



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



**Nanoemulsões contendo terpenos como potenciais larvicidas e repelentes
contra *Aedes aegypti* (linnaeus, 1762)**

Jonatas Lobato Duarte

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli
Coorientadora: Prof. Dra. Mara Cristina Pinto

Araraquara - SP

2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



**Nanoemulsões contendo terpenos como potenciais larvicidas e repelentes
contra *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)**

Jonatas Lobato Duarte

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas
como requisito para a obtenção do título
de doutor em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli
Coorientadora: Prof. Dra. Mara Cristina
Pinto

Araraquara – SP
2023

D813n Duarte, Jonatas Lobato.
Nanoemulsões contendo terpenos como potenciais larvicidas e repelentes contra *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) / Jonatas Lobato Duarte. – Araraquara: [S.n.], 2023.
110 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Marlus Chorilli.
Coorientadora: Mara Cristina Pinto.

1. Monoterpenos. 2. p-cimeno. 3. Mirceno. 4. Hidrogel. 5. Docking molecular. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Pinto, Mara Cristina, coorient. III. Título.

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

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Nanoemulsões contendo terpenos como potenciais larvicidas e repelentes contra o *Aedes aegypti*

AUTOR: JONATAS LOBATO DUARTE

ORIENTADOR: MARLUS CHORILLI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. JOSEAN FECHINE TAVARES (Participação Virtual)
Laboratório de Tecnologia Farmacêutica / Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Prof. Dr. LEONARDO FERNANDES FRACETO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Ambiental / Instituto de Ciência e Tecnologia do Campus de Sorocaba da Unesp

Prof. Dr. MATHEUS DE FREITAS FERNANDES PEDROSA (Participação Virtual)
Centro de Ciências da Saúde / Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Profa. Dra. FERNANDA NERVO RAFFIN (Participação Virtual)
Centro de Ciências da Saúde / Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Araraquara, 20 de outubro de 2023

Agradecimentos

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

Primeiramente, minha família merece uma menção especial. Seu amor, apoio e encorajamento ao longo de todo o meu percurso acadêmico foram inestimáveis. Vocês foram a minha fonte constante de inspiração e motivação, impulsionando-me a alcançar meus objetivos e superar desafios. Cada conquista obtida é, em grande parte, resultado do seu apoio incansável.

Ao Leonardo e ao meu fiel companheiro de quatro patas, José Farofa, minha gratidão também se estende a vocês. As horas de pesquisa muitas vezes eram aliviadas pela presença e alegria de vocês. O amor de vocês, suas brincadeiras e carinho trouxeram equilíbrio e felicidade aos meus dias.

Aos meus amigos, em especial à Família Souza, ao Lucas e a Carol minha profunda gratidão por todo apoio sendo a minha família em Araraquara. A todos os meus amigos que ficaram em Macapá, em especial a Anna Eláyne, Ana Cássia e Adriene. Sua amizade e apoio contínuo foram um farol nos momentos mais desafiadores e uma fonte de alegria nas comemorações mais felizes. Compartilhar essa jornada com todos vocês tornou-a significativa e memorável.

À Anna Eliza, desejo expressar minha sincera gratidão. Seu apoio, paciência, leituras críticas e correções detalhadas foram fundamentais para a qualidade deste trabalho. Sou imensamente grato por sua generosidade e dedicação.

Ao meu orientador, Professor Marlus Chorilli, agradeço do fundo do coração. Sua orientação sábia, conhecimento vasto e inabalável dedicação foram os pilares deste trabalho. Suas orientações moldaram meu percurso acadêmico e profissional, e sou profundamente grato por tê-lo como mentor.

A minha coorientadora Prof. Mara Cristina por todas as conversas e dicas. Suas contribuições foram valiosas na construção deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de farmacotécnica, agradeço por compartilhar ideias, conhecimento e experiências. Em especial a Andreia Meneguim, a Suzana e a Aline Martins por todas as conversas e dicas durante essa jornada que foi o doutorado. Sua colaboração e apoio foram essenciais para o sucesso deste projeto.

Aos estimados professores da FCFAR-UNESP, em especial as Professoras Rosemeire e Leila bem como ao pessoal da seção técnica, agradeço por sua

contribuição à minha formação acadêmica e por tornar minha jornada de pesquisa possível.

Ao Dr. Vincent Corbel, meu supervisor no BEPE, e a todos no IRD, especialmente ao Stéphane Duchon, minha gratidão por proporcionar oportunidades de crescimento profissional e aprendizado valioso.

À Professora Cristiane Duque, pelo auxílio precioso nos experimentos de citotoxicidade.

Agradeço ao Professor José Carlos Tavares pela mentoria desde o início da minha carreira. Seus conselhos e sua amizade foram fundamentais para a minha formação. A Adriana Maciel e a Gisele Custódio pelo suporte essencial nos experimentos com o Zebrafish.

À Lorane Hage Melim, pela expertise nos experimentos de docking, e ao Gabriel Marena e à Professora Thais Bauab, pela colaboração nos experimentos com a Galleria.

A Professora Estela Sasso Cerri pelo auxílio na histologia das larvas, muito obrigado.

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

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado no País (Proc. 2019/25125-7) e pela Bolsa Estágio de pesquisa no exterior - BEPE (Proc. 2021/11487-9), as quais viabilizaram esta pesquisa e meu desenvolvimento como pesquisador.

A cada um de vocês, meu mais sincero e profundo agradecimento. Seu apoio, dedicação e presença ao longo desta jornada foram inestimáveis. Cada desafio superado e conquista obtida é reflexo do compartilhamento de conhecimento e colaboração de todos vocês. Minha gratidão é eterna.

RESUMO

O *Aedes aegypti* L. é um inseto de extrema importância médica, sendo o vetor de diversas doenças que representam um grave problema para a saúde pública em todo o mundo, incluindo a dengue, a zika, a chikungunya e a febre amarela. A prevenção dessas arboviroses é fundamental, e repelentes e agentes larvicidas são ferramentas essenciais nesse esforço. Historicamente, compostos derivados de plantas medicinais, notadamente os óleos essenciais (OEs), têm sido utilizados como inseticidas e repelentes. Os OEs são ricos em terpenos, como os monoterpenos e sesquiterpenos, que são substâncias de baixo peso molecular e alta volatilidade. Entre os monoterpenos, o mirceno e o p-cimeno destacam-se pelas suas propriedades inseticidas e repelentes. No entanto, esses compostos apresentam baixa solubilidade em água e instabilidade, o que limita sua aplicação prática. Nesse contexto, a nanotecnologia surge como uma estratégia promissora para melhorar a solubilidade desses terpenos em água, além de proteger e entregar esses ativos de maneira eficaz. A presente tese concentrou-se no desenvolvimento de nanoemulsões contendo p-cimeno e mirceno, com o objetivo de avaliar sua atividade larvicida e repelente frente ao *Aedes aegypti* L. Um método analítico robusto foi desenvolvido por cromatografia líquida para a quantificação precisa desses terpenos. As nanoemulsões apresentaram tamanho de gotícula em torno de 120 nm e estabilidade mantida por até 60 dias após a obtenção. Além disso, demonstraram ser citocompatíveis com a linhagem celular HaCat, indicando baixa toxicidade para as células humanas. Os testes de toxicidade em larvas de *Galleria mellonella* e Zebrafish também revelaram baixa toxicidade aguda, consolidando a segurança dessas formulações. Os hidrogéis desenvolvidos a partir das nanoemulsões apresentaram pelo estudo reológico comportamento pseudoplástico e tixotropia, tornando-os adequados para aplicação tópica. Dentre os hidrogéis, o constituído de carboximetilcelulose (CMC) foi escolhido para testes repelentes devido às suas características sensoriais favoráveis e propriedades bioadesivas. Os hidrogéis exibiram liberação controlada e baixa permeação de p-cimeno e mirceno, demonstrando uma atividade repelente significativa contra mosquitos adultos. Nos experimentos de repelência espacial os ativos livres apresentaram respostas opostas, o p-cimeno apresentou atividade atrativa e o mirceno apresentou atividade repelente. Por outro lado, os hidrogéis contendo estes mesmos ativos apresentaram um potencial promissor como repelentes, com evidências de ancoragem molecular em um receptor odorante, um alvo tradicional de atividade repelente. Esses resultados indicam que as formulações desenvolvidas neste estudo têm um potencial notável para o controle eficaz do *A. aegypti*, contribuindo para a prevenção de doenças transmitidas por mosquitos. A aplicação bem-sucedida da nanotecnologia na formulação de nanoemulsões e hidrogéis não apenas melhorou a eficácia dessas formulações, mas também a sua segurança e aceitabilidade. Em conjunto, este estudo representa uma abordagem promissora para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes e seguras no combate às doenças transmitidas por mosquitos, com aplicações significativas na saúde pública global.

Palavras-chave: monoterpenos; p-cimeno; mirceno; hidrogel; docking molecular.

ABSTRACT

Aedes aegypti L. is a medically significant insect, serving as the vector for various diseases that pose a serious global public health challenge, including dengue, Zika, chikungunya, and yellow fever. Preventing these arboviruses is paramount, with repellents and larvicidal agents being essential tools in this endeavor. Historically, compounds derived from medicinal plants, notably essential oils (EOs), have been used as insecticides and repellents. EOs are rich in terpenes, such as monoterpenes and sesquiterpenes, which are low-molecular-weight, highly volatile substances. Among monoterpenes, myrcene and cymene stand out for their insecticidal and repellent properties. However, these compounds have low water solubility and stability, limiting their practical application. In this context, nanotechnology emerges as a promising strategy to enhance the water solubility of these terpenes and effectively deliver and protect these active agents. This thesis focused on developing nanoemulsions containing cymene and myrcene, with the aim of evaluating their larvicidal and repellent activity against *Ae. aegypti* L. A robust analytical method was developed using liquid chromatography for precise quantification of these terpenes. The nanoemulsions exhibited particle sizes around 120 nm and stability maintained for up to 60 days post-preparation. Furthermore, they demonstrated cytocompatibility with the HaCat cell line, indicating low toxicity to human cells. Toxicity tests on *Galleria mellonella* and Zebrafish larvae also revealed low acute toxicity, reaffirming the safety of these formulations. Hydrogels developed from the nanoemulsions exhibited pseudoplastic behavior and thixotropy according to rheological studies, making them suitable for topical application. Among the hydrogels, the one composed of carboxymethylcellulose (CMC) was selected for repellent tests due to its favorable sensory characteristics and bioadhesive properties. The hydrogels demonstrated controlled release and low permeation of cymene and myrcene, showing significant repellent activity against adult mosquitoes. In spatial repellency experiments, the free active agents yielded contrasting responses; cymene exhibited attractive activity, whereas myrcene demonstrated repellent activity. Conversely, hydrogels containing these same active agents displayed promising potential as repellents, with evidence of molecular anchoring in an odorant receptor, a traditional target for repellent activity. These findings indicate that the formulations developed in this study have notable potential for the effective control of *Ae. aegypti* L., contributing to the prevention of mosquito-borne diseases. The successful application of nanotechnology in formulating nanoemulsions and hydrogels not only improved the efficacy of these formulations but also their safety and acceptability. In combination, this study represents a promising approach for the development of more effective and safer strategies in combating mosquito-borne diseases, with significant applications in global public health.

Keywords: monoterpenes; cymene; myrcene; hydrogel; molecular docking.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Aedes (Stegomyia) aegypti L. e arboviroses.....	4
2.2 ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE DO Aedes aegypti.....	6
2.3 NANOEMULSÕES	10
2.3.1. Óleos essenciais e monoterpenos associados a nanoemulsões como agentes larvicidas contra o <i>Ae. aegypti</i>	11
2.3.2. Óleos essenciais e monoterpenos associados a nanoformulações como agentes repelentes contra o <i>Ae. aegypti</i>	13
3. OBJETIVOS	15
3.1. GERAL	15
3.2. ESPECÍFICOS	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. OBTENÇÃO DOS MONOTERPENOS	16
4.2 METODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS TERPENOS POR CROMATOGRAFIA EM FASE LIQUIDA.....	16
4.2.1 Determinação do comprimento máximo de absorção por UV-vis	16
4.2.2 Condições cromatográficas.....	16
4.2.3 Adequabilidade	16
4.2.4 Validação do método	16
4.2.5 Linearidade.....	16
4.2.6 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ).....	17
4.2.7 Precisão	17
4.2.8 Acurácia.....	17
4.2.9 Seletividade.....	18
4.2.10 Robustez.....	18
4.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES	18
4.3.1 Determinação do Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico requerido (EHLr) dos terpenos	18
4.4 CARACTERIZACAO DAS NANOEMULSÕES	18
4.4.1 Aspecto visual	18
4.4.2 Diâmetro hidrodinâmico médio, IPD e potencial zeta	19
4.4.3 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)	19
4.4.4 Microscopia eletrônica de transmissão criogênica (Cryo-TEM)	19
4.4.5 Determinação do teor de monoterpenos nas nanoemulsões.....	19
4.4.6 Liberação <i>in vitro</i> das nanoemulsões contendo os terpenos.....	20
4.5 ATIVIDADE LARVICIDA DAS NANOEMULSÕES	20
4.5.1 Cepas utilizadas.....	20
4.5.2 Atividade larvicida e avaliação da resistência cruzada	20
4.5.3 Interações de monoterpenos	21
4.5.4 Atividade larvicida residual das nanoemulsões.....	21
4.5.5 Análise histológica das larvas.....	21
4.6 DOCKING MOLECULAR DOS ATIVOS EM POSSIVEIS ALVOS LARVICIDAS	22
4.6.1 Docking molecular entre as moléculas e a acetilcolinesterase de <i>Drosophila melanogaster</i>	22
4.6.2 Predição de Atividade	23

4.7	AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DAS NANOEMULSÕES.....	23
4.7.1	Citotoxicidade em queratinócitos humanos (HaCAT) das nanoemulsões.....	23
4.7.2	Toxicidade aguda em zebrafish.....	24
4.7.3	Toxicidade aguda em <i>Galleria mellonella</i>	26
4.8	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS CONTENDO NETs	26
4.8.1	Reologia de fluxo.....	27
4.8.2	Reologia oscilatória.....	27
4.8.3	Análise de perfil de textura (TPA)	27
4.8.4	Determinação <i>in vitro</i> da bioadesão dos hidrogéis	28
4.8.5	Liberação <i>in vitro</i> do p-cimeno e do mirceno a partir dos hidrogéis.....	28
4.8.6	Permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i> do p-cimeno e do mirceno a partir dos hidrogéis29	
4.9	ATIVIDADE REPELENTE DOS MONOTERPENOS E HIDROGEL.....	29
4.10.1	Repelência espacial dos monoterpénos	29
4.10.2	Teste comportamental com o alimentador artificial	31
4.10.3	Docking molecular em possível alvo repelente	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1.	MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS TERPENOS.....	33
5.1.1	Adequabilidade do sistema.....	33
5.1.2	Linearidade.....	33
5.1.3	Sensibilidade	34
5.1.4	Precisão	35
5.1.6	Exatidão.....	35
5.1.7	Robustez.....	36
5.1.8	Seletividade.....	36
5.2	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NETS	37
5.2.1	Determinação do Equilíbrio Hidrófilo Lipofílico requerido (EHLr).....	37
5.2.2	Análise de rastreamento de nanopartículas.....	42
5.2.3	Criomicroscopia eletrônica de transmissão.....	43
5.2.4	Determinação do teor de monoterpénos nas NETs	44
5.2.5	Liberação <i>in vitro</i> das nanoemulsões.....	44
5.3	ATIVIDADE LARVICIDA DAS NANOEMULSÕES	46
5.3.1	Interações entre monoterpénos.....	49
5.3.2	Atividade larvicida residual	51
5.3.3	Análise histológica das larvas.....	52
5.4	AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DAS NANOEMULSÕES.....	53
5.4.1	Citotoxicidade das NETs em queratinócitos humanos	53
5.4.2	Toxicidade aguda em zebrafish.....	54
5.4.3	Toxicidade aguda das NEs contra as larvas de <i>Galleria mellonella</i>	56
5.5	DOCKING MOLECULAR PARA O ALVO LARVICIDA ACETILCOLINESTERASE	57
5.5.1	Predição de atividade	59
5.6	HIDROGÉIS CONTENDO AS NEs	60
5.6.1	Reologia de fluxo.....	61
5.6.2	Reologia oscilatória.....	64
5.6.3	Perfil de textura dos hidrogéis.....	66
5.6.4	Bioadesão <i>in vitro</i> dos hidrogéis.....	68
5.6.5	Ensaio de liberação <i>in vitro</i> dos hidrogéis	69
5.6.6	Permeação e retenção <i>in vitro</i>	71
5.7	ATIVIDADE REPELENTE.....	72
5.7.1	Ensaio de repelência espacial	72
5.7.2	Teste comportamental com o alimentador artificial.....	73
5.7.3	Docking molecular em possível alvo repelente	74

6	CONCLUSÕES.....	80
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do <i>Ae. (Stegomyia) aegypti</i> L.	4
Figura 2 - Desenho esquemático do sistema de peneiramento de <i>high-throughput screening (HITS)</i> usado no ensaio de repelência espacial.	29
Figura 3 - Representação esquemática do teste repelente com alimentador artificial. Created with BioRender.com.	31
Figura 4 - Cromatogramas obtidos para o teste de linearidade do p-p-cimeno (A) e mirceno (B) e curvas analíticas obtidas pela avaliação da linearidade de p-p-cimeno (C) e mirceno (D)	34
Figura 5 - Cromatograma de (a) nanoemulsão de p-p-cimeno e nanoemulsão de mirceno e (b) solução de tensoativos.	37
Figura 6 - Aspecto visual das formulações contendo p-cimeno na escala de EHL de 10 a 16,7.	38
Figura 7 - Aspecto visual das formulações contendo mirceno na escala de EHL de 10 a 16,7.	40
Figura 8 - Imagem de crio-TEM da A – Cim-NE e B – Mir-NE.	43
Figura 9 - Teor de monoterpeno (%) em nanoemulsões ao longo de 60 dias.	44
Figura 10 – Perfil de liberação <i>in vitro</i> de NETs (Cim-NE, Mir-NE) e terpenos livres (Cim-Sol e Mir-Sol).	45
Figura 11 - Gráficos concentração-resposta de terpenos contra Larvas de <i>Ae aegypti</i> : A – Cepa de Bora com Cim e Cim-NE; B – Cepa Bora com Mir e Mir-NE; C – Cepa da Guiana com Cim e Cim-Ne e D – Cepa da Guiana com Mir e Mir-NE.	47
Figura 12 - Curvas de efeito das concentrações da combinação de A - Mirceno:p-p-cimeno (1:1) e B -Mir-NE:Cim-NE (1:1) e Curvas de interação entre C - Mirceno:p-p-cimeno (1:1) e D -Mir-NE:Cim-NE (1:1)	50
Figura 13 - Atividade residual de Cim-NE e Mir-NE contra larvas suscetíveis de <i>Ae. Aegypti</i>	51
Figura 14 - Fotomicrografias das larvas expostas ao controle negativo, Cim-NE e Mir-NE com destaque para o tubo digestivo no centro, aumento de 10x	52
Figura 15 - Secção histológica de intestino (A e B), fígado (C e D) e rins (E e F) de zebrafish, mostrando as principais alterações histopatológicas registradas. Índice de alteração histopatológica (IAH) no intestino (G), fígado (H) e rins (I) de Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto, no teste de toxicidade aguda oral com Cim-NE (1750 e 2000 mg/kg) e Mir-NE (2000 mg/kg).	55
Figura 16 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de larvas de <i>G. mellonella</i> para os grupos analisados em diferentes concentrações. Legenda: (A): Cim, (B):Mir, (C):Cim-NE, (D): Mir-NE; CD: Controle de óbito (metanol 100%); SC: Controle de solventes (etanol 5%); C	56
Figura 17 - Docking molecular (Representações 2D e 3D) do alvo AChE (PDB ID: 1QON) e as moléculas selecionadas.	58
Figura 18 - Aspecto visual dos hidrogéis contendo as NEs. A – Hidrogel de carbopol (3% p/p), hidrogel com quitosana (3% p/p) e hidrogel com carboximetilcelulose (3%).	61
Figura 19 - Reologia de fluxo dos Hidrogéis contendo as NETs. A – Hidrogéis contendo a Cim-NE, B – Hidrogéis contendo a Mir-NE. Símbolos não preenchidos: ida, símbolos preenchidos: volta.	62
Figura 20 - Reologia oscilatória dos Hidrogéis contendo as NETs. A – Hidrogéis contendo a Cim-NE e B – Hidrogéis contendo a Mir-NE. Símbolos preenchidos – G' e símbolos não preenchidos – G''	65

Figura 21 – Perfil de liberação <i>in vitro</i> dos hidrogéis contendo as NETs.....	70
Figura 22 - Índice de repelência espacial de DEET e monoterpenos	73
Figura 23 – Porcentagem de mosquitos alimentados através do alimentador artificial.....	74
Figura 24 - Posição das melhores poses dos ligantes (p-cimeno, mirceno e DEET) e do ligante cristalográfico (ácido araquidônico), destacado em laranja, no sítio da proteína AeOBP22.	75
Figura 25 - Simulação do docking molecular do DEET, p-cimeno mirceno no alvo AeOBP22, nas dimensões 2D e 3D.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de adequação do sistema para p-p-cimeno e mirceno	33
Tabela 2 - Análise estatística da linearidade	34
Tabela 3 - Resultados de precisão para os diferentes níveis de mirceno e p-p-cimeno	35
Tabela 4 - Resultados de exatidão para as concentrações de mirceno e p-p-cimeno recuperadas da matriz de formulação.	35
Tabela 5 - Efeito das mudanças nas condições cromatográficas na quantificação de p-p-cimeno e mirceno na concentração de 35 µg/mL (n = 3)	36
Tabela 6 - Quantidade em porcentagem (%) e em massa dos constituintes das formulações preparadas com mirceno e p-cimeno.	37
Tabela 7 - Tamanhos de gotícula, Índice de polidispersidade e potencial zeta das melhores formulações contendo p-cimeno.....	39
Tabela 8 - Tamanhos de gotícula, Índice de polidispersidade e potencial zeta das melhores formulações contendo mirceno.....	41
Tabela 9 - Tamanho de partícula e concentração de partículas das NETs.....	43
Tabela 10 - Propriedades moleculares/físico-químicas <i>in silico</i> dos monoterpenos p-cimeno e mirceno	45
Tabela 11 - Modelos matemáticos para a cinética de liberação de NETs (Cim-NE, Mir-NE) e terpenos livres (Cim-Sol e Mir-Sol)	46
Tabela 12 - Atividade larvícida de monoterpenos livres e em nanoemulsões, contra <i>Ae. aegypti</i> L. (cepa Bora).	47
Tabela 13 - Atividade larvícida de monoterpenos, livres e em nanoemulsões contra <i>Aedes aegypti</i> resistente a inseticidas (cepa Guayana).	48
Tabela 14 - Concentrações inibitórias 50 (IC ₅₀) das NETs (Cim-NE, Mir-NE), terpenos livres (P-cimeno e Mirceno) e solução de tensoativos (Cim-Branco e Mir-Branco) em queratinócitos humanos.....	53
Tabela 15 - Efeito do tratamento oral com Ne-Cym e Ne-Myr e controle (água) sobre o comportamento e mortalidade de zebrafish.	54
Tabela 16 - Interações proteína-ligante identificadas usando o Discovery Visualizer para a melhor solução de docking de cada composto estudado na AChE	57
Tabela 17 – Valores de probabilidade de Pa.....	60
Tabela 18 - Índice de consistência (K) e Comportamento de fluxo (n) para os Hidrogéis contendo as NETs	63
Tabela 19 - Parâmetros mecânicos dos hidrogéis contendo as NETs	67
Tabela 20 - Propriedades bioadesivas dos hidrogéis contendo as NETs.	68
Tabela 21 - Perfil de permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i> dos monoterpenos livres, NETs e hidrogéis contendo as nanoemulsões após 8 horas de experimento	72
Tabela 22 - Interações e os tipos de interações realizadas entre os ligantes p-cimeno, mirceno, DEET e o alvo OBP22.	76

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Fórmula para o cálculo do limite de detecção (LOD)	17
Equação 2 – Fórmula para o cálculo do Limite de quantificação (LOQ)	17
Equação 3 - Fórmula para o cálculo do EHL.....	18
Equação 4 - Cálculo do Índice de alterações histológicas (IAH)	25
Equação 5 - Fórmula para o cálculo do comportamento de fluxo	27
Equação 6 - Cálculo do índice de atividade espacial.....	30

1. INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* é um vetor de doenças graves, como dengue, zika, chikungunya e febre amarela, representando um desafio significativo para a saúde pública em regiões tropicais e subtropicais. O controle eficaz desses mosquitos, tanto na forma larval quanto adulta, é crucial para prevenir a disseminação dessas doenças e reduzir seu impacto na saúde da população (ROIZ et al., 2018).

