M. *et al.* Biocompatible nutmeg oil-loaded nanoemulsion as phyto-repellent. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 214, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32256345/>. Acesso em 24 mar. 2024.

MONTEIRO, C. C. *et al.* **O papel da microbiota intestinal na competência vetorial do *Lutzomyia longipalpis* para a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e a transmissão do parasito ao vertebrado pela da picada.** 2012. Tese de Doutorado. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/5502/1/Disserta%3Aa7%3Aa3o%20Carolina%20Cunha%20Monteiro.pdf>. Acesso em: 20 out. 2020.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos usos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.24, p.139-148, 2005. Disponível em: [https://www.semanticscholar.org/paper/A-arvore-nim-\(Azadirachta-indica-A.-Juss\)%3A-usos-Kemmelmeier-Mossini/bb350cb994eca72415ebe220020ab1675817a880#references](https://www.semanticscholar.org/paper/A-arvore-nim-(Azadirachta-indica-A.-Juss)%3A-usos-Kemmelmeier-Mossini/bb350cb994eca72415ebe220020ab1675817a880#references). Acesso em: 08 dez. 2020.

MOTA, T. F. *et al.* Screening organic repellent compounds against *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) present in plant essential oils: Bioassay plus an in silico approach. **Acta Tropica**, v. 229, p. 106367, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X22000663?via%3Dihub>. Acesso em: 16 jan. 2023.

NEPOMOCENO, T. A. R.; PIETROBON, A. J. MELALEUCA ALTERNIFOLIA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA BRASILEIRA. **REVISTA UNINGÁ REVIEW**, v. 35, p. eRUR3409-eRUR3409, 2020. Disponível em: <http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/3409/2207>. Acesso em: 08 dez. 2020.

NIEVES, E. *et al.* Actividad repelente de aceites esenciales contra las picaduras de *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). **Rev. biol. trop**, San José, v. 58, n. 4, p. 1549-1560, Dec. 2010. Disponível em: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-77442010000400038&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442010000400038&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 20 out. 2020.

OLIVEIRA, D. F. *et al.* **Identificação dos criadouros naturais de *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) em área endêmica para a Leishmaniose Visceral, do estado da Bahia, Brasil.** 2013. Tese de Doutorado. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/7139/1/Diego%20Ferreira%20de%20Oliveira.%20Identifica%c3%a7%c3%a3o%20criadouro...pdf>. Acesso em: 20 out. 2020.

OLIVEIRA, B. R. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera* sp. e estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti*.** 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-31032009-132918/publico/Dissertacao.pdf>. Acesso em: 08 dec. 2020.

OLIVEIRA, Y. *et al.* Influência do ácido indol butírico e de diferentes alturas de coleta de estacas apicais no enraizamento de *Melaleuca alternifolia* [maiden & betche] cheel. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 18, n. 3, 2012. Disponível em: <https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/article/view/2644/2401>. Acesso em: 08 dez. 2020.

ORTAN, A. *et al.* Rheological study of a liposomal hydrogel based on carbopol. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 16, n. 1 SUPPL., p. 47–54, 2011. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Alina-Ortan/publication/228371448\\_Rheological\\_Study\\_of\\_a\\_Liposomal\\_Hydrogel\\_Based\\_On\\_Carbopol/links/55b219f908ae092e96501889/Rheological-Study-of-a-Liposomal-Hydrogel-Based-On-Carbopol.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Alina-Ortan/publication/228371448_Rheological_Study_of_a_Liposomal_Hydrogel_Based_On_Carbopol/links/55b219f908ae092e96501889/Rheological-Study-of-a-Liposomal-Hydrogel-Based-On-Carbopol.pdf). Acesso em: 06 mar. 2024.

ORTIZ-ZAMORA, L. *et al.* Preparation of non-toxic nano-emulsions based on a classical and promising Brazilian plant species through a low-energy concept. **Industrial Crops and Products**, v. 158, p. 112989, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669020309067>. Acesso em: 20 fev. 2024.