A distribuição do *Aedes* sp. tem aumentado recentemente devido às mudanças climáticas globais (KRAEMER et al., 2015) e pode ser mais prevalente em regiões temperadas, como a Europa, devido à presença de condições adequadas para o estabelecimento (CORBEL et al., 2019).

Os métodos convencionais de controle de mosquitos geralmente envolvem o uso de inseticidas químicos. No entanto, o uso excessivo e indiscriminado desses produtos químicos pode levar ao desenvolvimento de resistência nos mosquitos, além de ter efeitos adversos no meio ambiente e na saúde humana. Por exemplo, estudos têm demonstrado um aumento na resistência do *Ae. aegypti* a piretroides (AMELIA-YAP et al., 2018; MELO COSTA et al., 2020) e organofosfatos (BADOLO et al., 2019; CAMPOS et al., 2020; RODRÍGUEZ et al., 2001), devido à presença de modificações no sítio-alvo (por exemplo, mutações *kdr* para piretróides) e aumento da detoxificação por meio da superexpressão de genes de P450, GST e esterases (CATTEL et al., 2019, 2021; FAUCON et al., 2015).

A ocorrência de mosquitos *Ae. aegypti* "super" resistentes a inseticidas já foi relatada até mesmo no Sudeste Asiático devido à presença de três mutações *Kdr* diferentes nos mesmos indivíduos (KASAI et al., 2022). Esse aumento rápido e global da resistência dos mosquitos torna mais difícil controlar populações em campo com os pesticidas e pode potencialmente agravar o impacto das doenças transmitidas por artrópodes em todo o mundo. Além disso, produtos químicos podem ser tóxicos para organismos não alvo e o meio ambiente (ABE et al., 2014; VIEIRA SANTOS et al., 2017), e, como tal, estão enfrentando restrições regulatórias crescentes e aversões da população.

Nesse contexto, as nanoemulsões surgem como uma nova abordagem promissora para o controle de mosquitos. Elas consistem em sistemas coloidais compostos por uma fase aquosa e uma fase oleosa, estabilizadas por um agente

emulsificante. Essas formulações apresentam diversas vantagens, como tamanho de gotícula reduzido, maior área de superfície, estabilidade física e capacidade de incorporar diferentes compostos ativos (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; SINGH et al., 2017).

O p-cimeno e o mirceno são compostos encontrados em óleos essenciais de plantas, que têm sido amplamente estudados por suas propriedades larvicidas e repelentes contra mosquitos. O p-cimeno é um monoterpene presente em várias plantas, como o tomilho e a erva-doce, enquanto o mirceno é um terpeno encontrado em plantas como a erva-cidreira e a manga. Esses compostos têm mostrado atividade inseticida contra várias espécies de mosquitos, incluindo o *Aedes aegypti* (BALAHBIB et al., 2021; MARCHESE et al., 2017; SURENDRAN et al., 2021; XANTHIS et al., 2021).

No entanto, a baixa solubilidade desses compostos em água e sua rápida degradação limitam sua aplicação direta como larvicidas e repelentes. Portanto, a formulação desses compostos em nanoemulsões pode aumentar sua estabilidade, solubilidade e eficácia como agentes de controle de mosquitos.

As nanoemulsões contendo p-cimeno ou mirceno podem representar uma alternativa promissora aos inseticidas químicos convencionais, ajudando a reduzir a propagação de doenças transmitidas por mosquitos e melhorar a qualidade de vida das comunidades afetadas.

A necessidade urgente de desenvolver estratégias de controle de mosquitos mais seguras, eficazes e ambientalmente sustentáveis é de extrema importância para a saúde pública. A utilização de nanoemulsões contendo p-cimeno ou mirceno como larvicidas e repelentes pode oferecer uma abordagem inovadora e sustentável para combater a propagação de doenças transmitidas por mosquitos, contribuindo para a melhoria das condições de vida das comunidades afetadas.

Diante do exposto esta tese teve como objetivo principal desenvolver e otimizar nanoemulsões à base de terpenos (NETs) contendo p-p-cimeno e mirceno e avaliar sua eficácia larvicida contra mosquitos *Ae. aegypti* suscetíveis e altamente resistentes a inseticidas. O estudo também investigou mecanismos de resistência cruzada com inseticidas convencionais que possa afetar a eficácia das NETs e a avaliação a toxicidade aguda dessas nanoemulsões em organismos não alvo, especificamente zebrafish e *Galleria mellonella*. Em uma segunda etapa hidrogéis contendo as

nanoemulsões foram desenvolvidos e caracterizados e sua atividade repelente foi avaliada.

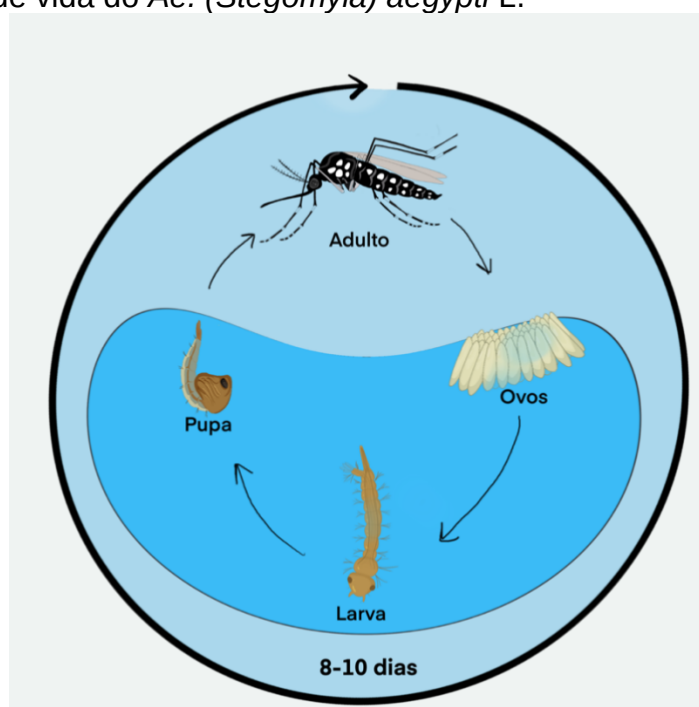
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. e arboviroses

É uma espécie originária do velho mundo, hoje distribuída globalmente. Trata-se de uma espécie cosmopolita, sendo encontrada principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Acredita-se que ele foi introduzido no Brasil por via marítima ainda na época do Brasil colônia por meio do tráfico de escravos vindos da África (CONSOLI; OLIVEIRA, 1998).

Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) é um Arthropoda, pertence a classe Insecta, ordem Diptera, família Culicidae e gênero *Aedes*. Possui um ciclo de vida rápido (Figura 1), durando de 8 a 10 dias. Após a cópula entre os mosquitos adultos macho e fêmea, esta precisa fazer um repasto sanguíneo para que haja a oviposição. Dos ovos eclodirão larvas, que passarão por quatro estádios larvais também chamado de instar, dando origem a pupa. A partir da pupa emergirão os mosquitos adultos (CHRISTOPHERS, 1960).

Figura 1 - Ciclo de vida do *Ae. (Stegomyia) aegypti* L.



Fonte: autoria própria

O *Ae. aegypti* L. é considerado um inseto de importância médica por ser o vetor de diversas doenças com grande impacto na saúde pública como a febre amarela urbana, a dengue, a chikungunya e a Zika (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). O impacto que essas doenças causam na sociedade é de grande dimensão,

pois não se limita somente ao tratamento das pessoas afetadas, mas também ao controle e a prevenção destas, além de outros aspectos como afastamento do trabalho e óbito (ROMERO, 2014). Desta forma, é de fundamental importância que o estado, bem como a sociedade civil, se atente ao fato de que o combate ao mosquito requer atenção de ambos.

As arboviroses constituem um grupo de doenças causadas por vírus transmitidos por artrópodes e que ainda causam preocupação principalmente em função dos danos causados à população. Mais de 50% da população mundial vive em risco diário de infecção e estima-se que mais de 95 milhões de pessoas por ano buscam atendimento médico após a infecção (THOMAS; YOON, 2019). O Brasil ainda possui altas taxas de transmissão dessas doenças e de acordo com o plano de contingência para as arboviroses no estado de São Paulo, estas tem causado preocupação por parte do poder público em função do dano causado à população, especialmente no que se refere à ocorrência frequente de epidemias, bem como de casos graves e óbitos (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2023).

A dengue é causada por um vírus da família *Flaviviridae*, possuindo 4 sorotipos diferentes: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (BÄCK; LUNDKVIST, 2013)(BÄCK; LUNDKVIST, 2013). Causa grande impacto social e econômico, tendo 1.450.270 casos prováveis de dengue e 18.145 casos de dengue confirmados no Brasil entre janeiro de 2022 e novembro de 2022, de acordo com o último boletim epidemiológico do Ministério da Saúde (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE | MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

A chikungunya é causada pelo vírus CHIKV, pertencente a família *Togaviridae*, possuindo quatro linhagens: oeste africano, leste-centro-Sul africano (ECSA), asiático e oceano Índico (IOL) (AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2015; SCHWARTZ; ALBERT, 2010). A partir da introdução do vírus nas Américas no ano de 2014 foram notificados 174.517 casos prováveis e 94 óbitos foram confirmados no ano de 2022. Além de possuir alta taxa de cronificação, a febre chikungunya pode apresentar formas atípicas, dificultando o diagnóstico e levando ao aumento do número de óbitos (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE | MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

A zika é causada pelo vírus ZIKV, da família *Alphaviridae*, que reemergiu no ano de 2014 como problema de saúde pública mundial (MUSSO; CAO-LORMEAU;

GUBLER, 2015). As duas linhagens deste vírus já identificadas no Brasil são a asiática e a africana. No ano de 2022 foram notificados 9.204 casos prováveis da doença, e apesar de se observar uma diminuição no número de casos, é importante ressaltar que a transmissão do vírus Zika é preocupante, principalmente em mulheres grávidas, devido às manifestações clínicas decorrentes da infecção como microcefalia e outras malformações congênitas, além de manifestações neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE | MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

De acordo com a vigilância epidemiológica do estado de São Paulo, no ano de 2022 foram notificados 653.693 casos de dengue, 5.155 casos de chikungunya e 3,698 casos de Zika (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE | MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023). Essas doenças possuem altas taxas de infecção que se mantêm constantes, podendo causar impactos tanto no âmbito social quanto no âmbito econômico do estado.

Deve-se ainda considerar o fato de que não há medicamentos para o tratamento específico dessas enfermidades, sendo o seu manejo feito somente através do tratamento dos sintomas (MARTINS; PRATA-BARBOSA; CUNHA, 2019). Significativos esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de terapias e recentemente houve a aprovação de uma vacina para prevenção da dengue; no entanto, seu uso é limitado a pessoas que já tiveram contato com o vírus por conta do risco de desenvolvimento de dengue severa, se administrada em pessoas soronegativas para a dengue (GUBLER; HALSTEAD, 2019). Desse modo, o controle do vetor ainda se configura como a principal estratégia de combate dessas doenças.

2.2 ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE DO *Aedes aegypti*

A principal estratégia de manejo dessas arboviroses é através do combate ao vetor, ou seja, do combate ao *Ae. aegypti*. Pode-se utilizar três principais estratégias de combate: mecânica, biológica e química (ZARA et al., 2016). O controle mecânico do *Ae. aegypti* é uma técnica que envolve a eliminação física dos criadouros do mosquito, como recipientes de água parada, pneus velhos e outros objetos que possam acumular água (ZHANG; GEORGESCU; HASSAN, 2016). Essa técnica é considerada uma das mais eficazes e sustentáveis para o controle do mosquito, já

que não utiliza produtos químicos e ajuda a reduzir a pressão seletiva que leva ao desenvolvimento de resistência aos inseticidas (MACIEL-DE-FREITAS et al., 2014).

Entre os benefícios do controle mecânico do *Aedes aegypti*, destacam-se a simplicidade e baixo custo da técnica, que pode ser realizada por qualquer pessoa, desde que tenha conhecimento sobre os criadouros do mosquito e os riscos à saúde que ele representa. Além disso, o controle mecânico tem um impacto positivo no meio ambiente, já que não utiliza produtos químicos que podem poluir o solo e a água (ROMERO-VIVAS; WHEELER; FALCONAR, 2002).

No entanto, o controle mecânico também apresenta algumas limitações. Uma delas é a necessidade de uma ação coordenada e constante para ser eficaz. Como o mosquito pode se reproduzir em pequenas quantidades de água, a eliminação dos criadouros deve ser realizada regularmente, o que pode exigir um esforço contínuo da população e das autoridades responsáveis pelo controle do mosquito (ARUNACHALAM et al., 2013). Outra limitação do controle mecânico é que ele não é eficaz para eliminar mosquitos adultos, que podem voar de áreas próximas e infestar uma região mesmo que não haja criadouros naquele local específico. Por essa razão, o controle mecânico deve ser combinado com outras técnicas de controle do mosquito, como o uso de inseticidas e a educação da população sobre os riscos da infestação do *Aedes aegypti*.

O controle biológico do *Ae. aegypti* é uma técnica que utiliza organismos vivos, como bactérias e mosquitos estéreis, para controlar a população do mosquito e reduzir a transmissão de doenças. Essa técnica é considerada uma das mais sustentáveis e seguras para o controle do mosquito, pois não utiliza produtos químicos e tem um impacto mínimo no meio ambiente (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2017).

O *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) é uma bactéria que produz uma proteína tóxica para as larvas do *Ae. aegypti*, mas inofensiva para outros organismos. O Bti é comercializado em forma de briquetes, que são colocados em recipientes com água parada para controlar a população de larvas do mosquito (VALTIERRA-DE-LUIS et al., 2020).

A *Wolbachia* é uma bactéria presente naturalmente em alguns insetos, incluindo o *Ae. aegypti*. No entanto, quando a *Wolbachia* é introduzida em populações de mosquitos que não possuem a bactéria, ela pode reduzir a capacidade de

transmissão de doenças pelo mosquito. Isso ocorre porque ela interfere no desenvolvimento do vírus dentro do mosquito, reduzindo a carga viral e a transmissão para humanos (ITURBE-ORMAETXE; WALKER; O'NEILL, 2011).

A técnica de insetos estéreis (SIT) se baseia na supressão gênica e consiste na produção em massa de mosquitos machos estéreis em laboratório, que são liberados em áreas onde a população de *Ae. aegypti* é alta. Os machos estéreis competem com os mosquitos selvagens para acasalar com as fêmeas, reduzindo a taxa de reprodução e consequentemente a população do mosquito (BOURTZIS; VREYSEN, 2021).

Peixes larvófagos são peixes que se alimentam de larvas do *Aedes aegypti*, como as espécies *Poecilia reticulata* e *Xiphophorus maculatus*. A técnica consiste na introdução desses peixes em recipientes com água parada, onde as larvas do mosquito se desenvolvem. Os peixes se alimentam das larvas, reduzindo a população do mosquito (PEREIRA et al., 2016).

Em suma, o controle biológico do *Aedes aegypti* apresenta uma série de benefícios, como segurança, eficácia e sustentabilidade. No entanto, é importante considerar as limitações da técnica e combiná-la com outras técnicas de controle do mosquito para garantir a eficácia e minimizar os riscos à saúde e ao meio ambiente (BENELLI; JEFFRIES; WALKER, 2016).

O controle químico do *Ae. aegypti* é uma abordagem que utiliza inseticidas para matar ou repelir os mosquitos adultos ou larvas, reduzindo assim a população do mosquito e a transmissão de doenças como a dengue, chikungunya, Zika e febre amarela. Essa técnica é amplamente utilizada em todo o mundo, especialmente em áreas onde ocorrem surtos de doenças transmitidas por mosquitos.

Os principais inseticidas utilizados no controle do *Ae. aegypti* podem ser divididos de acordo com seu mecanismo de ação. Os inseticidas que atuam como inibidores da colinesterase, como os organofosforados e carbamatos, bloqueiam a enzima colinesterase, que é responsável pela quebra do neurotransmissor acetilcolina. Com a inibição da colinesterase, ocorre uma acumulação de acetilcolina nos receptores nervosos, desencadeando paralisia, o que pode levar à morte do mosquito (BRAGA; VALLE, 2007).

Os piretroides são um grupo de inseticidas sintéticos que atuam como moduladores dos canais de sódio voltagem dependentes nas células nervosas do

mosquito. Isso resulta em uma hiperexcitabilidade das células nervosas, levando à paralisia e morte do mosquito (HOŁYŃSKA-IWAN; SZEWCZYK-GOLEC, 2020).

Os inseticidas que inibem a síntese da quitina, um polissacarídeo presente no exoesqueleto dos insetos, como o diflubenzurom e o noviflumuron, impedem a formação do exoesqueleto do mosquito, causando sua morte. Os inseticidas que inibem a ATPase, uma enzima que atua no transporte de íons através das membranas celulares, como o temephos e o malation, causam a morte do mosquito por inibição da atividade celular. Os inseticidas que inibem a síntese de ácido nucléico, como o piriproxifeno e o diflubenzurom, impedem a formação de DNA e RNA no mosquito, causando sua morte.

Entre os benefícios do controle químico do *Aedes aegypti*, destacam-se a rapidez e eficácia da técnica, que pode ser utilizada para controlar uma infestação de mosquitos em um curto espaço de tempo. Além disso, os inseticidas disponíveis para o controle do mosquito são relativamente seguros para humanos e animais de estimação, desde que utilizados corretamente e em doses adequadas.

No entanto, o controle químico também apresenta algumas limitações. Uma delas é a possibilidade de desenvolvimento de resistência do mosquito aos inseticidas, o que pode tornar a técnica ineficaz em longo prazo (BRAGA; VALLE, 2007; WHO, 2012, 2016). Além disso, os inseticidas utilizados para o controle do *Aedes aegypti* podem afetar outros organismos não-alvo, como as abelhas e borboletas, e causar desequilíbrios no ecossistema local.

Outra limitação do controle químico é a necessidade de pessoal treinado e equipamentos adequados para aplicar os inseticidas de forma segura e eficaz. Além disso, a utilização excessiva de inseticidas pode levar à acumulação de resíduos químicos no meio ambiente e na água, causando danos à saúde humana e ao meio ambiente.

Por essa razão, o controle químico deve ser utilizado com cuidado e combinado com outras técnicas de controle do *Aedes aegypti*, como o controle mecânico, educação da população e monitoramento da resistência do mosquito aos inseticidas. Dessa forma, é possível garantir a eficácia do controle do mosquito e minimizar os riscos à saúde e ao meio ambiente.

Nesse contexto, abordagens ecológicas têm surgido como alternativas promissoras (SUGUMAR et al., 2014) e nanoemulsões contendo óleos essenciais e

seus constituintes majoritários, como monoterpenos e sesquiterpenos, têm sido apontadas como valiosas ferramentas no controle de insetos transmissores de doenças (DUARTE et al., 2015a; OLIVEIRA et al., 2017a; RAWANI; GHOSH; CHANDRA, 2013).

Apesar de apresentarem um grande potencial biológico os óleos essenciais e as substâncias que os compõem possuem diversas características intrínsecas que dificultam o seu uso. Eles são substâncias que podem ser facilmente degradados por fatores externos como temperatura e luz (TUREK; STINTZING, 2013). Além disso por apresentarem alta volatilidade e baixa solubilidade em água seu uso pode ser limitado e essas características podem diminuir sua biodisponibilidade e conseqüentemente sua bioatividade (BARRADAS; DE HOLANDA E SILVA, 2020; GONZALEZ-COLOMA et al., 2010).

Dessa forma o desenvolvimento de sistemas que retardem a volatilidade desses ativos e melhorem sua dispersão em ambientes aquosos é importante, permitindo a proteção destes ativos e contribuindo para a estabilidade dessas substâncias (DE OLIVEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2017a).

2.3 NANOEMULSÕES

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar e envolve a criação e utilização de diferentes sistemas em escala nanométrica, que por conta do seu tamanho diminuto, possuem algumas características únicas como alta área superficial, alta capacidade de penetração dentre outras (DE VILLIERS; ARAMWIT; KWON, 2009). Diversos sistemas nanométricos têm sido utilizados como carreadores de ativos melhorando características, controlando a liberação e entregando especificamente os ativos nos sítios de ação (CHAMUNDEESWARI; JESLIN; VERMA, 2019). Dentre esses sistemas as nanoemulsões tem chamado atenção como sistemas de entrega de ativos (SINGH et al., 2017)

São sistemas constituídos de dois líquidos imiscíveis e um ou mais estabilizantes, geralmente agentes tensoativos, que permitem a obtenção de pequenas gotículas, e têm sido cada vez mais aplicados nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética para encapsular, proteger e liberar componentes bioativos lipofílicos, como os óleos essenciais (MCCLEMENTS, 2012).

Elas são caracterizadas por possuírem tamanho de gotículas na faixa de tamanho entre 20-200 nm (OSTERTAG; WEISS; MCCLEMENTS, 2012), possuem uma ampla variedade de aplicações industriais (IZQUIERDO et al., 2005; TADROS et al., 2004), como adjuvantes em alimentos, medicamentos e produtos agrícolas.

Devido à característica lipofílica dos terpenos e sua alta volatilidade, as nanoemulsões são sistemas promissores para a incorporação destes ativos, pois além de protegê-los, elas podem melhorar sua absorção, melhorando assim sua bioatividade (CHANG; MCLANDSBOROUGH; MCCLEMENTS, 2013; HILBIG et al., 2016).

De forma geral as NE podem ser obtidas através de duas grandes abordagens: os métodos de alta energia e os métodos de baixa energia. Os métodos de alta energia são caracterizados pelo uso de equipamentos como sonicadores, homogeneizadores de alta velocidade, homogeneizadores de alta pressão dentre outros, que fornecem energia para o sistema e através disso há o cisalhamento do material *bulk* gerando material disperso em escala nanométrica (KUMAR et al., 2019).

Os métodos de baixa energia são caracterizados pelo uso da energia química do sistema e o controle desta na formação das gotículas em escala nanométrica. Outro ponto crucial é que esses sistemas podem ser obtidos com baixo custo através das técnicas de baixo aporte de energia (SOLANS; SOLÉ, 2012; TADROS et al., 2004). Comparado aos métodos de alta energia, os métodos de baixa energia possuem diversas vantagens como: baixo custo de produção, métodos mais facilmente executáveis e mais sustentáveis (WALIA et al., 2022).

Nos métodos de inversão de fases, para que haja a formação da nanoemulsão, inicialmente há a formação por aquecimento de uma NE água em óleo, que quando resfriada irá formar NE do tipo óleo em água por conta da mudança da curvatura do tensoativo, com gotículas menores que aquelas da primeira NE (SOLANS; SOLÉ, 2012).

2.3.1. Óleos essenciais e monoterpenos associados a nanoemulsões como agentes larvicidas contra o *Ae. aegypti*

Nanoemulsões contendo óleos essenciais ou terpenos isolados têm mostrado potencial para o controle do *Ae. aegypti* (DUARTE et al., 2020a, 2021). Nanoemulsões contendo o óleo essencial de *Bacharis reticularia* DC. e seu constituinte majoritário, o D-limoneno, apresentaram potencial larvicida contra larvas no terceiro instar. A

nanoemulsão contendo D-limoneno demonstrou a maior taxa de mortalidade e um valor de CL₅₀ mais baixo em comparação com a nanoemulsão à base de óleo essencial. Fotomicrografias mostraram diferenças na aparência e nas características do corpo das larvas tratadas com a nanoemulsão contendo D-limoneno em comparação com as larvas do grupo de controle (BOTAS et al., 2017).

Nanoemulsões contendo o óleo essencial de *Vitex negundo* foram testadas por sua atividade larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* nos instares dois e três. Observou-se uma mortalidade considerável após 12 e 24 horas de tratamento, com a maior mortalidade registrada a uma concentração de 400 ppm para o óleo essencial (73,33% após 12 horas e 90,30% após 24 horas) e para a nanoemulsão (81,00% após 12 horas e 94,33% após 24 horas) contra larvas de segundo estágio. Da mesma forma, foram observadas taxas significativas de mortalidade para larvas de terceiro estágio a 400 ppm tanto para o óleo essencial (70,33% após 12 horas e 80,66% após 24 horas) quanto para a nanoemulsão (79,00% após 12 horas e 93,00% após 24 horas). Os valores de CL₅₀ e CL₉₀ foram calculados para a atividade larvicida do óleo essencial e da nanoemulsão após 12 e 24 horas de exposição, demonstrando sua eficácia contra as larvas de *Ae. aegypti* (BALASUBRAMANI et al., 2017).

Uma nanoemulsão contendo o óleo essencial derivado da resina de *Protium heptaphyllum* foi desenvolvida e avaliada frente larvas no terceiro instar de *Ae. aegypti*. A nanoemulsão apresentou um tamanho de aproximadamente 100 nm. A mortalidade induzida pela nanoemulsão foi dependente do tempo, com uma CL₅₀ em 48 horas aproximadamente 17 vezes menor do que em 24 horas de exposição, indicando um efeito cumulativo do óleo essencial (FAUSTINO et al., 2020).

Um estudo avaliou o óleo essencial de *Origanum vulgare*, sua nanoemulsão e seus monoterpenos majoritários contra o terceiro instar de *Ae. aegypti*. A nanoemulsão apresentou tamanho de gotícula de $64,1 \pm 6,3$ nm. Foi observado que a nanoemulsão, o óleo essencial e os monoterpenos carvacrol, timol, γ -terpineno e p-cimeno apresentaram valores de CL₅₀ após 24 horas de exposição contra as larvas de 13,9, 29,2, 31,9, 45,3, 50,4 e 75,7 $\mu\text{g/ml}$ sendo a nanoemulsão a mais eficaz, seguida pelo óleo essencial e pelos monoterpenos individuais (ALMADIY; NENAAH, 2022a).

Um estudo avaliou uma nanoemulsão contendo o óleo essencial de *Trachyspermum ammi* e do seu constituinte majoritário timol, um monoterpeno. Com

tamanho de gotícula de 60 e 180 nm, respectivamente, ambas apresentaram um incremento da toxicidade aguda contra larvas no terceiro instar de *Ae. aegypti* quando comparadas com os óleos livres. A exposição das larvas às formulações levou a alterações na cutícula. As NEs também demonstraram inibição da acetilcolinesterase, enzima que hidrolisa a acetilcolina (ACh). A Inibição da AChE causa paralisia em insetos, o que leva à morte, sendo um mecanismo de ação conhecido (SUBAHARAN et al., 2022)

2.3.2 Óleos essenciais e monoterpenos associados a nanoformulações como agentes repelentes contra o *Ae. aegypti*

Há três razões principais para o uso de repelentes de insetos: 1) o surgimento de novas e importadas doenças infecciosas transmitidas por artrópodes, representando uma nova ameaça à saúde humana; 2) o aumento de novos vetores competentes para doenças infecciosas; e 3) a limitada eficácia das vacinas em prevenir principalmente a transmissão da maioria das arboviroses (DIAZ, 2016).

Os repelentes são formulados para afastar os mosquitos, criando uma barreira que diminui a probabilidade de picadas. Essa medida é especialmente importante em áreas onde os mosquitos são endêmicos e as doenças transmitidas por eles representam uma ameaça significativa à saúde pública. Ao aplicar repelentes adequadamente sobre a pele exposta, as pessoas podem reduzir substancialmente o risco de serem picadas, interrompendo assim o ciclo de transmissão dessas doenças e contribuindo para a proteção individual e coletiva (STANCZYK et al., 2015).

O DEET ou N,N-Dietil-m-toluamida é o principal repelente utilizado atualmente devido às suas propriedades químicas que resultam em uma eficácia notável na prevenção de picadas de mosquitos. Estudos apontam que o DEET atua modulando receptores de odor encontrados nas antenas dos mosquitos (bem como em outros insetos hematófagos), os quais são responsáveis por detectar o ácido L-lático e o dióxido de carbono, os principais atrativos emitidos por seres humanos e outros animais (DICKENS; BOHBOT, 2013).

Também há evidências de que o DEET, muito provavelmente detectado pelo sistema gustativo, resulta em uma diminuição na oviposição. Dado que os mecanismos específicos não são conhecidos, neste contexto o DEET atua como um agente repelente por contato (LEAL, 2014).

Repelentes botânicos representam uma alternativa crescente e popular na proteção contra insetos. Esses repelentes são derivados de extratos de plantas, como óleos essenciais de eucalipto, citronela, lavanda e outros compostos naturais (MÜLLER et al., 2009). O apelo dos repelentes botânicos reside na sua origem natural e na percepção de serem menos agressivos à pele e ao meio ambiente em comparação com os repelentes químicos tradicionais. Embora geralmente ofereçam proteção por períodos mais curtos, os repelentes botânicos ganham destaque como opções mais sustentáveis e seguras, ganhando cada vez mais adeptos em busca de alternativas aos produtos convencionais.

A utilização de monoterpenos como repelentes representa um campo de grande relevância no âmbito da proteção contra insetos. Os monoterpenos são uma classe de compostos orgânicos presentes em diversos óleos essenciais, caracterizados por sua estrutura molecular cíclica ou acíclica (DA SILVA; RICCI-JÚNIOR, 2020). Esses compostos têm despertado considerável interesse devido às suas propriedades repelentes eficazes, atuando como uma barreira natural contra insetos indesejados. Um exemplo notável é o grupo das piretrinas inseticidas, extraídas de flores secas do gênero *Chrysanthemum*, que são amplamente estudadas e aplicadas na indústria de repelentes (DEBBOUN; FRANCES; STTRICKMAN, 2007).

Nos últimos anos, repelentes botânicos associados a nanosistemas têm exibido resultados encorajadores no controle de insetos. Ao utilizar nanosistemas para direcionar os ingredientes ativos de extratos de plantas diretamente ao local de ação, os repelentes podem se tornar altamente eficazes e seletivos. Além disso, é possível desenvolver nanopartículas de modo a melhorar a estabilidade e a disponibilidade biológica dos repelentes botânicos, tornando-os mais eficazes no controle de insetos. (DUBEY; MOSTAFAVI, 2023).

Assim, a pesquisa de agentes de controle para o mosquito vetor dessas doenças constitui tema de grande importância com impacto tanto científico quanto social. Dessa forma, propõe-se neste projeto o desenvolvimento de um sistema nanoemulsionado contendo ativos de origem natural que poderá ser usado tanto na eliminação das larvas do mosquito quanto como ativo repelente contra o mosquito adulto. Por fim, acredita-se que esta pesquisa trará profundos benefícios na formação do candidato e possui potencial do ponto de vista científico, podendo gerar produtos com alto impacto na sociedade.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Obter e caracterizar nanoemulsões contendo os terpenos p-cimeno e mirceno e avaliar sua toxicidade e atividade larvícida e repelente contra o *Ae. aegypti*.

3.2. ESPECÍFICOS

- Validar método analítico para quantificação dos terpenos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Determinar o Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) requerido dos monoterpenos;
- Caracterizar as NETs obtidas quanto: aspecto visual, tamanho de gotícula, Índice de polidispersividade, distribuição do tamanho, densidade do número de gotículas e potencial zeta; análise de rastreamento de partícula (NTA); microscopia eletrônica criogênica de transmissão e liberação *in vitro*;
- Caracterizar a eficácia intrínseca das nanoemulsões contra o *Aedes aegypti*;
- Avaliar a potencial resistência cruzada testando as nanoemulsões contendo terpenos em cepas resistentes e estabelecer taxa de resistência (TR₅₀/TR₉₅);
- Avaliar a toxicidade aguda das nanoemulsões em organismo não alvo (Zebra fish e Galleria);
- Realizar docking molecular dos monoterpenos frente a acetilcolinesterase;
- Avaliar a repelência espacial dos monoterpenos;
- Obter hidrogéis contendo as nanoemulsões;
- Caracterizar os hidrogéis contendo as NETs quanto: reologia, perfil de textura, bioadesão, liberação, permeação e retenção *in vitro*;
- Avaliar a atividade repelente dos hidrogéis usando um sistema de alimentação por membrana sanguínea;
- Realizar o docking molecular dos monoterpenos frente a um possível alvo repelente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DOS MONOTERPENOS

Os terpenos *p*-cimeno e mirceno foram obtidos comercialmente da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

4.2 METODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS TERPENOS POR CROMATOGRAFIA EM FASE LIQUIDA

4.2.1 Determinação do comprimento máximo de absorção por UV-vis

O espectro de absorção no UV-Visível para o *p*-*p*-cimeno e o mirceno foi feito para determinação do comprimento máximo de absorção. O espectro de absorção foi determinando usando uma solução dos monoterpênos (100 µg.mL⁻¹) em acetonitrila no intervalo de 200-800 nm em um espectrofotômetro Cary 60 UV-Vis (Agilent).

4.2.2 Condições cromatográficas

Utilizou-se o sistema Agilent 1200 HPLC constituído por um detector de matriz de diodos (DAD) (ajustado a 240 nm). A coluna analítica empregada foi uma RP-18 (Phenomenex® Synergi™ Fusion-RP, 150 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 4 µm). A fase móvel consistiu em acetonitrila:água (60:40, v/v) e o volume de injeção foi de 10 µL. Todas as separações foram realizadas isocraticamente a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min⁻¹ e um tempo de corrida de 18 min.

4.2.3 Adequabilidade

O teste de adequação do sistema foi realizado para avaliar a resolução e reprodutibilidade do sistema para a análise a ser realizada, utilizando-se sete injeções de repetições de uma solução de referência contendo 50 µg.mL⁻¹ dos monoterpênos. Os parâmetros medidos foram área de pico, tempo de retenção, número de pratos teóricos, fator de capacidade, fator de cauda e simetria de pico.

4.2.4 Validação do método

O método foi validado de acordo com o ICH (Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) – Q2 (R1) e o FDA – Guidance for Bioanalytical Method. Os parâmetros determinados foram: especificidade, linearidade, precisão, acurácia, LOD, LOQ e robustez (ICH, 2005)

4.2.5 Linearidade

A linearidade foi avaliada por meio da elaboração de três curvas analíticas independentes, cada uma com oito concentrações dos monoterpenos, na faixa de 2,5-100 µg.mL⁻¹. A linearidade foi avaliada por meio da análise visual da resposta em função da concentração do analito, estatística de regressão (coeficientes de correlação e determinação), equação reta obtida pelo método dos mínimos quadrados ordinários e avaliação da significância dos coeficientes angulares e lineares. O estudo estatístico foi utilizado por meio da análise de ANOVA one-way com $\alpha=95\%$.

4.2.6 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)

O LOD e o LOQ foram determinados utilizando-se os valores médios de três curvas analíticas independentes com base no desvio padrão da resposta e na inclinação da curva obtida pelo modelo de regressão linear, de acordo com as Equações (1) e (2).

Equação 1 – Fórmula para o cálculo do limite de detecção (LOD)

$$LOD = 3.3 (\sigma/S)$$

Equação 2 – Fórmula para o cálculo do Limite de quantificação (LOQ)

$$LOQ = 10 (\sigma/S)$$

onde: σ é o desvio padrão da resposta e S é a inclinação da curva de calibração.

4.2.7 Precisão

A precisão do método foi determinada pela repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia). A repetibilidade foi medida de três soluções de terpenos (2,5, 25 e 100 µg.mL⁻¹) no mesmo dia, nas mesmas condições experimentais. A precisão intermediária do método foi avaliada por meio da realização da análise em dois dias diferentes (inter-dias). A precisão intra e interdiária foi expressa como desvio padrão relativo (DSR).

4.2.8 Acurácia

A acurácia foi feita comparando-se o resultado teórico com o resultado obtido a partir de três concentrações (2,5, 25 e 100 µg.mL⁻¹) de terpenos adicionados à matriz de formulação. O coeficiente de variação e a porcentagem de recuperação foram utilizados para avaliar a acurácia.

4.2.9 Seletividade

A seletividade foi avaliada para análise das respostas das nanoemulsões de p-cimeno e mirceno e cromatogramas de solução tensoativo, investigando a possível interferência dos componentes da matriz.

4.2.10 Robustez

A robustez foi avaliada através da variação independente de dois parâmetros: o comprimento de onda, que foi ajustado em 224 nm e 226 nm, e a razão de composição da fase móvel composta por acetonitrila e água, ajustada para duas relações, 70:30 e 55:45. Nesta investigação, a análise foi realizada na concentração de 50 µg/mL, e todas as amostras foram filtradas através de um filtro de membrana de PTFE 0,45 µm (Millipore) antes de serem injetadas em triplicata para análise.

4.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES

4.3.1 Determinação do Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico requerido (EHLr) dos terpenos

O EHLr do p-cimeno e mirceno foi determinado através da mistura de diferentes proporções de um tensoativo lipofílico (Monooleato de sorbitano, EHL 4.3) e um hidrofílico (Polissorbato 20, EHL 16,7) de acordo com a equação 3. Diferentes formulações foram preparadas na escala de EHL 10-16,7, sendo o EHLr aquele em que a formulação apresentar as melhores características de estabilidade.

Equação 3 - Fórmula para o cálculo do EHL

$$EHL = \frac{EHL_A \times \%A + EHL_B \times \%B}{100}$$

4.4 CARACTERIZACAO DAS NANOEMULSÕES

4.4.1 Aspecto visual

As formulações obtidas foram avaliadas visualmente após 24 horas, 7, 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.

4.4.2 Diâmetro hidrodinâmico médio, IPD e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersividade (IPD) das NETs foram avaliados utilizando método de dispersão de luz dinâmica (DLS) em aparelho Zetasizer 3000 HSA (Malvern Instruments), utilizando 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 eletroforética das gotículas dispersas submetidas a um campo elétrico. As análises foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer 3000 HSA.

4.4.3 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

O tamanho das gotículas e a concentração das NET foram avaliados pela técnica de NTA, utilizando o equipamento NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Reino Unido) equipado com uma câmara de amostra e um laser de 638nm. As amostras foram previamente diluídas (1:1000 v/v) em água ultrapura até um volume final de 1 mL. As concentrações ideais de medição foram encontradas pré-testando o valor ideal de gotícula por quadro (20–100 gotículas/quadro). As suspensões de NET foram injetadas na câmara de amostra com seringas estéreis até o líquido se estender até a ponta do injetor. As medidas foram realizadas em triplicata à temperatura ambiente (25 °C) e os dados foram representados na forma de tamanho média $\pm$ desvio padrão.

4.4.4 Microscopia eletrônica de transmissão criogênica (Cryo-TEM)

Para a preparação da microscopia eletrônica de transmissão criogênica (Cryo-TEM), as amostras foram montadas em uma tela de cobre com filme de carbono rendado (300 mesh). A aquisição foi realizada com o equipamento MET Talos Arctica G2.

4.4.5 Determinação do teor de monoterpenos nas nanoemulsões

As nanoemulsões foram manipuladas e armazenadas em frascos de vidro com tampa em temperatura ambiente durante 60 dias. Para análise do teor de terpenos no decorrer do tempo as nanoemulsões foram diluídas em etanol e sonicadas por 10

min para a ruptura das gotículas. Em seguida, as nanoemulsões diluídas foram filtradas através de um filtro de politetrafluoroetileno de 0,22 µm, e a quantificação foi realizada por HPLC, de acordo com o método analítico previamente validado. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média ± DP

4.4.6 Liberação *in vitro* das nanoemulsões contendo os terpenos

Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados garantindo a condição *sink*. Os ensaios foram conduzidos utilizando células de Franz modificadas, com área de difusão de 1,77 cm², em equipamento Microette (Hanson Research, Estados Unidos da América) e membrana de polietersulfona (Sigma-Aldrich). O compartimento receptor da célula de Franz modificada foi preenchido com 7,0 mL de tampão fosfato:etanol (50:50).

A solução receptora permaneceu sob constante agitação a 300 rpm e a temperatura foi mantida a 37 ± 2 °C por meio de um banho de aquecimento. A avaliação da quantidade de p-cimeno e mirceno liberados das nanoemulsões foi realizada após 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h. Os experimentos foram feitos em triplicata e a quantificação foi realizada por HPLC de acordo com o método por CLAE descrito anteriormente.

4.5 ATIVIDADE LARVICIDA DAS NANOEMULSÕES

4.5.1 Cepas utilizadas

Foram utilizadas duas cepas diferentes no estudo. A cepa susceptível foi uma cepa de referência (Bora) originada na Polinésia Francesa (MARCOMBE et al., 2009) e mantida por mais de 20 anos no *Institut de Recherche pour le développement* (Montpellier, França). A cepa Guyana foi coletada na Guiana Francesa (Ile Royale) e apresenta altos níveis de resistência aos piretroides (EPELBOIN et al., 2021) devido a presença das mutações V1016I e F1534C em alta frequência e expressões múltiplas do gene CYP450 (FAUCON et al., 2015). Essa cepa também é resistente aos organofosforados através da expressão de genes ligados as esterases.

4.5.2 Atividade larvicida e avaliação da resistência cruzada

Os ensaios larvicidas foram realizados de acordo com os protocolos estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). Larvas nos estágios III-IV foram expostas a diferentes

concentrações dos terpenos livres, às nanoemulsões e a solução de tensoativos e a mortalidade foi registrada após 24 horas. As larvas foram mantidas a 25 ± 2 °C, com umidade relativa de $75 \pm 5\%$ e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata, com 4 replicatas de 25 larvas ($n=100$) por concentração. O Temephos, um inseticida organofosforado, foi utilizado como controle positivo.

Os valores de CL_{50} e CL_{90} foram calculados a partir de uma linha de regressão log dose-probit mortality usando o software SPSS (IBM) para ambas as cepas. Razões de resistência (RR_{50}/RR_{95}) foram determinadas comparando as $CL_{50/95}$ obtidas para as cepas resistentes e susceptíveis. Evidências de resistência cruzada foram demonstradas se as razões de resistência ($RR_{50/95}$) exibissem limites de confiança excluindo o valor de 1.

4.5.3 Interações de monoterpenos

A existência de sinergismo entre o p-cimeno e o mirceno e suas nanoemulsões foi determinada pelo cálculo de um índice de combinação (IC) de acordo com o método de Chou e Talalay (1984) usando o software CalcuSyn (CHOU; TALALAY, 1983). Este método baseado em isobolograma é particularmente bem adaptado para analisar os efeitos de múltiplas drogas (DARRIET; CORBEL, 2006; TALLARIDA, 2002). O índice de combinação (IC) fornece uma medida quantitativa das interações (sinergismo, antagonismo e somatório) que ocorrem entre inseticidas. Um $IC = 1$, <1 e >1 indica um efeito aditivo, um efeito sinérgico e um efeito antagônico, respectivamente (DARRIET; CORBEL, 2006).

4.5.4 Atividade larvicide residual das nanoemulsões

Para a atividade larvicide residual foi preparada uma solução-estoque das nanoemulsões na concentração de 40 mg/L e armazenada em câmara climática com condições controladas (temperatura: 27°C e umidade relativa: 80%). Os bioensaios larvicidas foram realizados como previamente descrito, utilizando dose única de 40mg/L em diferentes intervalos de tempo (1, 7, 15, 30 e 45 dias) e a mortalidade foi registrada 24H pós-exposição.