PAULA, J. P. *et al.* Atividade repelente do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth.(variedade eugenol) contra o *Anopheles braziliensis* Chagas. **Acta farmaceutica bonaerense**, v. 23, p. 376-378, 2004. Disponível em: [http://www.latamjpharm.org/trabajos/23/3/LAJOP\\_23\\_3\\_2\\_4\\_Y3B8WWZ07F.pdf](http://www.latamjpharm.org/trabajos/23/3/LAJOP_23_3_2_4_Y3B8WWZ07F.pdf). Acesso em: 20 out. 2020.

PUGLIESE, M.; GAGLIO, G.; PASSANTINO, A.; BRIANTI, E.; Napoli, E. Natural Products against Sand Fly Vectors of Leishmaniasis: A Systematic Review. **Vet. Sci.** 2021, 8, 150. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/>. Acesso em: 15 jun. 2022.

RIBAS, J.; CARRENO, A. M. Avaliação do uso de repelentes contra picada de mosquitos em militares na Bacia Amazônica. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p. 33-38, Feb. 2010. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0365-05962010000100004&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962010000100004&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 20 out. 2020.

TEMEYER, K. B. *et al.* In Vitro Evaluation of Essential Oils and Saturated Fatty Acids for Repellency against the Old-World Sand Fly, *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) (Diptera: Psychodidae). **Insects**, v. 15, n. 3, p. 155, 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2075-4450/15/3/155>. Acesso em: 06 mar. 2024.

SAKULKU, U. *et al.* Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. **International journal of pharmaceutics**, v. 372, n. 1-2, p. 105-111, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19162149/>. Acesso em: 24 mar. 2024.

SILVA, P. A. A.; MEJIA, D. P. M. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (tea tree) para uso como coadjuvante em antissépticos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 492-499, 2011. Disponível em: [https://portalbiocursos.com.br/ohs/data/docs/39/08\\_-\\_Atividade\\_antimicrobiana\\_do\\_oleo\\_essencial\\_de\\_Melaleuca\\_alternifolia\\_-\\_tea\\_tree.pdf](https://portalbiocursos.com.br/ohs/data/docs/39/08_-_Atividade_antimicrobiana_do_oleo_essencial_de_Melaleuca_alternifolia_-_tea_tree.pdf). Acesso em: 08 dez. 2020.

SINCURÁ, Y. R. Ação inseticida de extratos de folhas e cascas de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae) sobre *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). 2018. Disponível em: [http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/bitstream/1/1770/1/yrllan\\_ribeiro\\_sincura.pdf](http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/bitstream/1/1770/1/yrllan_ribeiro_sincura.pdf). Acesso em: 20 out. 2020.

SONEBI, M.; YAHIA, A. Mix design procedure, tests, and standards. In: **Self-compacting concrete: Materials, properties and applications**. Woodhead Publishing, 2020. p. 1-30. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128173695000015>. Acesso em: 06 mar. 2024.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, p. 390-400, 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/LfHYRBBPMkjtn9sYpNkdpHb/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 29 nov. 2021.

ZANESCO-FONTES, I.; SILVA, A. C. L.; SILVA, P. B.; DUARTE, J. L.; FILIPPO, L. D.; CHORILLI, M.; COMINETTI, M. R.; MARTIN, A. C. B. M. [10]-gingerol-loaded nanoemulsion and its biological effects on triple negative breast cancer cells. **AAPS PHARMSCITECH**, v. 22, p. 157, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1208%2Fs12249-021-02006-w>. Acesso em: 29 nov. 2021.

ZATELLI, A. *et al.* The knowns and unknowns of the efficacy of neem oil (*Azadirachta indica*) used as a preventative measure against *Leishmania* sand fly vectors (*Phlebotomus* genus). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 202, p. 105618, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167587722000514>. Acesso em: 12 jan. 2023.

## ANEXO

## ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA

|                                                                                                                                                                                                                         |                                                                          |                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p>Comitê de<br/>Ética em<br/>Pesquisa</p> <p><small>Faculdade de Ciências Farmacêuticas<br/>Câmpus de Araraquara - UNESP</small></p> | <p>UNESP - FACULDADES DE<br/>CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS<br/>DO CAMPUS DE</p> |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Efeito repelente de óleos essenciais para flebotomíneos.