4.5.5 Análise histológica das larvas

As larvas tratadas com as nanoemulsões nas CL_{50} e controle negativo (água) foram imediatamente fixadas em solução tampão paraformaldeído (PFA) a 4% (pH,

7,4) overnight. As larvas fixadas foram desidratadas usando uma série gradual de etanol e incluídas em historesina (Leica, Germany). Os blocos de historesina foram secos e seccionados em micrótomo com espessura de 5 μm . As amostras de larvas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (coloração HE) e examinadas em microscópio de luz composto (Olympus CX21i-LED, Tóquio, Japão) em aumento de 10X. Fotomicrografias foram obtidas com câmera digital. Mudanças comparativas entre as regiões do intestino das larvas tratadas e controle foram observadas de forma a se observar o efeito das formulações.

4.6 DOCKING MOLECULAR DOS ATIVOS EM POSSÍVEIS ALVOS LARVICIDAS

4.6.1 Docking molecular entre as moléculas e a acetilcolinesterase de *Drosophila melanogaster*

Para iniciar o estudo de docking, fez-se o download do arquivo depositado no Protein Data Bank (PDB) no Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (LI et al., 2008; ORLANDO; MALKOWSKI, 2016; SANDY; BUTLER, 2009) com as coordenadas da estrutura cristalográfica do alvo AChE de *Drosophila melanogaster* complexado com tacrine derivative 9-(3-iodobenzylamino)-1,2,3,4-tetrahydroacridine (PDB ID: 1QON, resolução: 2.72 Å).

Para realizar *docking* molecular, o programa GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) foi utilizado para investigar os modos de interação entre as moléculas mirceno e p-cimeno com a AChE. Esse programa utiliza o algoritmo genético para fins de experimentos de *docking* flexível de ligantes dentro de sítios de ligação de proteínas (CHANDAK et al., 2014). Primeiramente, foram adicionados átomos de hidrogênio e retiradas moléculas de água da enzima. Os inibidores que se encontravam complexados com o alvo foram extraídos. Antes de realizar a simulação de *docking*, foi feita a validação do resultado através do cálculo do RMSD (Root-Mean-Square Deviation) entre o ligante experimental e a conformação do ligante que obteve a melhor pose após o *docking*. Para que fosse realizado o cálculo de *docking* das moléculas em estudo empregaram-se as seguintes coordenadas: 1QON: x: 33.28; y: 67.11 e z: 10.16 com raio de 10 Å.

Para identificar as interações entre os compostos e o alvo foi necessário identificar os aminoácidos que compõem o sítio catalítico da enzima

acetilcolinesterase, sendo os aminoácidos TYR71, TRP83, TYR324, PHE330, TYR370, PHE371, TYR374, TRP472 e HIS480 (JORGENSEN et al., 1983).

4.6.2 Predição de Atividade

A predição da atividade dos compostos selecionados foi realizada usando o servidor PASS (<http://www.akosgmbh.de/pass/index.html>) (POGODIN et al., 2015), o qual prevê com alta acurácia mais de 3500 efeitos farmacoterapêuticos e mecanismos bioquímicos baseados na fórmula estrutural de uma substância, e eles podem ser usados de forma eficiente para encontrar novos alvos para estas moléculas (LAGUNIN et al., 2000). Outro servidor utilizado para prever o potencial de ligação molécula-receptor foi o servidor Similarity Ensemble Approach (SEA) que foi acessado por meio do link <http://sea.bkslab.org/>, para predizer potenciais alvos das propostas criadas.

4.7 AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DAS NANOEMULSÕES

4.7.1 Citotoxicidade em queratinócitos humanos (HaCAT) das nanoemulsões

As células epiteliais humanas que formam a linhagem celular HaCat (linha celular de queratinócitos humanos não tumorigênicos imortalizados espontâneos - código 341; Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) foram cultivadas em meio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100 µg/mL de penicilina G/estreptomicina até atingir uma densidade subconfluente a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com tripsina por 5 min (TrypLE™ Express; Thermo Fisher Scientific) a 37 °C, seguido pela inativação de proteases pela adição de 0,3 mg/mL de inibidor de tripsina. As células foram centrifugadas (500 × g por 5 min), ressuspensas em DMEM e incubadas em uma microplaca de 96 poços (200 µL / poço, 1 × 10⁶ células / mL) durante a noite a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Depois disso, elas foram expostas a concentrações de 0,1–250 mg/mL e 10 µL dos monoterpenos p-cimeno e mirceno por 24 h a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂. A viabilidade celular foi determinada usando um ensaio de viabilidade celular colorimétrico de resazurina (Sigma-Aldrich Co.) como substrato a 5 mg/mL. Após 4 h de incubação, o meio de cultura com a solução de MTT foi substituído por 100 µL de solução de isopropanol acidificada (0,04

NHCl), uma alíquota de cada poço foi transferida para placas de 96 poços (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) e a viabilidade celular foi medida usando espectrofotômetro (modelo 3550-UV; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA) no comprimento de onda de 570 nm. A média foi calculada e transformada em porcentagem, considerando que o controle negativo (DMEM) foi definido como tendo 100% de metabolismo celular.

4.7.2 Toxicidade aguda em zebrafish

Os animais utilizados foram zebrafish adulto (*Danio rerio*) da linhagem AB selvagem, fornecidos pela empresa Piscicultura Power Fish, localizada em Itaguaí-RJ, Brasil. Eles foram mantidos em um Sistema de manutenção na Plataforma Zebrafish do Laboratório de Pesquisa em Fármacos da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP- Brasil), com período de adaptação (40 dias), sendo o ritmo circadiano de 12 horas (período claro das 7h00 às 19h00), com temperatura controlada (23 ± 2 °C), e receberam ração comercial em flocos (Alcon Colors, Santa Catarina, Brasil) duas vezes ao dia, com meio monitorado, seguindo parâmetros de pH (6.0–8.0), condutividade (8.2 ± 0.2) e limpeza do sistema de recirculação (SOUSA et al., 2016). Os experimentos foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá (Brasil), número de registro 006/2021.

A avaliação da toxicidade aguda com Cim-NE e Mir-NE em zebrafish adulto foi determinada a partir do Teste Limite, seguindo os parâmetros da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) 425 OCDE (2008), com adaptações. Os animais foram separados em grupos de tratamento (5 animais/grupo), mantidos em jejum por 24 horas, sendo pesados e tratados por via oral de acordo com os métodos descritos por (BORGES et al., 2018). O Ne-Cym foi administrado nas doses de 2000 e 1750 mg/kg e o Ne-Myr na dose de 2000 mg/kg, via oral pelo método de gavagem, com o auxílio de uma pipeta volumétrica (HTL Lab Solutions Co.), o volume foi calculado de acordo com o peso do animal (SOUSA et al., 2016).

Após o procedimento de gavagem, os animais foram observados quanto às mudanças comportamentais, classificadas em Estágio I: aumento na atividade do nado; espasmos; tremores na cauda; Estágio II: nado circular; perda da postura; Estágio III: clonus; perda da motilidade; animal parado no fundo do aquário e morte (SOUSA et al., 2016). Na ausência de resposta à estimulação mecânica e ausência

de movimento do opérculo, o animal foi considerado morto (DE SOUZA et al., 2020; SOUSA et al., 2016). Ao término das observações, os animais passaram por eutanásia em resfriamento anestésico, de acordo com Diretrizes Americanas da Associação Médica Veterinária para Eutanásia Animal (AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION (AVMA), 2020).

Para análise histopatológica do intestino, fígado e rins, os animais foram fixados em solução de Bouin por 24 horas, descalcificados em solução de EDTA (Ácido etilenodiamina tetraacético, Sigma Co., São Paulo, Brasil) por 48 horas. As amostras foram desidratadas em séries de álcoois (70, 80, 90 e 100%), diafinizados em xilol e incluídos em parafina. As amostras foram seccionadas a 5 µm usando um micrótomo (Brand Rotary Microtome Cut 6062, SLEE Medical, Alemanha) e a análise histopatológica foi realizada após as seções de tecido serem coradas com hematoxilina e eosina, conforme descrito por Souza et al., (2016). As imagens foram analisadas em Microscópio Olympus BX41-Micronal e fotografadas com câmera MDCE-5C USB 2.0 (digital).

O Índice de Alterações Histopatológicas (IAH) foi calculado a partir dos níveis de alterações teciduais observadas nas brânquias, fígado e rins. As alterações foram classificadas em níveis I, II e III, e o valor do IAH indica se o órgão está saudável (0 a 10), com alterações de leves a moderadas (11 a 20), com alterações moderadas a graves (21 a 50), ou contendo alterações irreversíveis (> 100) (CARVALHO et al., 2018; POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994). Assim, os índices foram calculados de acordo com a equação 4:

Equação 4 - Cálculo do Índice de alterações histológicas (IAH)

$$IAH = \frac{\sum_{i=1}^{na} ai + 10 \sum_{i=1}^{nb} bi + 10^2 + \sum_{i=1}^{nc} ci}{N}$$

onde: a: alterações de nível I; b: alterações de nível II; c: alterações de nível III; na: número de alterações consideradas de nível I; nb: número de alterações consideradas de nível II; nc: número de alterações consideradas de nível III; N: número de peixes por tratamento.

Os resultados obtidos foram expressos em média ± Desvio Padrão (SD) da média de cada grupo experimental. Foi aplicado o teste ANOVA, seguido do teste de

Tukey. O nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0.05$). O software empregado foi o Graph Pad Prisma® (versão 5.03).

4.7.3 Toxicidade aguda em *Galleria mellonella*

O ensaio foi conduzido empregando larvas da espécie *G. mellonella*, de acordo com o descrito na literatura com modificações (ALLEGRA et al., 2018; MARENA et al., 2022). O experimento foi realizado com um número mínimo de 10 larvas cada grupo ($n=10$). As larvas foram cultivadas com ração à temperatura de 25 ° C até que chegassem ao peso superior à 0,2 mg. O experimento utilizou larvas entre 0,2 e 0,3 mg. As amostras foram administradas (10µL/larva) na última proleg do lado esquerdo da larva usando uma seringa Hamilton Microliter™ de 10 µL. Após a injeção, as larvas foram mantidas no escuro à temperatura ambiente e analisadas em 24, 48 e 72 horas (três dias). Durante o experimento foi avaliada a morte e o comportamento (aspectos físicos, como cor, melanização ou perda total de mobilidade) das larvas frente ao tratamento. A morte foi considerada quando não houve evidências de reação após estimulação física. As amostras foram avaliadas nas concentrações de 1000, 500 e 250 mg/Kg. Os controles utilizados foram: Controle trauma (apenas furo - CT), controle morte (Metanol 100% - CM), Controle solvente (5% etanol - CS) e controle nanoemulsão (Cim-B e Mir-B).

4.8 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS CONTENDO NETs

Hidrogéis foram desenvolvidos como forma de veicular as NETs para os ensaios repelentes. Três polímeros foram escolhidos com base na literatura (MARAFON et al., 2019; PARISOTTO-PETERLE et al., 2020): Carbopol® Ultrez 10 NF (Lubrizol, EUA), quitosana de baixo peso molecular (Sigma aldrich, EUA) e carboximetilcelulose (Synth, Brasil). Os hidrogéis foram desenvolvidos dispersando 3% (m/v) de cada polímero gelificante nas NETs previamente obtidas sob agitação. Além disso foi acrescentado 0,5 % de Noveon® Polycarbophil em todas as formulações. Os hidrogéis foram armazenados por 24 horas para completo intumescimento dos polímeros. A concentração final de ativo nos hidrogéis foi de 500 mg/g de formulação.

4.8.1 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 $0,1\text{-}100\text{ s}^{-1}$ por um período de 120 s para curva ascendente e 120 s para a curva descendente com taxa de cisalhamento de $100\text{-}0\text{ s}^{-1}$. A Eq. 5 foi usada para calcular o valor de n para caracterizar o comportamento do fluxo e k para caracterizar a viscosidade do material.

Equação 5 - Fórmula para o cálculo do comportamento de fluxo

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

onde: τ = taxa de cisalhamento, k = índice de consistência, γ = tensão de cisalhamento.

4.8.2 Reologia oscilatória

A reologia oscilatória foi feita utilizando um reômetro híbrido Discovery HR-1 (TA Instruments) 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'').

4.8.3 Análise de perfil de textura (TPA)

O perfil de textura dos hidrogéis foi analisado usando o analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems, Inglaterra). Sete gramas das formulações foram colocados em tubos cônicos de 50 mL (Falcon, BD®, Franklin Lakes, EUA) e centrifugados a 4000 rpm, por 5 min, para eliminar bolhas de ar e criar uma superfície lisa e foram deixados por 24 horas. Esses tubos foram então colocados sob uma sonda analítica (10 mm de diâmetro) e uma compressão uniaxial foi iniciada a uma velocidade de $0,5\text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ a uma profundidade pré-definida de 10 mm e retornou à superfície da amostra na mesma velocidade. Após 5 s de repouso, iniciou-se uma segunda compressão, nas mesmas condições. Todas as análises foram realizadas em triplicata e à temperatura de 32 °C.

4.8.4 Determinação *in vitro* da bioadesão dos hidrogéis

As orelhas de porco foram obtidas em um matadouro local e limpas com água, sendo aquelas com ferimentos descartadas. As orelhas foram tricotomizadas e a pele foi separada da cartilagem com o auxílio de um bisturi, em seguida, uma camada de 400 μm do estrato córneo e da epiderme foram separadas do tecido adiposo com auxílio de um dermatômetro (Nouvag TCM 300, Goldach, EUA). A força necessária para separar a pele da superfície da formulação foi obtida *in vitro* usando um analisador de textura TA-Xtplus (Stable Micro Systems, Surrey, UK). Dois cm de diâmetro de pele foram colocados na sonda cilíndrica (diâmetro de 10 mm) e fixados com um anel de borracha. O teste foi iniciado abaixando a sonda em velocidade constante ($1\text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$) até que a pele entrasse em contato com a amostra e penetrasse a profundidade de 1 mm. A pele e a amostra foram mantidas em contato por 60s e nenhuma força foi aplicada durante esse tempo. Em seguida, a sonda subiu a uma taxa constante ($0,5\text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$) até o desprendimento da amostra da pele. A força necessária para destacar a pele da amostra foi calculada. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.8.5 Liberação *in vitro* do p-cimeno e do mirceno a partir dos hidrogéis

Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados garantindo a condição *sink*. Os ensaios foram conduzidos utilizando células de Franz modificadas, com área de difusão de $1,77\text{ cm}^2$, em equipamento Microette (Hanson Research, Estados Unidos da América) e membrana de polietersulfona (Sigma-Aldrich). O compartimento receptor da célula de Franz modificada foi preenchido com 7,0 mL de tampão fosfato 0,1 M:etanol (50:50) (pH 7.4).

A solução receptora permaneceu sob constante agitação a 300 rpm com o uso dos mini-agitadores magnéticos presentes nas células de Franz. A temperatura foi mantida a $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por meio de um banho de aquecimento. A avaliação da quantidade de p-cimeno e mirceno liberados das nanoemulsões foi realizada após 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h. Os experimentos foram repetidos seis vezes em cada ponto. A quantificação foi realizada por HPLC de acordo com um método previamente validado.

4.8.6 Permeação e retenção cutânea *in vitro* do p-cimeno e do mirceno a partir dos hidrogéis

Peles de orelha suínos foram dermatomizadas para obtenção de espessura padronizada, equivalente à epiderme e derme (500 μm), com auxílio do dermatômetro Nouvag TCM300 (Nouvag, Goldach, Suíça).

Os ensaios de permeação cutânea *in vitro* foram realizados garantindo as condições *sink*. Foram conduzidos utilizando células de Franz (área de difusão de 1,77 cm^2) em equipamento Microette (Hanson Research, Los Angeles, CA, EUA).

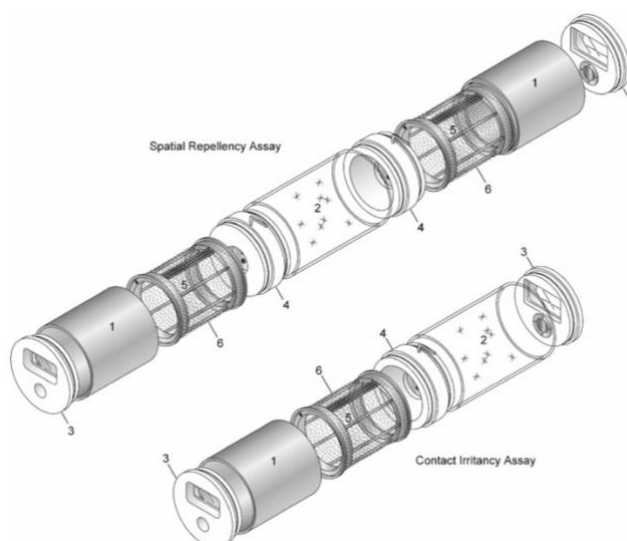
Para análise de retenção cutânea *in vitro*, a pele dermatomizada foi exposta às formulações por 8 h, nas mesmas condições experimentais da permeação cutânea *in vitro*. Ao final do experimento, as superfícies das peles foram lavadas com água destilada abundante para remover o excesso de formulação, sendo mantidas em vidro de relógio para evitar a perda do fármaco. O estrato córneo foi removido com a técnica de *tape stripping*, a fim de determinar a concentração do fármaco retido nessa camada da pele, utilizando-se 16 fitas adesivas (Scotch® 750 3M), sempre descartando-se a primeira. As fitas foram transferidas para um tubo de ensaio com 5 mL de acetonitrila, agitadas em vórtex por 1 min e, em seguida, submetidas a um banho de ultrassom por 15 min. A solução foi filtrada através de uma membrana de 0,22 μm (Merck®) e injetada em HPLC para quantificação do p-cimeno e do mirceno. Após a remoção do estrato córneo, a pele remanescente (epiderme viável + derme) foi triturada com auxílio de tesoura. Os fragmentos foram colocados em tubos de centrifuga contendo 5 mL de acetonitrila e agitados por 2 min. Em seguida, foram levados ao homogeneizador Turrax® por 1 min e, em seguida, deixados em banho ultrassônico por 30 min. Finalmente, foi filtrada através de uma membrana de 0,22 μm (Millipore®) e o p-cimeno e o mirceno extraídos e quantificados por CLAE.

4.9 ATIVIDADE REPELENTE DOS MONOTERPENOS E HIDROGEL

4.10.1 Repelência espacial dos monoterpenos

O ensaio de repelência espacial foi realizado utilizando-se o sistema de *high-throughput screening* (HITS) desenvolvido por Grieco (Figura 2).

Figura 2 - Desenho esquemático do sistema de peneiramento de *high-throughput screening* (HITS) usado no ensaio de repelência espacial.



Fonte: (GRIECO et al., 2005)

Esse dispositivo é composto por 3 cilindros conectados. Para a atividade de repelência espacial um cilindro de tratamento com os terpenos impregnados em papel foi acoplado a câmara central transparente. Os mesmos passos foram repetidos para formar uma segunda câmara (câmara controle - solução em branco) idêntica à primeira, exceto que uma rede tratada com diluente foi usada. As câmaras de tratamento e controle foram conectadas por um cilindro transparente para formar o conjunto completo do ensaio de repelência espacial. As válvulas borboleta nas seções de ligação foram ajustadas para a posição fechada. Vinte mosquitos foram transferidos para a câmara clara (central), e um pano opaco foi enrolado em torno dela. Os orifícios de visualização nas tampas finais não foram cobertos com o pano opaco para permitir que a luz nas extremidades do sistema de câmara servisse como atrativo para o *Aedes aegypti*. O conjunto foi colocado em um suporte e, após um período de 30 segundos de aclimação, as válvulas do tipo borboleta foram abertas simultaneamente. Após 10 min, as válvulas foram fechadas simultaneamente e o número de mosquitos em cada câmara foi contado. Também se registrou o número de mosquitos derrubados. Um índice de atividade espacial (IAE) foi utilizado para avaliar as respostas de fêmeas de mosquitos no ensaio de repelência espacial (Equação 6). O IAE foi calculado para cada replica experimental.

Equação 6 - Cálculo do índice de atividade espacial

$$IAE = \frac{N_c - N_t}{N_c + N_t}$$

onde N_c é o número de fêmeas na câmara controle do dispositivo e N_t é o número de fêmeas na câmara tratada do dispositivo.

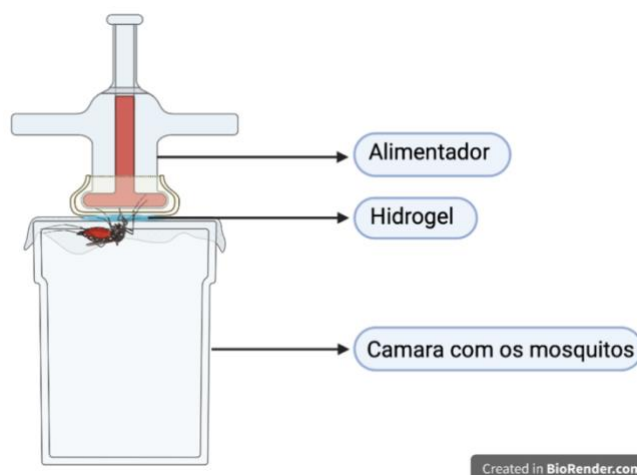
A repelência espacial foi representada pelo cálculo do índice de atividade espacial. O IAE varia de -1 a 1, sendo que 0 indica ausência de resposta atrativa ou repelente. Quando um valor de IAE é < 0 , isso indica uma proporção maior de mosquitos que se deslocaram para a câmara de tratamento do que para a câmara de controle, resultando em uma resposta atrativa. Quando um valor de IAE é > 0 , isso indica uma maior proporção de mosquitos movendo-se para a câmara de controle (longe da extremidade de tratamento do dispositivo de ensaio), sugerindo uma resposta repelente.

4.10.2 Teste comportamental com o alimentador artificial

Para avaliar o efeito repelente dos hidrogéis contendo as nanoemulsões de forma mais realista, grupos de 7 fêmeas de mosquitos foram soltos em um copo sobre o qual foi posicionado um comedouro artificial contendo sangue de coelho e intestino suíno, aquecido a 37°C (Figura 3). Três grupos foram testados:

1. Grupo controle negativo (sem hidrogel)
2. Grupo com Cim-NE-hidrogel (300 mg)
3. Grupo com Mir-NE-hidrogel (300 mg)

Figura 3 - Representação esquemática do teste repelente com alimentador artificial. Created with BioRender.com



Os mosquitos foram deixados se alimentar por 10 min e, em seguida, as fêmeas foram avaliadas se haviam se alimentado ou não. Os experimentos foram

conduzidos em triplicata, com 7 mosquitos em cada grupo. Após 10 minutos, os mosquitos foram removidos e examinados quanto ao seu estado de alimentação sanguínea.