**Pesquisador:** Mara Cristina Pinto

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 65806122.8.0000.5426

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.882.002

## Apresentação do Projeto:

Os flebotomíneos são insetos pertencentes à Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotomus. Possuem mais de 500 espécies descritas nas Américas. Os flebotomíneos são holometábolos.

As fêmeas são fitófagas e também hematófagas. Por possuírem hábitos hematófagos podem ser transmissores de bactérias que causam a Bartonelose, vírus e também protozoários como os causadores das leishmanioses.

Nas Américas, o *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor do agente etiológico da leishmaniose visceral, sendo o vetor mais importante da *Leishmania infantum*. Um método de controlar os vetores se dá pelo uso de inseticidas de origem química. Outras estratégias que impeçam o contato entre o vetor e o ser humano, são a utilização de telas ou a aplicação de repelentes. Os repelentes, como medida de proteção individual, se apresentam como uma boa alternativa preventiva para evitar as picadas dos vetores.

Os óleos essenciais de plantas se apresentam como possibilidades interessantes, pois possuem atividades inseticidas que podem ocorrer de diversas formas: causando morte, deformações em qualquer estágio de desenvolvimento, além de ter função de repelência.

As leishmanioses fazem parte das doenças negligenciadas, que se caracterizam por atingir populações de vulnerabilidade, assim como apresentam lacunas em pesquisas que consigam trazer avanços na terapia, diagnóstico e profilaxia.

|                                                                                                                                                                      |                                                                 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <b>Endereço:</b> Rodovia Araraquara Jaú, km 1<br><b>Bairro:</b> Campus Universitário<br><b>UF:</b> SP <b>Município:</b> ARARAQUARA<br><b>Telefone:</b> (16)3301-4657 | <b>CEP:</b> 14.801-902<br><br><b>E-mail:</b> sta@fctar.unesp.br |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|



Continuação do Parecer: 5.882.002

Os estudos com óleos essenciais como repelentes para flebotomíneos são incipientes e, aqueles que utilizam a nanotecnologia para incrementar uma possível ação repelente são inexistentes.

O óleo essencial de *A. indica* apresentou indícios de repelência para espécies de lebotomíneos do Velho Mundo, enquanto para *M. alternifolia* não há estudos nessa área.

Ressalta-se ainda que um limitante para o uso de óleos essenciais como repelentes é seu reduzido tempo de eficácia.

Tendo em vista esse cenário, o presente estudo tem como objetivo avaliar dois óleos essenciais, *Melaleuca alternifolia* e *Azadirachta indica*, e formulação de nano emulsões que contenham esses óleos essenciais, para avaliar sua possível ação de repelência frente à espécie de flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da leishmaniose visceral.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo do estudo é avaliar dois óleos essenciais, *Melaleuca alternifolia* e *Azadirachta indica*, e formulação de nano emulsões que contenham esses óleos essenciais, para avaliar sua possível ação de repelência frente à espécie de flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da leishmaniose visceral.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** O risco será mínimo, uma vez que os insetos não entrarão em contato com o braço do indivíduo, pois haverá uma tela de separação. Para averiguar a possibilidade de reação alérgica, antes da aplicação no braço, os óleos essenciais serão aplicados em uma pequena área da mão.

**Benefícios:** O benefício será ter mais opção de repelentes menos tóxico no mercado.

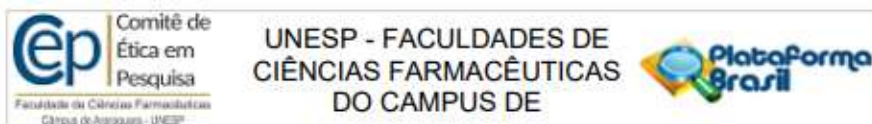
#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Para avaliar a eficiência dos óleos essenciais como repelente usando a metodologia desenvolvida no laboratório de Parasitologia para que os voluntários não tenham contato com os insetos.

Será usado o túnel de vento que é constituído de uma peça de acrílico contínua de 30X30cm com 2 metros de comprimento que contém uma tampa móvel. Um cilindro de ar sintético, conecta-se ao túnel, o que permite a formação de um fluxo de ar que empurra os voláteis até os insetos.

Para os testes de repelência, não haverá a entrada do ar. Uma peça de acrílico foi desenhada e construída para delimitar o espaço onde os voluntários colocarão o antebraço e os insetos serão liberados a 40 cm do novo aparato. Essa peça de acrílico, na forma de um paralelepípedo, tem 12x12cm com 24 cm de comprimento. Na entrada do túnel há uma peça quadrada de acrílico contendo uma abertura que se encaixa adequadamente na entrada do túnel.

**Endereço:** Rodovia Araraquara Jaú, km 1  
**Bairro:** Campus Universitário  
**UF:** SP **Município:** ARARAQUARA **CEP:** 14.801-902  
**Telefone:** (16)3301-4657 **E-mail:** sta@fciar.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.882.002

Na abertura da peça há um trilho que permite o deslizamento do aparato que é encaixado nessa parte, podendo ser removido e trocado durante os testes. Este aparato móvel apresenta uma abertura na sua parte superior e anterior as quais são revestidas com tecido voil, onde os insetos deverão posar para tentar a alimentação no braço do voluntário.

O tecido voil permite a liberação de compostos voláteis humanos atrativos para os insetos, sendo possível mensurar a aproximação do mesmo, sendo trocado durante a manipulação dos diferentes compostos.

Para cada teste desenvolvido são utilizados grupos diferentes de 15 a 20 fêmeas de flebotômíneos. Os insetos retirados da colônia são armazenados em caixas menores de acrílico dispostas dentro do túnel de vento. Os flebotômíneos são liberados na região oposta ao aparato sendo mensurada sua aproximação na área revestida pelo voil.

Com o intuito de avaliar a nova metodologia, o DEET será utilizado como controle positivo nessa fase dos experimentos. O antebraço dos voluntários será previamente lavado com extram 5% seguido de álcool isopropílico 50% ambos diluídos em água deionizada. Um dos antebraços será o controle e o outro o tratamento. A quantidade de DEET necessária para o teste será de 12,63 ul.

O teste terá duração total de 2 horas, será avaliada a atividade repelente no momento em que foi feita a aplicação (T0), uma hora após a aplicação (T60') e duas horas após a aplicação (T120'). O tempo decorrido no teste seguirá a recomendação descrita pelo fabricante da duração da atividade repelente do DEET.

Nos tempos descritos acima, os dois braços ficarão por 5 minutos no aparato (primeiro o controle e depois o tratamento) e será mensurada a quantidade de pousos observados no tecido voil que recobre a área exposta do antebraço.

A porcentagem de repelência é avaliada o número de tentativas de picadas (número de pousos) durante o tempo dos testes é anotado para que seja feito o cálculo da porcentagem de repelência, de acordo com a seguinte fórmula:  $\%R = (Nc/Nt)/NCX100$  Onde Nc é o número total de pousos no antebraço controle negativo e Nt o número total de pousos no antebraço tratado com os compostos testados. O teste de t student será utilizado para avaliar as médias de pousos dos insetos nos tempos 0, 60 e 120 min.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi apresentado e encontra-se redigido seguindo as orientações do CEP/CONEP.

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A Vice coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, no

|                                               |                                   |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Endereço:</b> Rodovia Araraquara Jdú, km 1 | <b>CEP:</b> 14.801-902            |
| <b>Bairro:</b> Campus Universitário           |                                   |
| <b>UF:</b> SP                                 | <b>Município:</b> ARARAQUARA      |
| <b>Telefone:</b> (16)3301-4657                | <b>E-mail:</b> sta@fctar.unesp.br |