4.10.3 Docking molecular em possível alvo repelente

Antes da simulação do docking molecular, duas etapas foram realizadas: otimização dos ligantes e processo de validação ou redocking. A primeira, com o auxílio do programa HyperChem, por meio do emprego do método semi-empírico *Recife Model 1* (RM1) (GUTOWSKA; MACHOY; MACHALIŃSKI, 2005), teve como finalidade otimizar a energia e geometria dos ligantes P-cimeno (CID: 7463), Mirceno (CID: 31253) e DEET (CID: 4284), sendo esta última a molécula de referência.

O redocking, realizado utilizando o programa GOLD 2020.1 (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*), que se baseia no algoritmo genético, serve para validar a capacidade preditiva do programa em identificar o sítio ativo da macromolécula, em que o ligante esteja em uma orientação favorável no espaço tridimensional (HEVENER et al., 2009; LÓPEZ-CAMACHO et al., 2016). Fornece com isso, a coordenada de origem, o valor do RMSD (*Root Mean Square Derivation*) e o raio de validação. Para tanto, obteve-se a estrutura cristalográfica da proteína de ligação de odorantes 22 (OBP22), complexada ao ácido araquidônico, do organismo *Aedes aegypti*, por meio do banco de dados PDB (*Protein Data Bank*), com o código de identificação 6OII (WANG et al., 2020).

Após validação do alvo, verificado através do valor do RMSD, o docking molecular, também com o emprego do programa GOLD, foi então executado para a avaliação das interações e os tipos de interações das melhores poses do ligante no sítio ativo da proteína.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS TERPENOS

A partir da análise em espectrofotômetro UV-Vis, observou-se que o comprimento de onda de absorbância máxima para ambos os monoterpenos foi de 225 nm, semelhante ao descrito anteriormente na literatura (LEE et al., 2015; WALKER; ERSKINE HAWKINS, 1952). Em seguida, esse comprimento de onda foi escolhido para a análise por HPLC.

5.1.1 Adequabilidade do sistema

A avaliação da adequação do sistema é importante para garantir o desempenho do sistema cromatográfico para a análise desejada (BOSE, 2014). A eficiência da coluna (N) e o fator de cauda (T) apresentaram valores de acordo com as diretrizes da FDA ($T \leq 2.0$ e $N > 2000$) (CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH (CDER), 1994) para ambos os monoterpenos.

Tabela 1 - Parâmetros de adequação do sistema para p-p-cimeno e mirceno

	p-p-cimeno	mirceno
Parametros	Média ± DP	Media ± DP
Fator de assimetria (10%)	1.1 ± 0.02	1.04 ± 0.01
Fator de cauda (T)	1.11 ± 0.02	1.05 ± 0.01
Eficiência da coluna	12106 ± 324.15	13588 ± 290.73

5.1.2 Linearidade

As curvas analíticas construídas para o p-p-cimeno e mirceno mostraram-se lineares na faixa testada (15-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figura 4-A e 4-B). Observa-se que para ambos os monoterpenos as áreas dos picos em função das concentrações apresentaram uma relação linear aparente, com alta correlação e fator determinante, com coeficiente angular diferente de zero ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabulado}}$) (Tabela 2).

Figura 4 - Cromatogramas obtidos para o teste de linearidade do p-p-cimeno (A) e mirceno (B) e curvas analíticas obtidas pela avaliação da linearidade de p-p-cimeno (C) e mirceno (D)

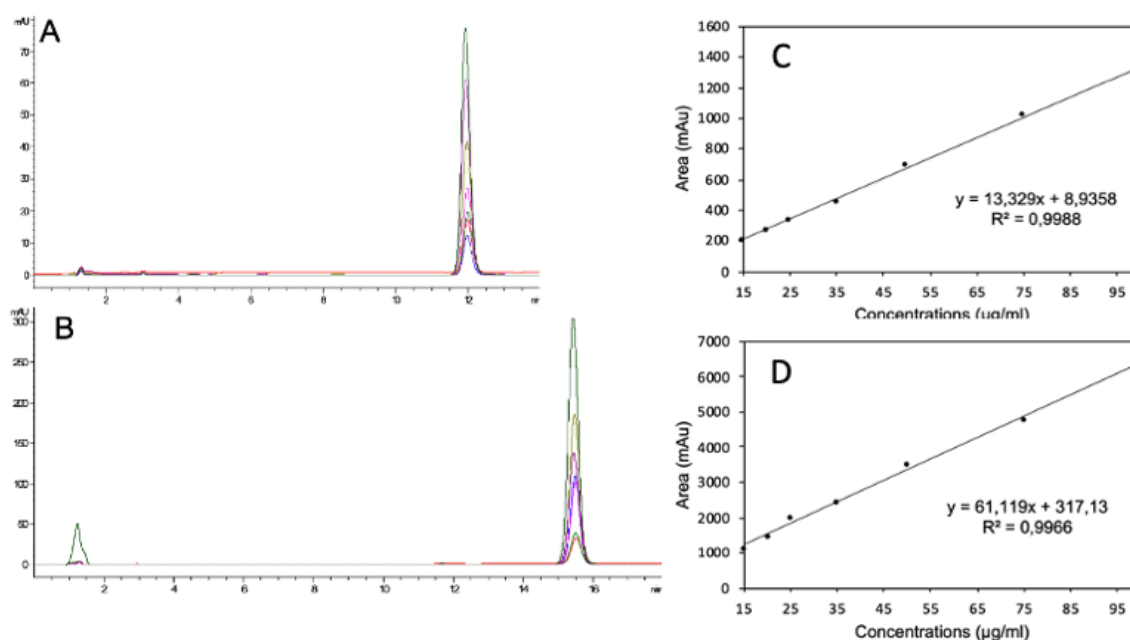


Tabela 2 - Análise estatística da linearidade

	p-p-cimeno	mirceno
Estatística de regressão		
Coefficiente de correlação (r)	0.9987	0.9968
Coefficiente de determinação (r²)	0.9985	0.9960
Slope Significance (F-test, ANOVA)		
F calculado	4059	1262
F tabelado	0,0000000180	0,00000375

5.1.3 Sensibilidade

O limite de detecção representa a mínima concentração de analito em uma amostra que pode ser detectada e não necessariamente quantificada. Por outro lado, o limite de quantificação representa a menor concentração de analito que pode ser precisamente quantificada. O limite de detecção para mirceno e p-p-cimeno foi de 0,51 e 0,65 µg/mL, respectivamente, e o limite de quantificação foi de 1,54 e 1,98 µg/mL.

5.1.4 Precisão

Os resultados de precisão, representados pela repetibilidade e precisão intermediária mostram uma DSR inferior a 1% (Tabela 3) em todos os níveis analisados (15, 35 e 100 $\mu\text{g/mL}$), o que indica que o método proposto é preciso.

Tabela 3 - Resultados de precisão para os diferentes níveis de mirceno e p-p-cimeno

Precisão (%RSD)	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Mirceno	p-p-cimeno
Repetibilidade (intra-dia)	15	0.3	0.7
	35	0.4	0.5
	100	0.8	0.2
Precisão intermediária (inter-dia)	15	0.2	0.9
	35	0.8	0.9
	100	0.8	1.0

5.1.6 Exatidão

A exatidão foi comprovada pelo teste de recuperação. As quantidades de solução de terpenos foram adicionadas à matriz de formulação para obtenção das soluções de três concentrações. A concentração determinada experimentalmente e a concentração teórica foram obtidas (Tabela 4).

Tabela 4- Resultados de exatidão para as concentrações de mirceno e p-p-cimeno recuperadas da matriz de formulação.

	Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	RSD (%)
p-p-cimeno	15	15.02 $\pm$ 0.11	100.18	0.71
	35	35.13 $\pm$ 0.12	100.39	0.34
	100	99.68 $\pm$ 0.56	99.68	0.55
mirceno	15	14.76 $\pm$ 0.18	98.46	0.88
	35	34.70 $\pm$ 0.26	99.16	0.64
	100	104.37 $\pm$ 0.23	104.37	0.21

As porcentagens de recuperação para ambos os compostos ficaram dentro da faixa aceitável de 95% a 105% em todos os três níveis de concentração. Isso demonstra a capacidade do método de fornecer quantificação precisa e confiável mesmo na presença da matriz complexa de nanoemulsão, apoiando ainda mais sua adequação para controle de qualidade e análise dessas substâncias em sistemas de liberação de fármacos, como as nanoemulsões.

5.1.7 Robustez

A robustez do método foi sistematicamente avaliada variando-se dois parâmetros críticos independentemente: o comprimento de onda e a razão da fase móvel. Os resultados deste estudo de robustez estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5 - Efeito das mudanças nas condições cromatográficas na quantificação de p-p-cimeno e mirceno na concentração de 35 µg/mL (n = 3)

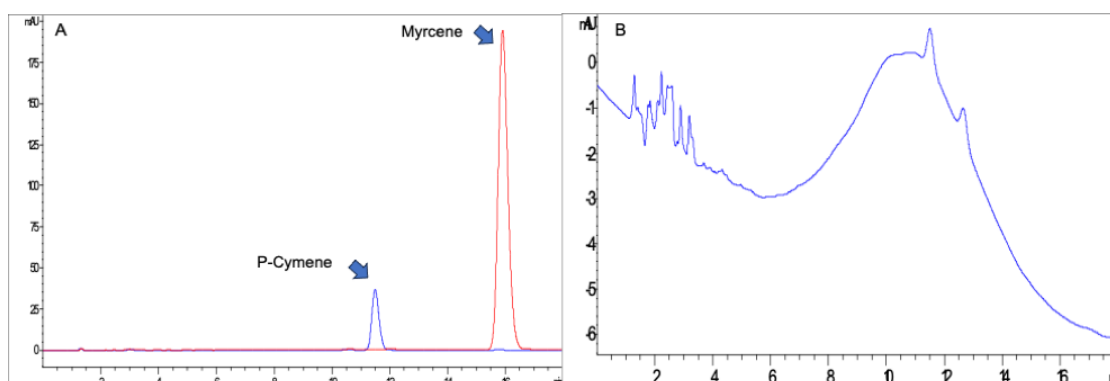
Variável	p-p-cimeno		Mirceno	
	Recuperação (%)	RSD	Recuperação (%)	RSD
Comprimento de onda				
224	101,33	0,48	100,8	1,05
226	94,28	0,56	101,51	0,26
Proporção da fase móvel				
55:45	102,05	1,81	99,5	1,57
70:30	100,01	0,6	101,05	0,9

Os resultados indicam que as variações no comprimento de onda e na razão da fase móvel tiveram impacto mínimo nas porcentagens de recuperação e desvios padrão relativos (RSD) tanto para p-p-cimeno quanto para mirceno. Notavelmente, todas as porcentagens de recuperação para p-p-cimeno e mirceno caíram confortavelmente dentro da faixa aceitável predefinida de 80-120% (AOAC INTERNATIONAL, 2023). Isso enfatiza a capacidade do método de fornecer resultados precisos e confiáveis mesmo quando submetido a variações nas condições cromatográficas. Além disso, os valores de desvio padrão relativo (RSD), que indicam a precisão do método, permaneceram consistentemente abaixo de 2% para ambos os analitos em todas as condições testadas.

5.1.8 Seletividade

A principal aplicação para os métodos desenvolvidos é a quantificação de monoterpenos p-p-cimeno e mirceno em nanoemulsões. Para isso, é obrigatório que o método seja seletivo para os 2 analitos e não sofra interferência de outros componentes da matriz, como os tensoativos utilizados na obtenção das nanoemulsões. Como pode ser visto na figura 5, o método demonstrou ser seletivo e permitiu quantificar apenas p-p-cimeno e mirceno.

Figura 5 - Cromatograma de (a) nanoemulsão de p-p-cimeno e nanoemulsão de mirceno e (b) solução de tensoativos.



5.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NETS

5.2.1 Determinação do Equilíbrio Hidrófilo Lipofílico requerido (EHLr)

A determinação do EHLr tem se mostrado como uma ferramenta eficaz no desenvolvimento de fitoprodutos, como as nanoemulsões contendo óleos voláteis (FERNANDES et al., 2013; ORAFIDIYA; OLADIMEJI, 2002). A partir da determinação do EHL é possível determinar qual a melhor proporção entre dois tensoativos, um mais lipofílico, e um mais hidrofílico (GRIFFIN, 1949), que será necessária para obter uma nanoemulsão estável. O EHL requerido dos terpenos mirceno e p-cimeno foram determinados a partir da mistura de proporções de spam 80 e Tween 20 como descrito na Equação 3. As proporções utilizadas estão mostradas na Tabela 6.

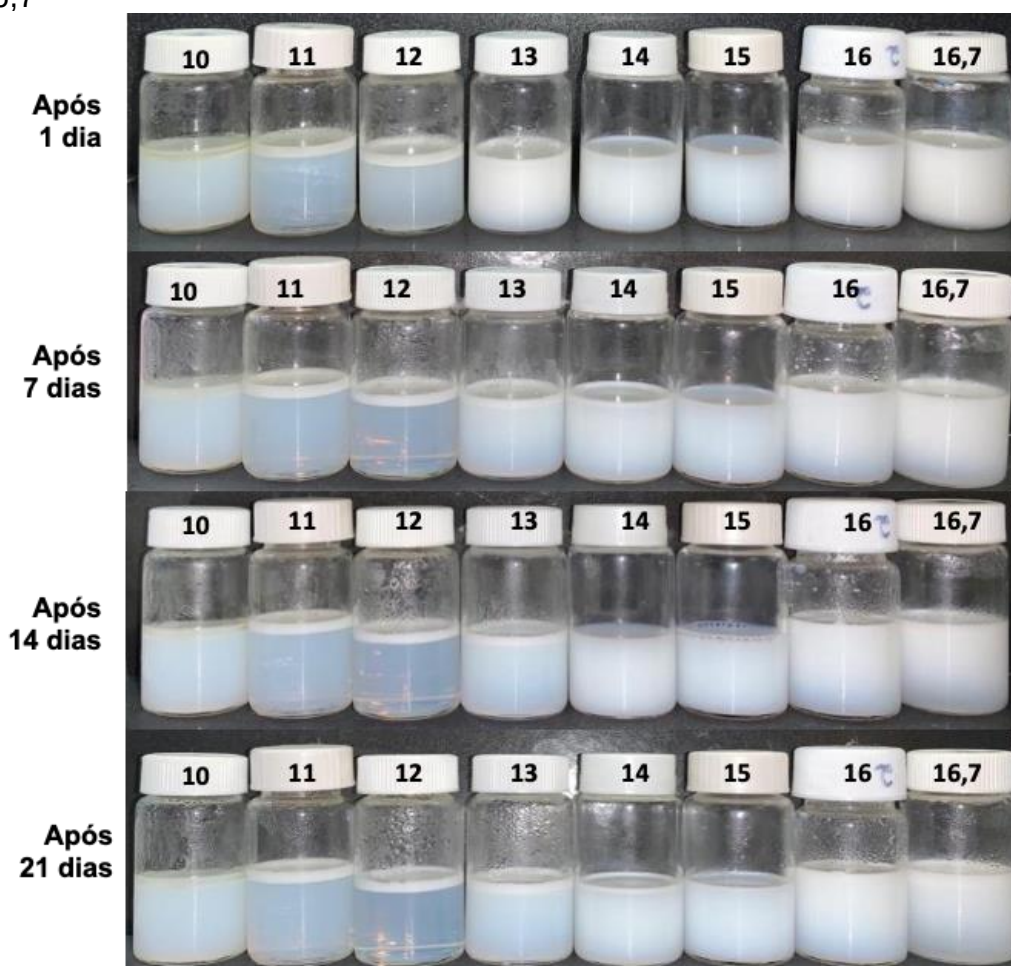
Tabela 6 - Quantidade em porcentagem (%) e em massa dos constituintes das formulações preparadas com mirceno e p-cimeno.

EHL	Spam 80 (%)	Spam 80 (g)	Tween 20 (%)	Tween 20 (g)	Tween 20 + Spam 80 (g)	Terpenos (g)	H ₂ O	Total (g)
10	54,03	0,27	45,97	0,23	0,5	0,5	9	10
11	45,97	0,23	54,03	0,27	0,5	0,5	9	10
12	37,90	0,19	62,10	0,31	0,5	0,5	9	10
13	29,84	0,15	70,16	0,35	0,5	0,5	9	10
14	21,77	0,11	78,23	0,39	0,5	0,5	9	10
15	13,71	0,07	86,29	0,43	0,5	0,5	9	10
16	5,65	0,03	94,35	0,47	0,5	0,5	9	10
16,7	0	0	5	0,5	-	0,5	9	10

Após 24 horas de preparação, as formulações contendo p-cimeno com EHL 10-13 apresentaram uma camada amarelada sobre a superfície, o que pode ser um

indicativo de separação de fases (Figura 6). As formulações 16 e 16,7 apresentaram aspecto leitoso e uma leve cremação, que pode ser indicativo de amadurecimento de Ostwald, um mecanismo muito importante quando se trata de instabilidade em nanoemulsões. Esse tipo de mecanismo está relacionado à diferença entre os tamanhos de gotículas na formulação, tendo as gotas menores maior potencial químico, e assim se difundem para as maiores (NAZARZADEH; ANTHONYPILLAI; SAJJADI, 2013). As formulações com valores de EHL de 14 e 15 foram as que apresentaram as melhores características visuais, além de um aspecto azulado, característicos de nanoemulsões (MCCLEMENTS, 2012; ORTIZ-ZAMORA et al., 2020). Deste modo, as formulações com valores de EHL 14 e 15 foram selecionadas para as análises por espalhamento dinâmico da luz.

Figura 6 - Aspecto visual das formulações contendo p-cimeno na escala de EHL de 10 a 16,7



Como pode ser observado na tabela 7 após 24 horas (D1) a formulação de EHL 14 apresentou tamanho de gotícula de 116 nm, e após 21 dias não houve uma

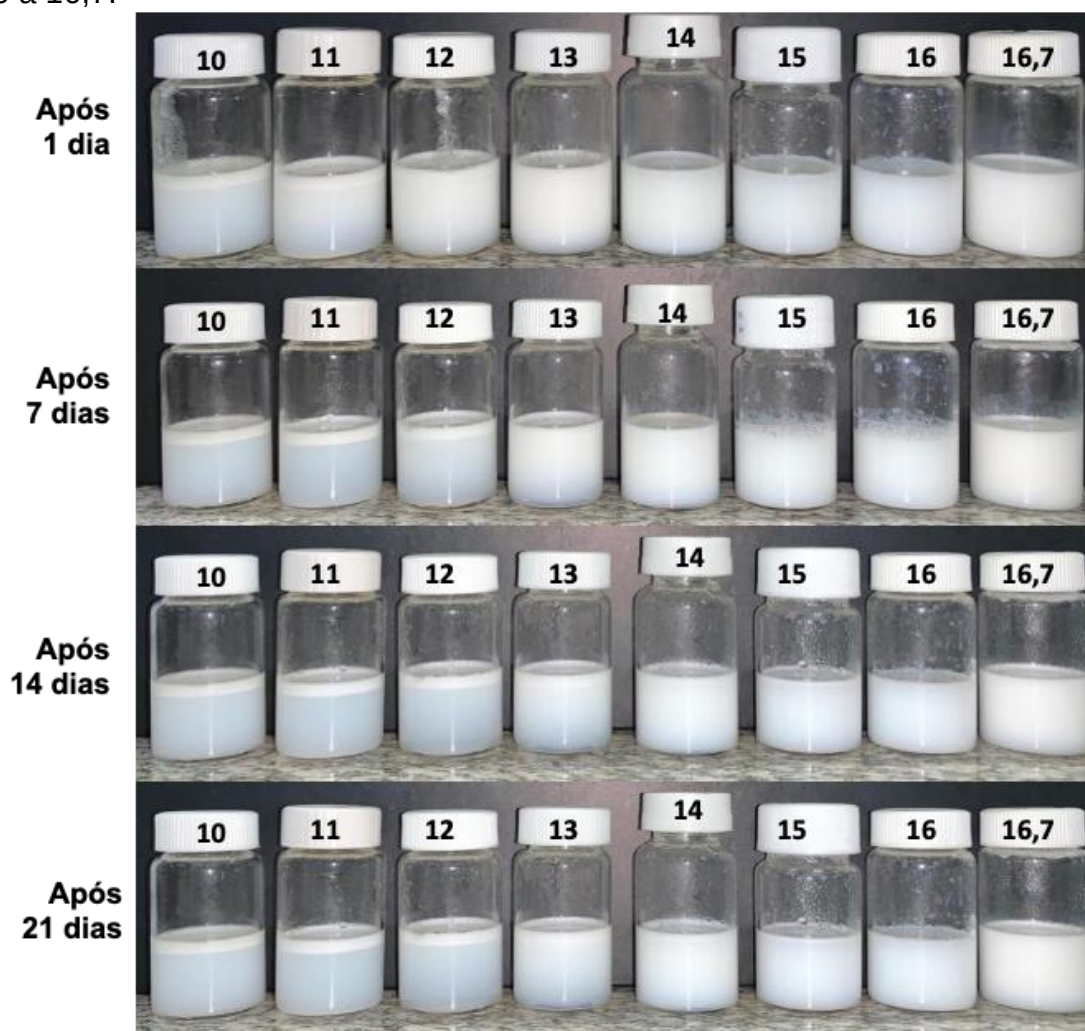
mudança significativa no tamanho de gotícula, assim como no IP e no potencial zeta. A formulação com EHL 15 apresentou menor tamanho de gotícula, menor índice de polidispersidade e menor potencial zeta, quando comparado com a formulação de EHL 14. É possível observar também que não houve uma variação significativa desses parâmetros no período analisado (60 dias). Por essa razão a formulação com EHL 15 foi escolhida como sendo o EHLr requerido do monoterpeno p-cimeno.

Tabela 7 - Tamanhos de gotícula, Índice de polidispersidade e potencial zeta das melhores formulações contendo p-cimeno.