**Comitê de  
Ética em  
Pesquisa**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Câmpus de Araraquara - UNESP

**UNESP - FACULDADES DE  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
DO CAMPUS DE**



Continuação do Parecer: 5.882.002

exercício da Coordenadoria, analisou e aprovou "ad referendum" o projeto de pesquisa em questão. O Relatório Parcial deverá ser entregue em agosto de 2023, e o Relatório Final, junto aos Termos de Consentimento Livre Esclarecido (originais e assinados em todas as folhas), deverá ser entregue em fevereiro de 2024.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento                                            | Arquivo                                           | Postagem               | Autor               | Situação |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------|---------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto                            | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P<br>ROJETO_2022688.pdf | 06/02/2023<br>15:21:26 |                     | Aceito   |
| Outros                                                    | cartarespostaCEP.pdf                              | 06/02/2023<br>15:20:54 | Mara Cristina Pinto | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLEMatheus.pdf                                   | 06/02/2023<br>15:19:48 | Mara Cristina Pinto | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | ProjetoMestradoRepelente_CEP.pdf                  | 06/02/2023<br>15:19:22 | Mara Cristina Pinto | Aceito   |
| Folha de Rosto                                            | folhaDeRosto.pdf                                  | 06/02/2023<br>15:14:31 | Mara Cristina Pinto | Aceito   |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

ARARAQUARA, 08 de Fevereiro de 2023

Assinado por:  
**CLEOPATRA DA SILVA PLANETA**  
(Coordenador(a))

|                                                                                                                                                                      |                                                                  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| <b>Endereço:</b> Rodovia Araraquara JdJ, km 1<br><b>Bairro:</b> Campus Universitário<br><b>UF:</b> SP <b>Município:</b> ARARAQUARA<br><b>Telefone:</b> (16)3301-4657 | <b>CEP:</b> 14.801-902<br><br><b>E-mail:</b> sta@fctfar.unesp.br |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|

**ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

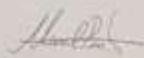
Eu \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, fui convidado(a) a participar da pesquisa intitulada "EFEITO REPELENTE DE NANOEMULSÕES CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Melaleuca alternifolia* E *Azadirachta indica* FRENTE À *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE)" sob a responsabilidade da Profa. Dra. Mara Cristina Pinto, assino este **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** com a finalidade de autorizar minha participação como participante do projeto citado e afirmo que foram dadas todas as explicações necessárias para eu possa tomar essa decisão de livre e espontânea vontade.

Assim tenho conhecimento que:

1. O trabalho tem por finalidade avaliar possíveis substâncias para repelir um inseto (Flebotomíneo) que é transmissor da leishmaniose. Os resultados da pesquisa serão utilizados como estratégia para a contenção dessa doença.
2. A minha participação como voluntário(a) nessa pesquisa será realizada em dois dias com duração total de duas horas, de acordo com a minha disponibilidade de horário.
3. Para os testes será utilizada um túnel de vento feita de acrílico (30X30cm com 2 metros de comprimento). O antebraço do voluntário será introduzido em uma peça de acrílico que foi desenhada e construída para delimitar o espaço onde os voluntários colocarão o antebraço e é revestido com tecido voil. O aparato permitirá que o antebraço do voluntário fique dentro do túnel de vento sem que esse seja picado pelos insetos, dessa forma não haverá contato direto com os insetos. O tecido permitirá a liberação de compostos voláteis humanos atrativos para o flebotomo, sendo possível mensurar a aproximação do mesmo. Inicialmente o voluntário aplicará as substâncias testadas em uma pequena área da mão para observar possível reação alérgica; caso não haja reação, uma pequena parte do antebraço receberá os compostos.
4. O risco de participar dessa pesquisa é mínimo, pois serão aplicadas substâncias orgânicas atóxicas em uma parte do meu antebraço e este será envolvido por um aparato para a observação da aproximação dos insetos, os quais não irão me picar. Para verificar se não haverá reação alérgica aos compostos utilizados, antes da aplicação no antebraço, os mesmos serão aplicados em uma pequena área da minha mão.
5. Caso ocorra alguma reação alérgica, serei levado pelo pesquisador a um atendimento ambulatorial mais próximo para atendimento médico.
6. Estou ciente que ao participar da pesquisa estarei sujeito ao risco de arrependimento, ou constrangimento, mas como minha participação é voluntária, tenho direito de interrompê-la em qualquer momento sem sofrer penalizações.
7. Estou ciente de que como não terei nenhum gasto com a minha participação nesta pesquisa não estão previstos ressarcimento de gastos.
8. O pesquisador manterá sigilo absoluto de minha identidade, principalmente durante a apresentação dos dados da pesquisa.
9. Foi concedido a mim tempo necessário para que eu pudesse refletir antes de tomar a decisão de participar da presente pesquisa.
10. O documento será emitido em duas vias, sendo que receberei uma via deste Termo de Consentimento datada e assinada e a outra ficará com o responsável pela pesquisa.
11. Caso eu sofra algum dano decorrente de minha participação, farei jus à reparação.
12. Ao final da pesquisa, terei direito de acessar os resultados obtidos.

Araraquara, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

Assinatura do Voluntário

  
Prof. Mara Cristina Pinto  
Pesquisador Responsável

Contato do pesquisador responsável: (16) 3301-6944

Contato do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFar: (16) 3301-4657

## ANEXO C - LAUDO DE QUALIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Azadirachta indica*

### ÓLEO DE NIM NEEM OIL

|                     |                            |
|---------------------|----------------------------|
| <b>INCI</b>         | Azadirachta indica A. Juss |
| <b>CAS</b>          | 8002-65-1                  |
| <b>NCM</b>          | 3301.29.90                 |
| <b>Procedência:</b> | Nacional                   |
| <b>Processo:</b>    | Cold Press                 |

### Análise Físico-Química

| DADOS                                   | PARÂMENTRO          | RESULTADOS |
|-----------------------------------------|---------------------|------------|
| Cor                                     | Castanho esverdeado | Ok         |
| Odor                                    | Característico      | Ok         |
| Densidade (g/cm <sup>3</sup> )          | 0,85 – 0,95         | 0,93       |
| Viscosidade (mPa.s)                     | 80,0 – 130,0        | 121,1      |
| Índice Acidez                           | Máx. 1              | 0,9        |
| Índice Refração                         | 1450 – 1,480        | 1,462      |
| Índice Peróxido (meqO <sub>2</sub> /kg) | Máx. 20             | Ok         |
| Índice Saponificação                    | 180 - 195           | 190        |
| Substancia Ativa (Azadirachtina A)      | 1.200 – 3.000 (ppm) | 2.917,9    |
| Substancia Ativa (Azadirachtina B)      | 150 – 450 (ppm)     | 343,2      |

- Testes realizados a temperatura ambiente 25°C

## ANEXO D - LAUDO DE QUALIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia*



## LAUDO TÉCNICO DE ANÁLISE



|                                     |                                         |
|-------------------------------------|-----------------------------------------|
| NOME COMERCIAL                      | Óleo essencial de Tea Tree 10ml         |
| NOME CIENTÍFICO                     | <i>Melaleuca Alternifolia</i>           |
| PARTE DA PLANTA E FORMA DE EXTRAÇÃO | Destilação a vapor da planta florida    |
| COMPONENTES PRINCIPAIS              | 4-terpineol / γ-terpineno / α-terpineno |
| LOTE TERRA FLOR                     | 22215                                   |
| PRODUZIDO EM                        | 11/10/2022                              |
| VALIDADE                            | out/25                                  |

### PROPRIEDADES

|                   | FORNECEDOR             | ANÁLISE TERRA FLOR                 |
|-------------------|------------------------|------------------------------------|
| APARÊNCIA         | Líquido                | Líquido                            |
| ODOR              | Pungente, adstringente | Pungente, adstringente             |
| COR               | Levemente amarelado    | Levemente amarelado, quase incolor |
| DENSIDADE (g/cm³) | 0,887                  | 0,896                              |
| ÍNDICE REFRAÇÃO   | 1,478                  | N/D                                |
| ROTAÇÃO ÓPTICA    | N/D                    | N/D                                |

ESTE DOCUMENTO É UMA CÓPIA FIEL DO LAUDO TÉCNICO DO FORNECEDOR E A ANÁLISE DO PRODUTO FEITA PELA TERRA FLOR DE ACORDO COM O CONTROLE DE QUALIDADE DEFINIDO PELA EMPRESA. ESTE LAUDO É DIGITAL, PORTANTO, DISPENSA ASSINATURA.