Tempo	EHL 14			EHL 15		
	Tamanho (nm)	IpD	Potencial zeta (mV)	Tamanho (nm)	IpD	Potencial zeta (mV)
D1	116,0 ± 0,40	0,322 ± 0,024	-34,7 ± 1,1	98,46 ± 0,83	0,209 ± 0,002	-25,9 ± 0,43
D7	111,2 ± 1,58	0,285 ± 0,007	-36,1 ± 0,7	96,74 ± 1,00	0,226 ± 0,006	-24,3 ± 0,80
D14	107,6 ± 1,59	0,331 ± 0,023	-26,8 ± 0,4	95,43 ± 1,20	0,204 ± 0,006	-25,4 ± 1,45
D21	106,5 ± 0,73	0,350 ± 0,003	-34,5 ± 0,8	98,7 ± 1,508	0,216 ± 0,004	-25,5 ± 0,68
D30	-	-	-	96,09 ± 0,61	0,218 ± 0,009	-23,3 ± 0,45
D45	-	-	-	97,69 ± 0,20	0,205 ± 0,013	-25,5 ± 1,14
D60	-	-	-	89,70 ± 0,17	0,240 ± 0,004	-25,9 ± 0,35

Após 24 h de preparo, as formulações de mirceno com menores valores de HLB (10-11), ou seja, maior quantidade de surfactante mais lipofílico (span 80), apresentaram sinais clássicos de instabilidade (cremagem) (Figura 7). Formulações com valores de EHL de 12-14 e 16,7 HLB apresentaram aspecto leitoso e mais viscoso, característico de emulsões com gotículas na escala micrométrica. É importante mencionar que essas formulações também apresentaram sinais de instabilidade após 21 dias. As formulações com EHL 15 e 16 foram as que apresentaram as melhores características visuais, como aspecto azulado, característico das nanoemulsões, e que ao longo do tempo mantiveram essas características. Assim, essas formulações foram selecionadas para a DLS.

Figura 7 - Aspecto visual das formulações contendo mirceno na escala de EHL de 10 a 16,7.



O tamanho das gotículas e o IPd da formulação com EHL 16 foi ligeiramente menor do que a formulação com EHL 15 (Tabela 8). Ao longo do tempo, não houve variação significativa no tamanho para ambas as formulações. Diferentemente da formulação contendo p-cimeno, a melhor formulação com mirceno foi a com EHL 16, que possui em sua composição maior quantidade de Tween 20, o tensoativo mais hidrofílico.

A literatura demonstra que a diferença do tamanho do grupo principal em um par de tensoativos tem um efeito sinérgico na estabilização da emulsão. Além disso, o uso de mistura de tensoativos aumenta as propriedades do filme interfacial, levando a uma melhor adsorção entre as fases oleosa e aquosa e aumentando a estabilidade das nanoemulsões (CHONG et al., 2018).

Tabela 8 - Tamanhos de gotícula, Índice de polidispersidade e potencial zeta das melhores formulações contendo mirceno.

Tempo	EHL 15			EHL 16		
	Tamanho (nm)	IpD	Potencial zeta (mV)	Tamanho (nm)	IpD	Potencial zeta (mV)
1D	123,9 ± 1,15	0,369 ± 0,02	-17,4 ± 0,0	118,8 ± 1,2	0,241 ± 0,01	-21,1 ± 0,3
7 D	113,5 ± 1,45	0,352 ± 0,05	-20,7 ± 0,3	118,0 ± 3,7	0,227 ± 0,006	-21,5 ± 0,5
14 D	112,0 ± 0,51	0,364 ± 0,01	-26,8 ± 0,4	110,8 ± 3,4	0,235 ± 0,007	-22,6 ± 2,3
21 D	115,4 ± 0,45	0,240 ± 0,02	-24,3 ± 0,5	104,5 ± 0,4	0,255 ± 0,005	-25,5 ± 0,6
30 D				105,5 ± 0,7	0,227 ± 0,009	-25,3 ± 1,6
45 D				99,93 ± 1,4	0,246 ± 0,012	-21,0 ± 2,4
60 D				84,50 ± 0,8	0,217 ± 0,008	-20,7 ± 0,9

A literatura descreve resultados similares contendo terpenos cujo índice de polidispersividade foram similares aos encontrados nesses trabalhos, originando nanoemulsões estáveis e adequadas para aplicação larvicida (DUARTE et al., 2015b). É importante destacar que diversos trabalhos contendo óleos essenciais, que possuem em sua composição química substâncias químicas estruturalmente análogas aos terpenos utilizados neste trabalho, obtiveram formulações estáveis utilizando os mesmos tensoativos e a mesma concentração de ativos (5%) (DUARTE et al., 2015b; KHUMPIRAPANG et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2016, 2017b; SUNDARARAJAN et al., 2018). No entanto, há um número limitado de estudos na literatura que enfocam especificamente a produção e caracterização de nanoemulsões incorporando p-cimeno ou mirceno. Em um estudo foi demonstrado que um método de alta energia pode produzir uma nanoemulsão composta por 5% de p-p-cimeno, estabilizada com 1% de Tween 80, com tamanhos de gotículas medindo aproximadamente 150 nm, mantendo a estabilidade por um período de 60 dias (QI et al., 2023).

O potencial zeta é usado para prever a estabilidade da dispersão e seu valor depende da propriedade físico-química de molécula bioativa, polímero, veículo, presença de eletrólitos e sua adsorção (K. GURPRET; S. K. SINGH, 2018). Os valores de potencial zeta encontrados para as nanoemulsões obtidas se mantiveram estáveis no período analisado, o que indica uma possível estabilidade da formulação no sentido de evitar a maturação de Ostwald e a coalescência das gotículas. Características de

potencial zeta semelhantes foram descritas em outros trabalhos da literatura acerca de nanoemulsões contendo terpenos, entre 20 e 30 mV, adequadas para aplicações larvicidas (DUARTE et al., 2015b; KHUMPIRAPANG et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2016, 2017b; SUNDARARAJAN et al., 2018).

Como pode ser observado na tabela 7, o tamanho de gotícula e o IPd da formulação com EHL 16 foi ligeiramente menor que a formulação de EHL 15. Com o passar do tempo não houve variação significativa de tamanho para ambas as formulações. Diferente da formulação contendo mirceno a melhor formulação com p-cimeno foi a com EHL 16, que possui na sua composição uma quantidade maior de Tween 20, o tensoativo mais hidrofílico.

Em relação à caracterização física, o reflexo azulado é característico desse tipo de sistema coloidal, sendo atribuído ao efeito Tyndall, tornando-se um valioso indicador macroscópico da geração de nanogotículas (SOLANS; SOLÉ, 2012). Além disso, Forgiarini et al (2000) indicam que uma nanoemulsão adequada deve ter pequenas gotas médias da fase dispersa ($< 300\text{nm}$) (FORGIARINI et al., 2000). Izquierdo e colaboradores (2005) descreveram que valores de índice de polidispersividade próximos a 0,2 são indicativos de estabilidade cinética com distribuição quase monomodal (IZQUIERDO et al., 2005). Assim, de modo geral, considerando que neste estudo as formulações que se apresentaram estáveis no EHLr, apresentaram perfis de distribuição de tamanho semelhantes e baixo índice de polidispersidade, o presente estudo sobre nanoemulsões de p-cimeno e mirceno pode ser considerado promissor.

5.2.2 Análise de rastreamento de nanopartículas

A partir dos resultados acima obtidos a formulação de EHL 15 contendo mirceno e a formulação de EHL 16 contendo p-cimeno foram submetidas a análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) (Tabela 9). O NTA é uma técnica para visualização direta e em tempo real, dimensionamento e contagem de materiais nanométricos suspensos em meios aquosos (HOU et al., 2018). A partir da análise por NTA foi observada uma diferença entre o tamanho de gotículas das formulações achadas na técnica de DLS principalmente para a formulação contendo p-cimeno. Essa diferença pode ser explicada pelas diferenças por conta da incerteza devido à problemas na medição do coeficiente de difusão. Além disso, a medição do tamanho de gotículas

pode ser influenciada pelo grau de aglomeração das gotículas suspensas (BOYD; PICHAIMUTHU; CUENAT, 2011; HOU et al., 2018).

Tabela 9 - Tamanho de gotícula e concentração de gotículas das NETs

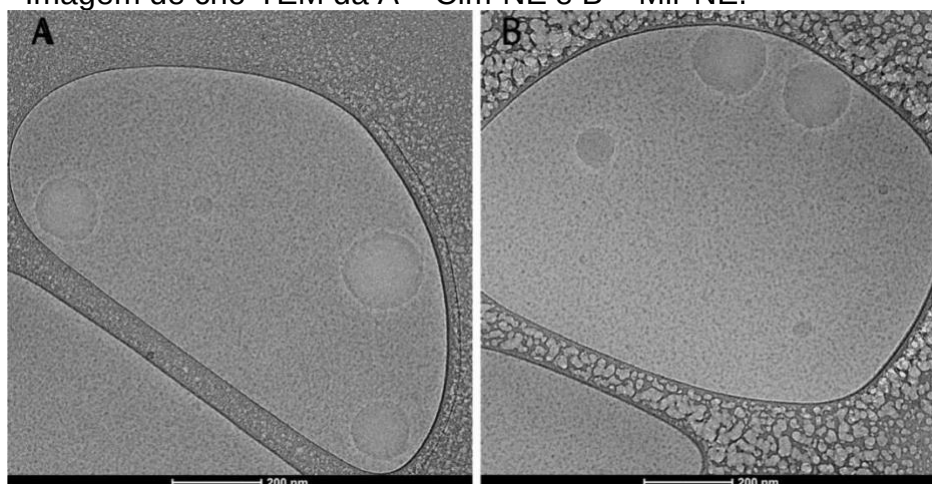
Amostra	Tamanho (nm)	Concentração (gotículas/mL)	Índice span
Cim-NE	145,7 ± 7,7	1,10 x 10 ¹²	0,317
Mir-NE	126,4 ± 5,6	7,37 x 10 ¹¹	0,298

O índice span é um indicativo da homogeneidade na distribuição do tamanho de gotícula. A Cim-NE e a Mir-NE apresentaram um índice de span de 0,317 e 0,298, respectivamente (Tabela 9). Esses resultados confirmam o perfil monodisperso observado nos resultados por DLS. Esse perfil monodisperso é essencial para a manutenção da estabilidade de nanoformulações (GAO et al., 2013a).

5.2.3 Criomicroscopia eletrônica de transmissão

Crio-MET é uma das técnicas mais úteis para a investigação de nanoemulsões, uma vez que fornece informações detalhadas sobre a estrutura interna dos sistemas coloidais observados em seu estado nativo (KLANG et al., 2012). Através da microscopia criogênica de transmissão foi possível observar gotículas esféricas e com tamanho próximo a 200 nm (Figura 8), resultados que corroboram os obtidos por DLS e NTA. Resultados similares foram vistos por Kawakami et al, onde por crio-TEM observaram gotículas esféricas com tamanho menor que 180 nm (KAWAKAMI et al., 2021). Essa técnica é bastante descrita e utilizada para caracterizar a morfologia de nanoemulsões, e confirma fielmente os resultados encontrados em outras técnicas.

Figura 8 - Imagem de crio-TEM da A – Cim-NE e B – Mir-NE.

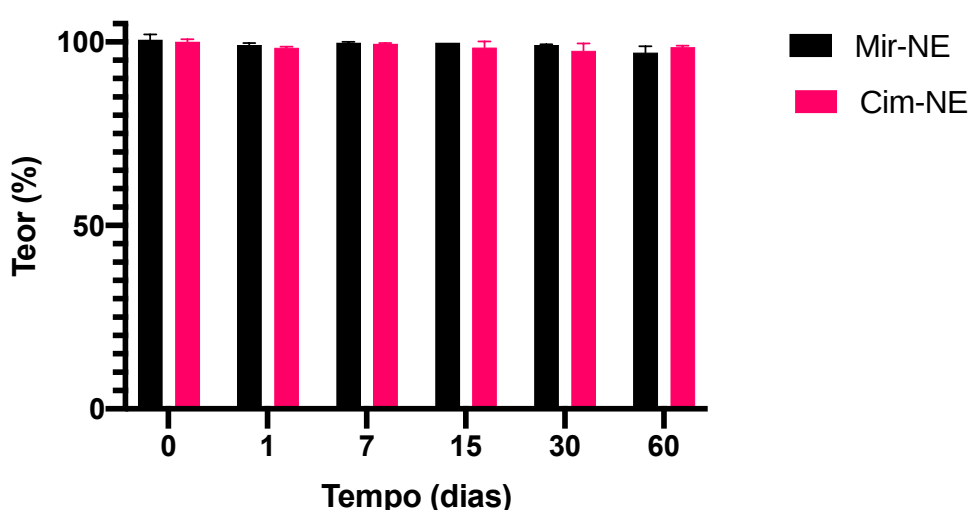


5.2.4 Determinação do teor de monoterpenos nas NETs

A estabilidade de nanoemulsões é de grande importância, especialmente quando essas formulações são destinadas a aplicações farmacêuticas, cosméticas ou alimentícias. A manutenção do teor de ativos ao longo do tempo é crucial para garantir a eficácia e a qualidade do produto.

A partir do tempo inicial (T0), o teor de monoterpenos nas nanoemulsões não apresentou variações significativas ao longo dos 60 dias de armazenamento (Figura 9). Isso sugere estabilidade adequada dessas nanoemulsões em relação à preservação dos monoterpenos encapsulados.

Figura 9 - Teor de monoterpeno (%) em nanoemulsões ao longo de 60 dias



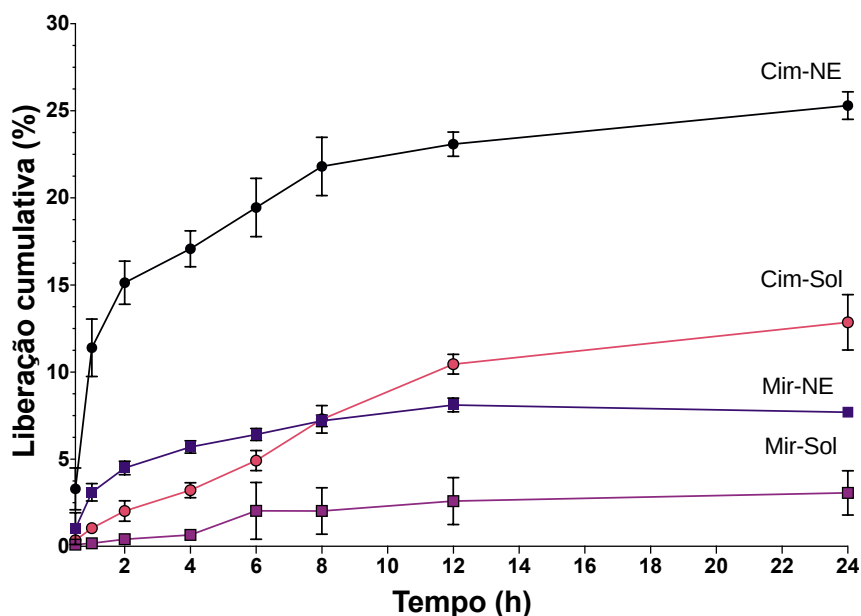
A constância do teor de monoterpenos nas nanoemulsões durante 60 dias é um resultado promissor. A estabilidade observada pode ser atribuída a diversos fatores, incluindo a técnica de preparação das nanoemulsões e à escolha adequada dos tensoativos. Além disso, é possível que as propriedades físico-químicas dos monoterpenos e a sua distribuição dentro das nanoemulsões também tenham contribuído para a manutenção das concentrações ao longo do período de armazenamento. É importante destacar que os resultados de teor obtidos corroboram com os resultados na atividade larvívora, onde não se observou diminuição na atividade no período testado (45 dias).

5.2.5 Liberação *in vitro* das nanoemulsões

Uma vantagem potencial do uso de nanoemulsões é sua capacidade de aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade de ativos. As nanoemulsões demonstraram aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis, como monoterpenos, o que pode

melhorar a entrega e a eficácia do fármaco. A liberação cumulativa de ambos os terpenos livres foi menor quando comparada à liberação cumulativa de nanoemulsões (Figura 10).

Figura 10 – Perfil de liberação *in vitro* de NETs (Cim-NE, Mir-NE) e terpenos livres (Cim-Sol e Mir-Sol).



Uma possível explicação para isso pode ser atribuída às características químicas dos terpenos estudados. O p-cimeno tem um LogP menor que o mirceno e uma maior solubilidade em água, o que pode explicar sua maior liberação. Além disso, o p-cimeno tem um volume molar menor do que o mirceno, o que pode contribuir para sua maior liberação (Tabela 10).

Pesquisas anteriores apoiam a hipótese de que monoterpenos exibem liberação mais lenta de nanosistemas de liberação de fármacos (ZIELIŃSKA et al., 2020). Este fenômeno pode ser explicado pela maior solubilidade do tensoativo:óleo (S:O), o que leva a uma maior afinidade com o núcleo oleosa. Consequentemente, uma menor quantidade de monoterpenos é liberada no meio circundante (MIASTKOWSKA; SLIWA, 2020).

Tabela 10 - Propriedades moleculares/físico-químicas *in silico* dos monoterpenos p-cimeno e mirceno

Substância	LogP	Volume molar (cm ³)	Solubilidade em água (mg/L)
P-cimeno	4.02	155.8±3.0	27.88
Mirceno	4.58	177.0±3.0	6.923

Os resultados indicaram que todas as formulações avaliadas apresentaram modelo de liberação de Korsmeyer-Peppas (Tabela 11). Observou-se que a Cim-NE apresentou um valor de k de 10,4, enquanto o Mir-NE apresentou um valor de k de 3,3. Um valor de K mais alto indica liberação mais rápida do fármaco, enquanto um valor de K mais baixo indica cinética de transporte mais lenta e, conseqüentemente, baixa liberação do fármaco a partir de nanocarreadores (WU et al., 2019).

Tabela 11 - Modelos matemáticos para a cinética de liberação de NETs (Cim-NE, Mir-NE) e terpenos livres (Cim-Sol e Mir-Sol)

Modelo	Cym-NE			Myr-NE			Myr-sol			Cym-Sol		
	K	R ²	n	k	R ²	n	k	R ²	n	K	R ²	n
Ordem zero	0,0008	0,6729		0	0,6317		0	0,857		0,0001	0,8946	
Primeira ordem	0,0191	0		0,0053	0		0,0017	0,7223		0,0069	0,881	
Higuchi	6,5154	0,6161		2,1477	0,6145		0,6424	0,8576		2,4783	0,8993	
Hixson-Crowel	0,0059	0		0,0017	0		0,0006	0,7195		0,0023	0,8729	
Korsmeyer-Peppas	10,465	0,8776	0,3005	3,3949	0,8419	0,3079	0,4836	0,8813	0,6152	1,5587	0,9534	0,6865

Além disso, tanto Cim-NE quanto Mir-NE demonstraram um valor de expoente de transporte (n) de 0,3, indicando um mecanismo de liberação impulsionado principalmente pela difusão Fickiana. Isso sugere que o processo de difusão governa a liberação desses terpenos nessas formulações (GAO et al., 2013b). Em contraste, os terpenos livres exibiram um valor de n de 0,6, sugerindo um mecanismo de transporte anômalo para a liberação do fármaco. Esse mecanismo envolve uma combinação de processos de difusão e dissolução para liberação de fármacos (MALEKJANI; JAFARI, 2021).

5.3 ATIVIDADE LARVICIDA DAS NANOEMULSÕES

O temefós (produto referência) apresentou alta atividade inseticida contra larvas de mosquitos suscetíveis, com CL_{50} e CL_{99} de 0,001 e 0,00177 mg/L, respectivamente (Tabela 12 e Figura 11).

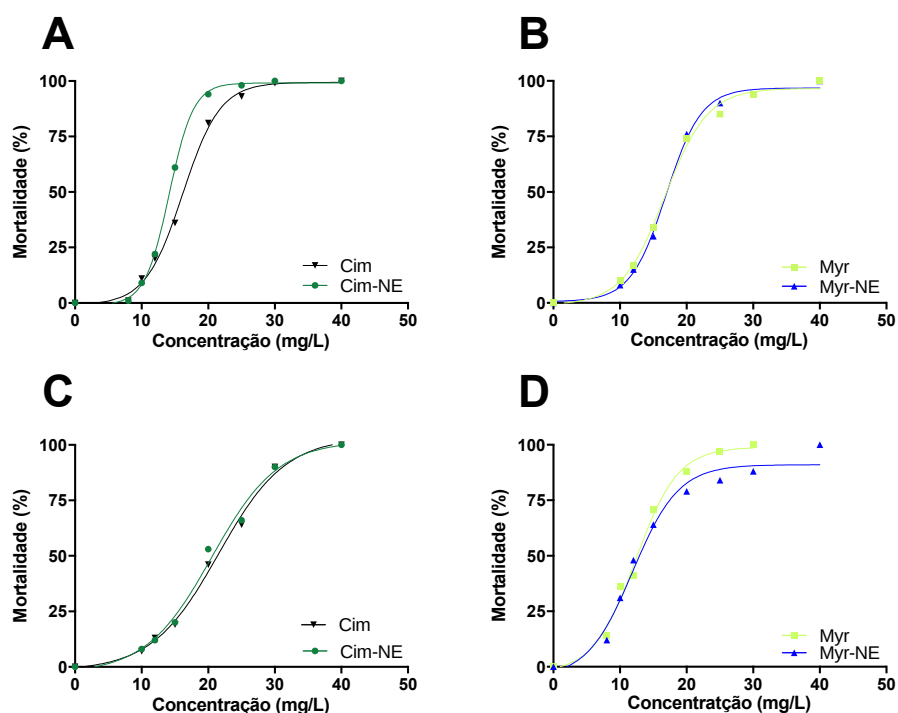
Por outro lado, o mirceno e o p-p-cimeno, apresentaram atividade larvicida moderada contra a cepa suscetível com valores de CL_{50} de 12,8 e 13,3 mg/L, respectivamente, e CL_{99} de 29,5 e 47,9 mg/L, respectivamente (Tabela 12).

Tabela 12 - Atividade larvica de monoterpenos livres e em nanoemulsões, contra *Ae. aegypti* L. (cepa Bora).

	n	χ^2	df	Valor de p	CL ₅₀ (95%CI)	CL ₉₉ (95%CI)
Temephos	3362	6.7	5	0.244	0.001 (0.00102-0.00108)	0.00177 (0.00168-0.00188)
Mirceno	3351	20	4	<0.001	12.8 (8.8-15.3)	29.5 (25.0-42.1)
Mir-NE	3352	44.7	5	<0.001	13.3 (7.1-17.8)	47.9 (36.9-79.9)
P-p-cimeno	3366	188.3	5	0.003	16.0 (14.8-17.0)	29.4 (26.5-34.3)
Cim-NE	3356	9.00	4	0.061	14.0 (13.4-14.7)	24.7 (22.6-27.8)

Curiosamente, o processo de nanoemulsificação não afetou significativamente a eficácia larvica dos monoterpenos, pois os valores de CL₅₀ e CL₉₉ de Mir-NE e Cim-NE não diferiram dos monoterpenos livres.

Figura 11 - Gráficos concentração-resposta de terpenos contra Larvas de *Ae aegypti*: A – Cepa de Bora com Cim e Cim-NE; B – Cepa Bora com Mir e Mir-NE; C – Cepa da Guiana com Cim e Cim-NE e D – Cepa da Guiana com Mir e Mir-NE



Os resultados demonstraram que a linhagem Guiana foi altamente resistente ao temefós com RR_{50} e RR_{99} de 124 e 253, respectivamente. Nossos achados não mostraram resistência cruzada da linhagem Guiana aos monoterpenos, com RR_{50} e RR_{95} variando de 0,83 (IC_{95%} 0,59 - 1,15) a 1,84 (1,34 - 2,52) (Tabela 13). Mais uma vez, não foram observadas diferenças significativas na eficácia entre os monoterpenos livres e as nanoemulsões contra *Ae. Aegypti*, sugerindo que o processo de nanoemulsificação não prejudica a atividade biológica do p-p-cimeno e do mirceno.

Tabela 13 - Atividade larvicida de monoterpenos, livres e em nanoemulsões contra *Aedes aegypti* resistente a inseticidas (cepa Guayana).

	n	χ^2	df	Valor de p	CL ₅₀ (95% IC)	CL ₉₉ (95% IC)	RR ₅₀ (95% IC)	RR ₉₅ (95% IC)
Temephos	2250	30.8	5	<0.001	0.150 (0.05-0.19)	0.450 (0.336-1.743)	124.44 (103.40-149.77)	253.03 (160.90 - 397.93)
Mir	2000	7.8	4	0.099	17.3 (15.0-19.0)	37.8 (33.4-46.2)	1.36 (1.22 - 1.53)	1.30 (1.035 - 1.64)
Mir-NE	2000	12.2	4	0.016	17.3 (14.9;19.0)	34.6 (30.3;43.8)	1.25 (1.07 - 1.47)	0.83 (0.59 - 1.15)
p-cimeno	2000	14.5	4	0.006	21.8 (18.8;23.9)	41.8 (35.7;58.9)	1.24 (1.07 - 1.54)	1.55 (1.05 - 2.29)
Cim-NE	2000	14.9	4	0.005	21.0 (18.0;23.0)	42.1 (35.8;58.3)	1.39 (1.20 - 1.60)	1.84 (1.34 - 2.52)

Nossos resultados mostraram que o mirceno e o p-p-cimeno apresentaram atividade inseticida moderada contra larvas de mosquitos quando comparados ao produto referência temefós. A menor eficácia dos terpenos contra mosquitos já foi relatada anteriormente (LEE; AHN, 2013; SANTOS et al., 2010). Por exemplo, Lee e Ahn (2013) relataram que o mirceno apresentou uma CL₅₀ de 36 mg/L, contra larvas de terceiro ínstar, que é, no entanto, maior do que a CL₅₀ relatada no presente estudo (LEE; AHN, 2013). Em outro estudo Lucia et al. (2017) relataram uma CL₅₀ menor (12,49 mg/L) para p-p-cimeno contra larvas de terceiro ínstar (LUCIA; ZERBA; MASUH, 2013).

Esses achados sugerem que a bioatividade desses compostos como agentes de controle de mosquitos varia de acordo com os estudos e vários fatores, como as

condições experimentais e as espécies de mosquitos, provavelmente influenciam os resultados. Embora as nanoemulsões apresentem atividade larvicida moderada, nossos resultados mostraram uma ausência de resistência cruzada com pesticidas comumente usados e isso oferece perspectivas interessantes no uso das formulações desenvolvidas como parte do manejo integrado de mosquitos.

A resistência está se tornando uma ameaça crescente ao controle de doenças transmitidas por mosquitos porque o número de classes de inseticidas com um modo de ação diferente dos grandes "quatro" (ou seja, piretroides, carbamatos, organofosforados, organoclorados) é estreito (CORBEL et al., 2017, 2019). Neste contexto, as nanoemulsões poderiam enriquecer o painel de produtos disponíveis para o controle vetorial e ser usados como parte do gerenciamento integrado de vetores.

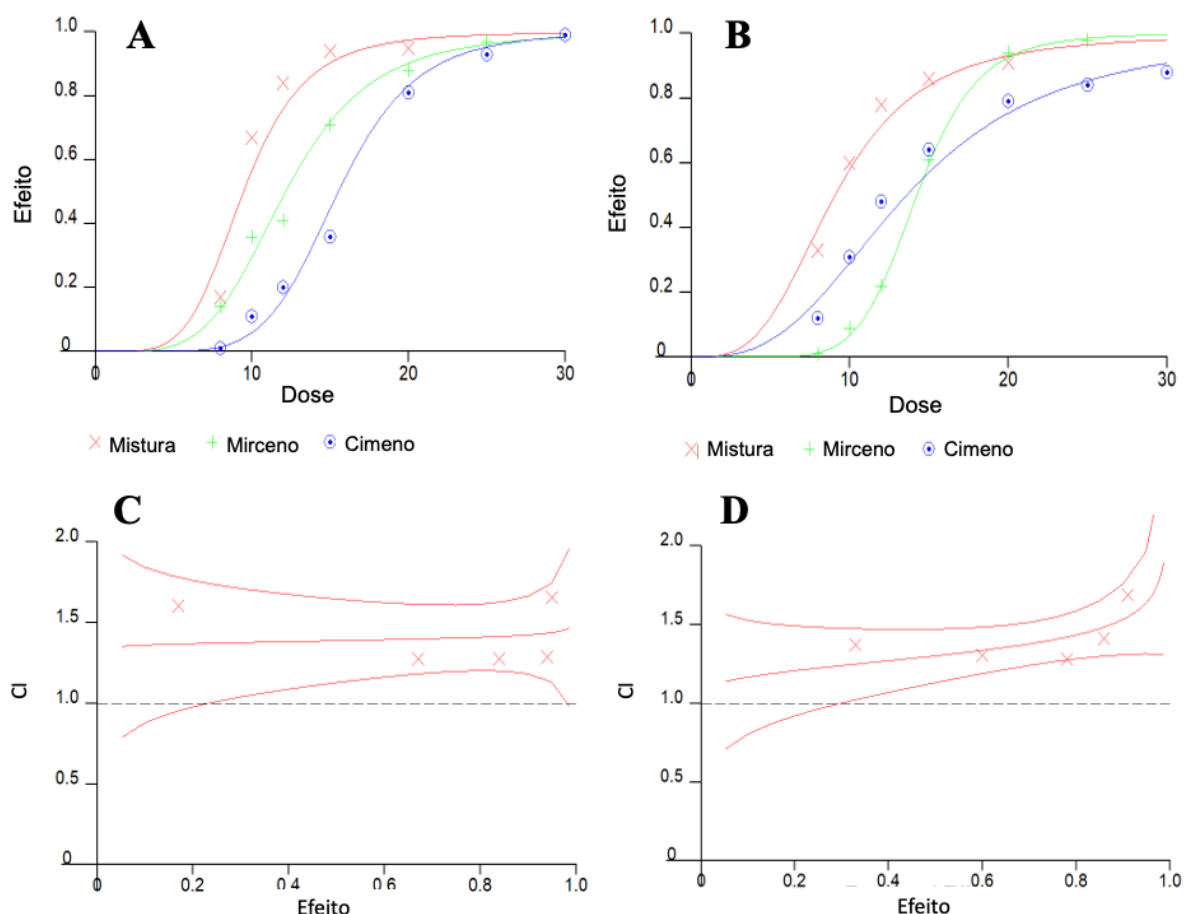
Nosso estudo também investigou a eficácia de terpenos livres *versus* nanoemulsões à base de terpenos contra as larvas dos mosquitos *Aedes aegypti*. Nossos resultados mostraram que as nanoemulsões não aumentaram a eficácia do mirceno e do p-p-cimeno contra larvas de mosquitos. Estes resultados contrastam com outros achados que mostram uma atividade inseticida aumentada de terpenos nanoemulsionados ou óleos essenciais em comparação com componentes não nanoemulsionados (ALMADIY; NENAAH, 2022b; FERREIRA et al., 2020). Por exemplo, os estudos de Almadiy e Nenaah (2022) e Ferreira et al (2020) utilizaram diferentes óleos essenciais e diferentes tamanhos de gotículas para suas nanoemulsões. Alamdy utilizou o *óleo essencial de Origanum vulgare*, enquanto Ferreira et al (2020) utilizaram o óleo essencial de *Siparuna guianensis*. Além disso, o tamanho de gotícula da nanoemulsão no estudo de Alamdy foi de 60 nm, enquanto Ferreira et al. (2020) relataram um tamanho de gotícula em torno de 160 nm. Essas diferenças na composição química do óleo essencial e nas características físico-químicas da nanoemulsão podem afetar a interação dos terpenos com as larvas do mosquito e podem explicar os diferentes resultados observados em nosso estudo em comparação com os de outros estudos.

5.3.1 Interações entre monoterpenos

Uma proporção de 1:1 (mirceno:p-p-cimeno) foi adotada para a combinação, considerando que ambos os terpenos apresentaram CL₅₀ semelhante contra

mosquitos suscetíveis e resistentes. Os gráficos concentração-resposta dos terpenos, isolados e em mistura, são mostrados na figura 12.

Figura 12 - Curvas de efeito das concentrações da combinação de A - Mirceno:p-p-cimeno (1:1) e B -Mir-NE:Cim-NE (1:1) e Curvas de interação entre C - Mirceno:p-p-cimeno (1:1) e D -Mir-NE:Cim-NE (1:1)



Nossos resultados mostraram que a combinação de terpenos não matou uma proporção maior de mosquitos do que a soma dos 2 terpenos tomados separadamente. Os índices de combinação (IC) variaram de 1 a 1,5, indicando antagonismo aditivo e até discreto em altas concentrações, respectivamente, de acordo com a classificação de CHOU; TALALAY, 1983 (CHOU; TALALAY, 1983) (Figure 12 C and D).

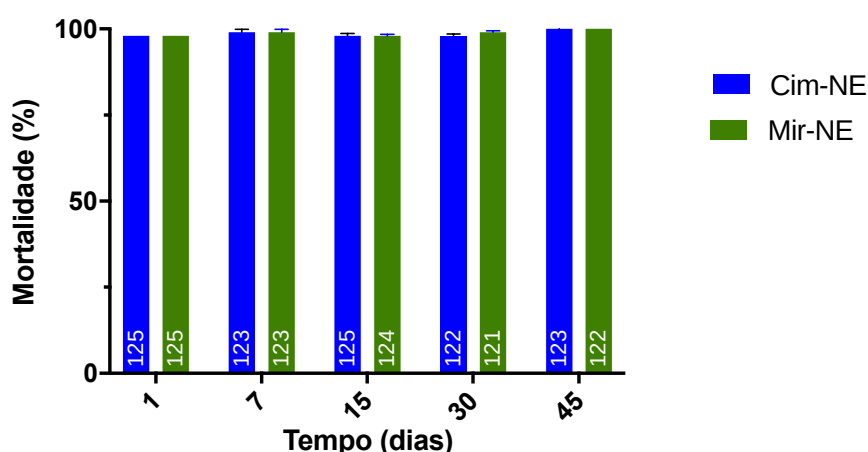
Nossa pesquisa também investigou se uma combinação de p-p-cimeno e mirceno poderia ser mais eficaz em matar mosquitos do que cada molécula usada isoladamente. O interesse em usar uma combinação de inseticidas resulta no fato de que pode ser possível alcançar um melhor controle da população de mosquitos,

reduzindo as doses de cada composto, tornando esta uma solução ecologicamente correta e econômica (DHINAKARAN; MATHEW; MUNUSAMY, 2019; PAVELA et al., 2018). Parece que a metodologia utilizada para avaliar a sinergia e as composições das combinações de terpenóides diferem entre os estudos e os resultados não podem ser diretamente comparados. Em nosso estudo, a falta de interações sinérgicas entre p-p-cimeno e mirceno pode ser explicada pelo fato de que ambos os terpenos provavelmente atuam nos mesmos sítios alvo (isto é, inibidores mutuamente exclusivos), causando inibição competitiva para o mesmo receptor, especialmente quando as concentrações aumentam (saturação do sistema). Novos estudos são necessários para entender melhor as interações e o modo de ação dos terpenóides em insetos.

5.3.2 Atividade larvícida residual

Os resultados mostraram que as nanoemulsões permanecem efetivas (proporcionando 100% de mortalidade) até 45 dias de armazenamento (Figura 13), sob condições controladas em laboratório de temperatura (27 °C) e umidade relativa (80%).

Figura 13 - Atividade residual de Cim-NE e Mir-NE contra larvas suscetíveis de *Ae. Aegypti*.



Isso sugere que o uso de nanoemulsões pode prevenir a volatilização de monoterpenos e proporcionar atividade de longa duração, como relatado anteriormente (MUSTAFA; HUSSEIN, 2020). No entanto, um viés de nosso estudo é que não foi possível comparar a atividade residual dos terpenos livres *versus* os terpenos encapsulados, devido à escassez de mosquitos. Além disso, é importante ressaltar que as condições laboratoriais nem sempre refletem a situação de campo, pois fatores externos como luz solar, chuva, poluentes etc. podem reduzir fortemente

a eficácia residual dos larvicidas (MARCOMBE et al., 2011). Mais investigações são necessárias para avaliar a longevidade de terpenos e NETs em condições de laboratório e campo simulado.

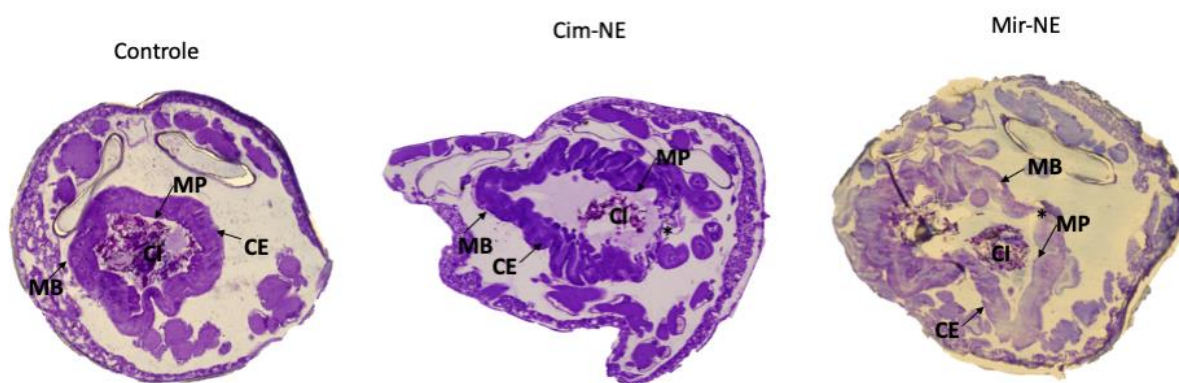
5.3.3 Análise histológica das larvas

A parede normal do intestino larval consiste em células epiteliais colunares e cilíndricas com um núcleo grande e grosseiramente granular que ocupa uma posição intermediária dentro das células (ALMEHMADI, 2010).

Uma das observações proeminentes em nosso estudo foi a notável alteração na conformação das células epiteliais que compõem o epitélio intestinal das larvas de *Aedes aegypti*. Essa mudança indica de maneira clara um efeito perturbador sobre a integridade do epitélio intestinal, um fenômeno que pode ter implicações cruciais na saúde e no desenvolvimento das larvas.

Ademais, foi também evidenciada uma desorganização marcante no epitélio intestinal das larvas após a exposição as NETs. Essa desorganização pode impactar diretamente a funcionalidade do epitélio, prejudicando a absorção de nutrientes e outros processos fisiológicos essenciais ao desenvolvimento das larvas (PERUMALSAMY et al., 2013).

Figura 14 - Fotomicrografias das larvas expostas ao controle negativo, Cim-NE e Mir-NE com destaque para o tubo digestivo no centro, aumento de 10x



CI – Conteúdo intestinal, CE – células epiteliais, MP – membrana peritrofica, MB – membrana basal, * - disrupção do epitélio intestinal.

Essas observações estão em perfeita concordância com a literatura que ressalta a importância crítica do epitélio intestinal como alvo para larvicidas de origem

natural. Estudos anteriores documentaram efeitos similares em larvas de mosquitos quando expostas a diversos compostos naturais, incluindo o extrato de *Melia azedarach* (AL-MEHMADI; AL-KHALAF, 2010), o monoterpene limoneno (OLIVEIRA et al., 2021) e niosomas contendo óleo essencial de neem (ASWIN JENO; NAKKEERAN, 2022).

As implicações práticas dessas observações são significativas. As alterações no epitélio intestinal das larvas após exposição à nanoemulsão contendo p-cimeno e mirceno indicam uma possível eficácia desses compostos como potenciais larvicidas. A perturbação na integridade do epitélio pode resultar em um impacto adverso na sobrevivência e no desenvolvimento das larvas, o que poderia ser explorado como uma estratégia eficaz de controle de mosquitos transmissores de doenças (PERUMALSAMY et al., 2013; YU et al., 2015). No entanto, é crucial ressaltar a necessidade de realizar estudos adicionais para compreender completamente os mecanismos envolvidos.

5.4 AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DAS NANOEMULSÕES

5.4.1 Citotoxicidade das NETs em queratinócitos humanos

A avaliação da biocompatibilidade em células humanas é importante e é uma das marcas registradas dos inseticidas botânicos (SPINOZZI et al., 2021). Nesse sentido, as formulações tiveram sua toxicidade avaliada na linhagem celular HaCAT (Tabela 14). O IC₅₀ dos terpenos livres foi menor que o IC₅₀ das nanoemulsões contendo monoterpeneos, sugerindo que a nanoemulsificação promove uma redução na citotoxicidade dos terpenos. É importante ressaltar que as soluções de tensoativo apresentaram os maiores valores de IC₅₀, o que pode indicar que a composição da nanoemulsão pode influenciar sua capacidade de diminuir a toxicidade do terpeno. Esses resultados estão de acordo com a literatura existente, que já mostrou que os monoterpeneos exercem baixa citotoxicidade para as células queratinócitos (CABRAL et al., 2012; RODRIGUES et al., 2019; XANTHIS et al., 2021).

Tabela 14 - Concentrações inibitórias 50 (IC₅₀) das NETs (Cim-NE, Mir-NE), terpenos livres (P-cimeno e Mirceno) e solução de tensoativos (Cim-Branco e Mir-Branco) em queratinócitos humanos.

	IC ₅₀ (mg/ml)
P-cimeno	6,43 ± 0,56
Mirceno	1,86 ± 0,15
Cim-Branco	16,98 ± 0,90

Mirceno-Branco	$22,37 \pm 0,32$
Cim-NE	$14,95 \pm 0,64$
Mir-NE	$2,37 \pm 0,33$

É importante destacar que, mesmo com uma inibição do crescimento celular, os excipientes utilizados na formulação estão dentro da concentração máxima recomendada pelo FDA (7% para spam 80 e 5% para Tween 20). (FDA/CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH, 2022).

5.4.2 Toxicidade aguda em zebrafish

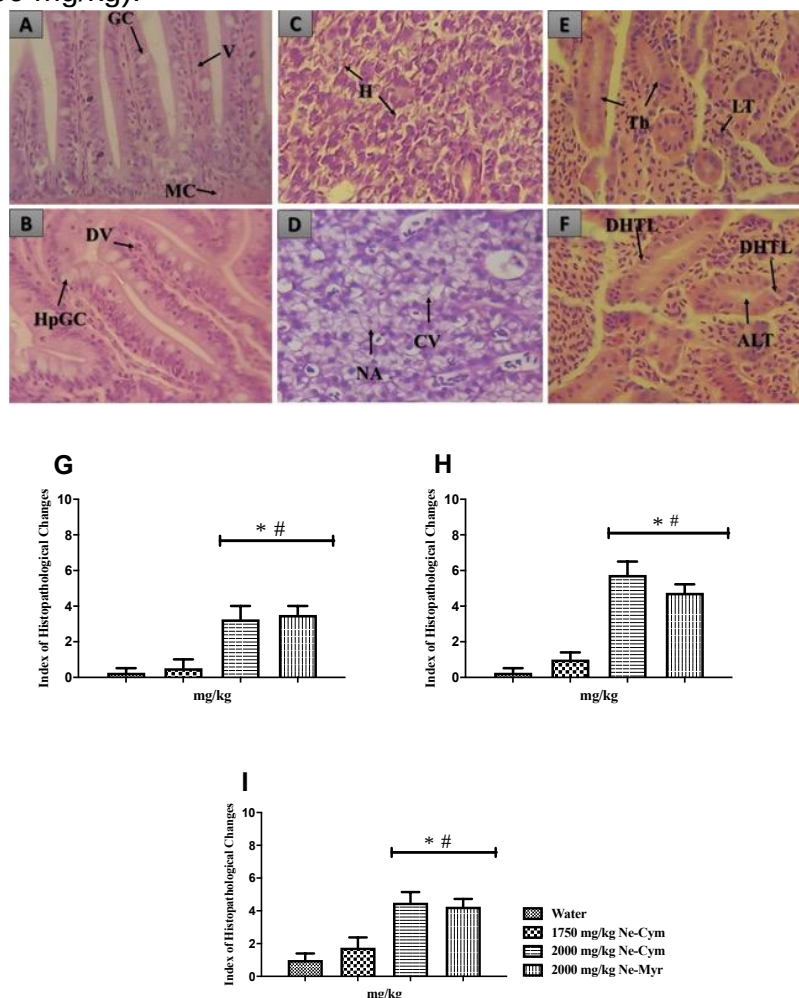
O tratamento do zebrafish com Cim-NE (1750 e 2000 mg/kg) e Mir-NE (2000 mg/kg) desencadeou mudanças comportamentais no zebrafish (Tabela 15). Entretanto, a mortalidade foi observada somente no grupo de animais tratados com a dose de 2000 mg/kg de Cim-NE. Os sinais de estresse foram aumento da atividade de natação, tremores na cauda, perda de postura e motilidade, natação circular, permanência no fundo do aquário e morte.

Tabela 15 - Efeito do tratamento oral com Cim-NE e Mir-NE e controle (água) sobre o comportamento e mortalidade de zebrafish.

Grupo	Doses	Estágio I	Estágio II	Estágio III	Total	%
Controle (água)	2µl	1/3	0/2	0/4	1/9	11.1
Cim-NE	1750 mg/kg	2/3	2/2	2/4	6/9	66.6
	2000 mg/kg	1/3	2/2	1/4	4/9	44.4
Mir-NE	2000 mg/kg	2/3	2/2	2/4	6/9	66.6

As principais alterações observadas na análise histológica foram: dilatação dos vasos presentes nas vilosidades e hipertrofia de células caliciformes no intestino, vacuolização citoplasmática e atipia nuclear nos hepatócitos, predomínio de alterações tubulares, como discreta degeneração hialina tubular nos rins (Figura 14). A CCI calculada foi menor que 10, o que classifica esses órgãos como normais, pois as alterações registradas não foram capazes de alterar o funcionamento normal dos órgãos.