Rua 9, quadra 10 - Lote 01  
Setor Planalto - Alto Paraíso de Goiás  
(62) 3446-2162 - atendimento@terra-flor.com

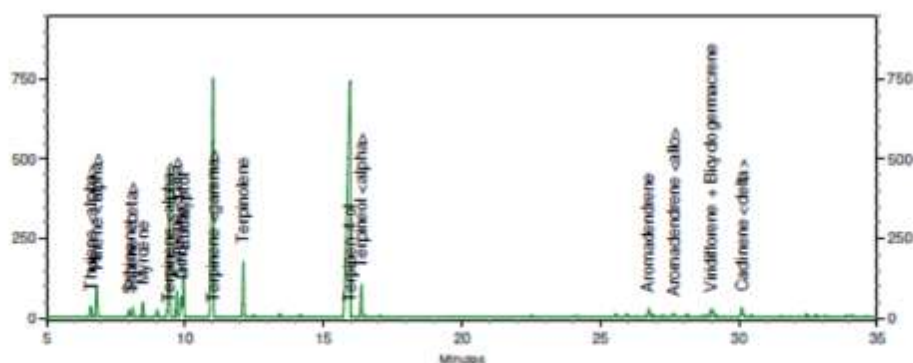


Este documento é uma cópia fiel do fornecedor.

Óleo essencial: Tea Tree - *Melaleuca alternifolia*  
Lote Fornecedor: 4643-21  
Lote Terra Flor: 22215  
Data produção lote: 11/10/2022

| Número do pico             | Tempo retenção (min) | Concentração % | Nome do composto*                 | CAS#                    |
|----------------------------|----------------------|----------------|-----------------------------------|-------------------------|
| 1                          | 6,60                 | 0,9            | Thujene <alpha>                   | 2867-05-2               |
| 2                          | 6,81                 | 2,8            | Pinene <alpha>                    | 80-56-8                 |
| 3                          | 7,99                 | 0,5            | Sabinene                          | 3387-41-5               |
| 4                          | 8,11                 | 0,8            | Pinene <beta>                     | 127-91-3                |
| 5                          | 8,49                 | 1,0            | Myrcene                           | 123-35-3                |
| 6                          | 9,44                 | 11,6           | Terpinene <alpha>                 | 99-86-5                 |
| 7                          | 9,70                 | 1,7            | Cymene <para>                     | 99-87-6                 |
| 8                          | 9,86                 | 1,9            | Limonene                          | 5989-27-5               |
| 9                          | 9,95                 | 3,2            | Eucalyptol                        | 470-82-6                |
| 10                         | 11,02                | 22,9           | Terpinene <gamma>                 | 99-85-4                 |
| 11                         | 12,11                | 3,9            | Terpinolene                       | 586-62-9                |
| 12                         | 15,96                | 38,5           | Terpinen-4-ol                     | 562-74-3                |
| 13                         | 16,38                | 2,5            | Terpineol <alpha>                 | 98-55-5                 |
| 14                         | 26,75                | 0,8            | Aromadendrene                     | 489-39-4                |
| 15                         | 27,63                | 0,4            | Aromadendrene <allo>              | 25246-27-9              |
| 16                         | 29,01                | 1,1            | Viridiflorene + Bicyclogermacrene | 21747-46-6 / 24703-35-3 |
| 17                         | 30,11                | 0,8            | Cadinene <delta>                  | 483-76-1                |
| % de picos controlados     |                      | 95,3           | -                                 | -                       |
| % de picos não controlados |                      | 4,7            | -                                 | -                       |
| Total                      |                      | 100,0          | -                                 | -                       |

\* Identificação apenas dos componentes controlados.



Documento digital, válido sem assinatura.