Figura 15 - Secção histológica de intestino (A e B), fígado (C e D) e rins (E e F) de zebrafish, mostrando as principais alterações histopatológicas registradas. Índice de alteração histopatológica (IAH) no intestino (G), fígado (H) e rins (I) de Zebrafish (*Danio rerio*) adulto, no teste de toxicidade aguda oral com Ci-NE (1750 e 2000 mg/kg) e Mir-NE (2000 mg/kg).



GC: células caliciformes, V: vilosidades, MC: camada muscular, VD: degeneração vilosa e HpGC: hiperplasia das células caliciformes; H: hepatócitos normais, CV: vacuolização citoplasmática, NA: atrofia nuclear; Tb: túbulos, TL: tecido linfóide e ALT: aumento do lúmen tubular, DHTL: degeneração hialina tubular leve.

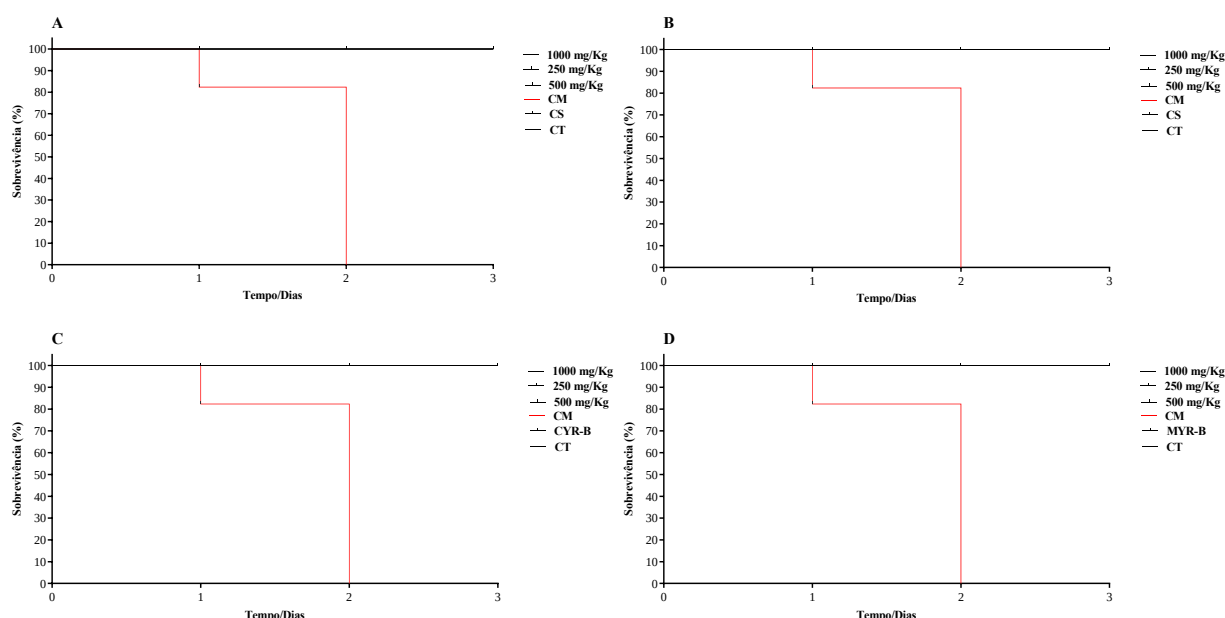
Nossos resultados mostraram que as NEs levaram a alterações comportamentais e histológicas no Zebrafish em altas concentrações. Essas alterações podem levar a alterações no peso corporal, consumo alimentar, comportamento, circulação sanguínea e funções reprodutivas (SOUSA et al., 2016). Everds et al. (2013) afirmam, no entanto, que em ensaios de toxicidade, é comum observar sinais de estresse em animais (EVERDS et al., 2013) e essas alterações histológicas são consideradas normais, não podendo alterar o funcionamento normal dos órgãos dos peixes (DE SOUZA et al., 2022; HOLANDA et al., 2022). Embora seja

improvável que o p-p-cimeno e o mirceno representem um perigo significativo para organismos não-alvo, há necessidade de avaliar sua toxicidade potencial em condições de campo simuladas usando doses operacionais (aplicação).

5.4.3 Toxicidade aguda das NEs contra as larvas de *Galleria mellonella*

A toxicidade aguda *in vivo* das NEs também foi avaliada em larvas de *G. mellonella*. Não foi observada mortalidade nas concentrações testadas, indicando que as NETs não apresentaram toxicidade aguda em *G. mellonella* (Figura 15). No entanto, irritação foi observada no dia 0, pois as larvas exibiram movimentos anormais, como saltos repetitivos, após a injeção dos NETs. Esse comportamento não foi constante e cessou após 10 min. No dia 1, as larvas tratadas com ambos os terpenos livres produziram uma teia de natureza oleosa/pegajosa, particularmente em concentrações mais elevadas e persistindo também no dia 2.

Figura 16 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de larvas de *G. mellonella* para os grupos analisados em diferentes concentrações. Legenda: (A): Cim, (B): Mir, (C): Cim-NE, (D): Mir-NE; CD: Controle de óbito (metanol 100%); SC: Controle de solventes (etanol 5%); C



A observação da não toxicidade de larvas de *G. mellonella* após a injeção das nanopartículas é consistente com estudos prévios (LOPES ROCHA CORREA et al., 2020; MARENA et al., 2022). Em geral, os resultados sugerem que os NEs não são tóxicos para as larvas nas concentrações testadas.

5.5 DOCKING MOLECULAR PARA O ALVO LARVICIDA ACETILCOLINESTERASE

No processo de planejamento de moléculas ativas, o método computacional de *docking* molecular é muito utilizado atualmente. Este método baseia-se na identificação do modo de interação das moléculas em estudo no sítio da enzima ou receptor através de interações-chave específicas e de predizer a afinidade de ligação entre os complexos proteína-ligante (GUPTA; MOHAN, 2014).

O valor de RMSD indica a precisão das poses de *docking* calculadas pelo algoritmo de encaixe do GOLD em comparação com as poses, determinadas experimentalmente, de um composto ligado a um alvo biológico, de modo que o RMSD menor que 2 Å para uma conformação de encaixe é considerada bem-sucedida, portanto, tem validade justificada (COLE et al., 2005). Nesta pesquisa, o melhor valor de RMSD obtido para o tacrine derivative 9-(3-iodobenzylamino)-1,2,3,4-tetrahydroacridine foi de 0.597Å para o alvo terapêutico 1QON.

Em seguida, realizou-se o *docking* entre as moléculas em estudo (Figura 16) e o alvo AChE. Foram selecionados os resultados de *docking* que apresentaram maior score (Tabela 16).

Tabela 16 - Interações proteína-ligante identificadas usando o Discovery Visualizer para a melhor solução de docking de cada composto estudado na AChE .

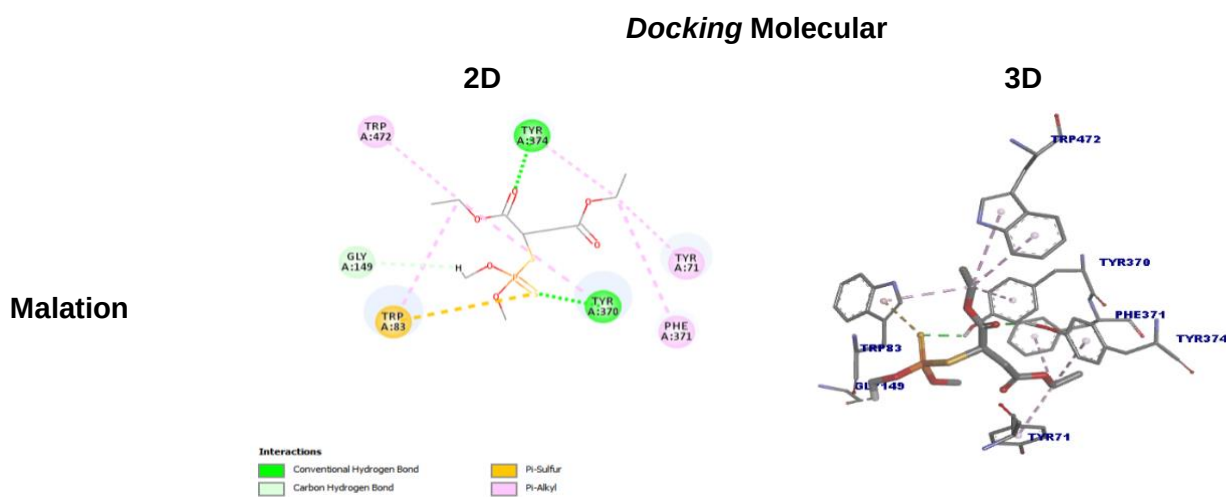
Ligante	Aminoácido	Interação	Score
Malation	TYR71	Hydrophobic	68,31
	TRP83	Hydrophobic	
	TYR370	Hydrophobic	
	PHE371	Hydrophobic	
	Tyr374	Hydrophobic	
	TRP472	Hydrophobic	
	HIS480	Hydrophobic	
	TYR370	Hidrogênio	
	TYR374	Hidrogênio	
	TRP83	Hydrophobic	
P-cimeno	TYR71	Hydrophobic	54,47
	TRP83	Hydrophobic	
	TYR370	Hydrophobic	
	TYR374	Hydrophobic	
Mirceno	TYR71	Hydrophobic	55,31
	TRP83	Hydrophobic	
	TYR370	Hydrophobic	
	PHE371	Hydrophobic	
	TYR374	Hydrophobic	

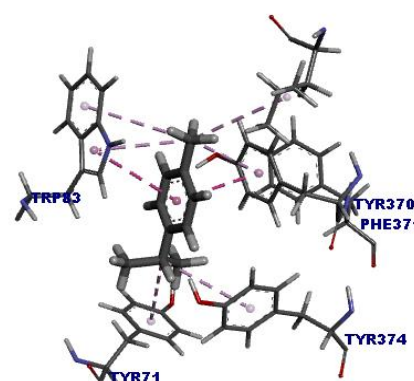
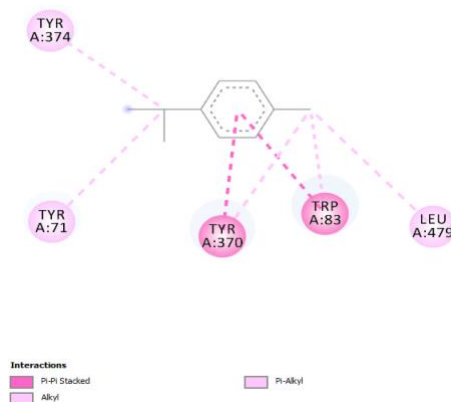
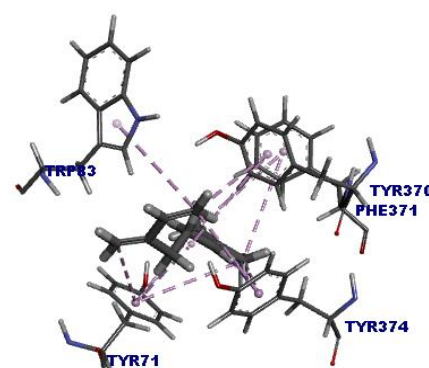
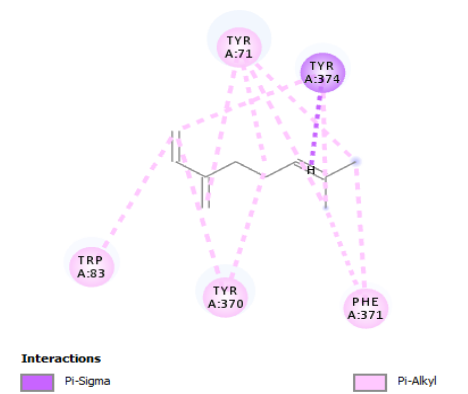
Para estudar a inibição do alvo em AChE, o composto malation, um inseticida inibidor de acetilcolinesterase, foi utilizado como padrão e apresentou score de 68.31. As moléculas P-cimeno e Mirceno apresentaram o valor de score inferior quando comparadas com a molécula padrão. Quanto às interações do tipo hidrofóbicas, pôde-se observar que a molécula de malation interagiu com os resíduos de aminoácidos TYR71, TYR370 e TYR374, assim como, as moléculas p-cimeno e mirceno interagiram com os mesmos aminoácidos, porém, foi observado que a molécula p-cimeno não apresentou interação com o aminoácido PHE371 que ocorreu entre o *docking* da molécula malation e mirceno.

Em relação às interações de hidrogênio, o composto de referência apresentou interação somente com os resíduos de aminoácidos TYR370 e TYR374, porém, as moléculas em estudo não apresentaram o mesmo tipo de interação com o alvo.

As moléculas p-cimeno e mirceno, assim como o composto referência, malation, não apresentaram qualquer tipo de interação, seja hidrofóbica ou ligação de hidrogênio com o resíduo de HIS480. Contudo, o malation apresentou interação do tipo Pi-Sulfur com o resíduo TRP83 (Figura 16 e Tabela 16).

Figura 17 - Docking molecular (Representações 2D e 3D) do alvo AChE (PDB ID: 1QON) e as moléculas selecionadas.



P-cimeno**Mirceno**

5.5.1 Predição de atividade

No PASS é possível identificar os possíveis efeitos biológicos de um composto baseado inteiramente em sua estrutura, usando vizinhança de átomos multiníveis (MNA) descritores, sugerindo que a atividade biológica é uma consequência de sua conformação química (POROIKOV et al., 2003).

A atividade biológica de um composto depende de sua estrutura, propriedades físico-químicas, entidade biológica (espécie, gênero etc.), dose e via de administração. Todo o complexo de atividades do composto causado na entidade biológica é chamado de espectro de atividade biológica da substância, que é definido como a propriedade intrínseca de um composto dependendo unicamente de sua estrutura e características físico-químicas (POROIKOV et al., 2003).

A probabilidade de Pa reflete a predição de similaridade da molécula em estudo com moléculas do conjunto de banco de dados, cujas atividades já são conhecidas experimentalmente. Portanto, não é uma característica direta da atividade, mas sim um parâmetro quantitativo das moléculas pertencentes ao

conjunto do banco de dados. Assim, quanto maior o valor de Pa em relação ao Pi, maior a probabilidade de a molécula em estudo mostrar atividade sobre o alvo biológico em questão. Essas características conferem confiabilidade ao PASS, mostrando-o como uma ferramenta com forte potencial em prever atividade biológica e descobrir novos fármacos (ANZALI et al., 2001). A Tabela 17 apresenta os valores de probabilidade de Pa.

Tabela 17 – Valores de probabilidade de Pa

Molécula	PASS	
	Pa	Pi
Malathion	0.504	0.004
P-cimeno	-	-
Mirceno	-	-

Assim como as outras avaliações, a predição no SEA foi feita em relação aos valores dados pela molécula malathion e as moléculas utilizadas no estudo. Nesse servidor, foi analisado o potencial que as moléculas apresentam ao interagir com o alvo selecionado (AChE). O critério que indica forte potencial de ligação é o valor do “MAX TC”, no qual quanto mais aproximado de 1, maior a tendência da molécula de se ligar ao alvo/receptor.

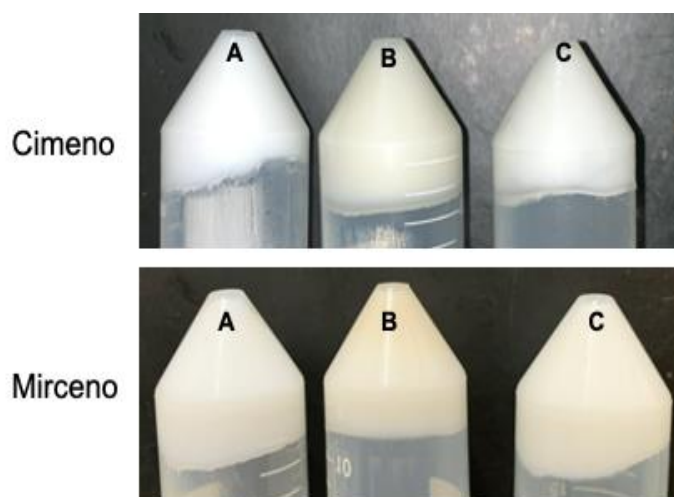
A partir da predição, verificou-se que apenas o malation apresentou provável atividade para acetilcolinesterase (Tabela 17). É importante destacar que a acetilcolinesterase é somente um alvo dentre tantos que um agente larvicida pode agir no *Ae. aegypti*.

5.6 HIDROGÉIS CONTENDO AS NES

De modo a permitir a aplicação das NES como formulação repelente frente o *Ae. aegypti* L foram desenvolvidos hidrogéis a partir das NES. Essa forma farmacêutica semissólida pode apresentar, de acordo com a composição polimérica, diversas características como biodegradabilidade, biocompatibilidade, hidrofiliabilidade, superabsorvência e viscoelasticidade, o que fazem deles interessantes para aplicação tópica (BASHIR et al., 2020). Foram feitas formulações com as NE de p-cimeno e mirceno obtendo uma concentração de terpenos de 500 mg/g de formulação. Os

polímeros gelificantes das NETs permitiram a obtenção de hidrogéis com excelentes características visuais. Os hidrogéis obtidos com Carbopol e carboximetilcelulose apresentaram coloração branca enquanto o hidrogel contendo quitosana apresentou coloração amarelada. Todos os hidrogéis apresentaram aspecto homogêneo e odor característico dos monoterpenos adicionados (Figura 17). Os hidrogéis foram submetidos à caracterização reológica, perfil mecânico (TPA) e bioadesão *ex vivo*.

Figura 18 - Aspecto visual dos hidrogéis contendo as NEs. A – Hidrogel de carbopol (3% p/p), hidrogel com quitosana (3% p/p) e hidrogel com carboximetilcelulose (3%).



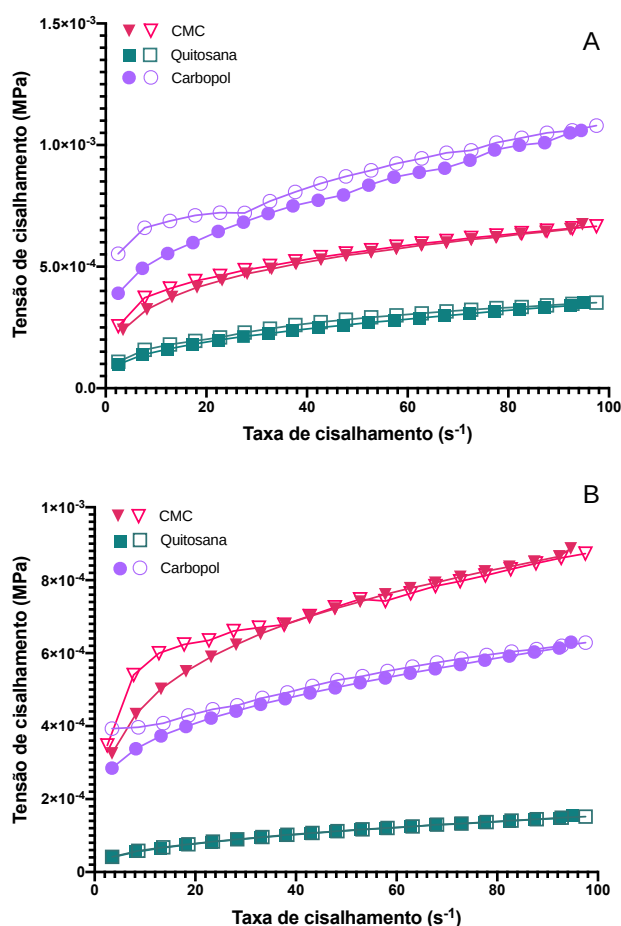
5.6.1 Reologia de fluxo

A reologia é um importante parâmetro na caracterização de formulações semissólidas pois ela fornece informações relevantes relacionadas e de comportamento dessas formulações semissólidas como aplicação e performance na pele (BABY, 2019). A reologia avalia características como viscosidade, fluxo, espalhabilidade e é uma ferramenta útil para prever propriedades físico-químicas, estabilidade e sensorial da formulação durante o armazenamento (DUARTE et al., 2020b). Como pode ser observado na Figura 18, os hidrogéis obtidos com quitosana foram as formulações que apresentaram a menor viscosidade (símbolo quadrado), não apresentando área de histerese, pois sua estrutura tridimensional interna é recuperada imediatamente após a aplicação de cisalhamento.

A tixotropia é a redução da viscosidade aparente de um fluido quando submetido a um aumento na taxa de cisalhamento, é uma condição reversível e dependente do tempo (SONEBI; YAHIA, 2020). A tixotropia acontece por conta da

desestruturação do sistema durante o cisalhamento, que no caso de hidrogéis ocorre o afrouxamento das cadeias poliméricas (curva ascendente). Quando a tensão de cisalhamento é removida, o processo inicial de recuperação da estrutura é lento (representado pela área de histerese entre as curvas ascendente e descendente), sendo necessário tempo para reestruturação das cadeias poliméricas, que atualmente estão em movimento browniano, dependendo do valor da tensão de cisalhamento aplicada (ORTAN et al., 2011). Esse comportamento foi observado para os hidrogéis feitos com carpobol e carboximetilcelulose (Figura 18). O comportamento de diminuição da viscosidade com a aplicação de cisalhamento é desejável para formulações de aplicação tópica uma vez que essa característica facilita a espalhabilidade e retirada do produto da embalagem primária (HERRADA-MANCHÓN; FERNÁNDEZ; AGUILAR, 2023).

Figura 19 - Reologia de fluxo dos Hidrogéis contendo as NETs. A – Hidrogéis contendo a Cim-NE, B – Hidrogéis contendo a Mir-NE. Símbolos não preenchidos: ida, símbolos preenchidos: volta.



O comportamento de fluxo, n , descreve a reologia do fluido, onde para fluidos Newtonianos $n = 1$ e $n \neq 1$ representa fluidos não newtonianos. Os valores dos índices

de fluxo indicam que, para o fluido Newtoniano, há uma relação linear entre a taxa de cisalhamento e a tensão de cisalhamento (ANSARI et al., 2020). À medida que o fluido se torna mais viscoso, o índice de consistência (k) aumenta; à medida que um fluido se torna menos viscoso, o " n " diminui. Quando " n " é 1, o fluido é Newtoniano. Se " n " for maior que 1, o fluido é classificado como dilatante (a viscosidade aparente aumenta à medida que a taxa de cisalhamento aumenta) (FONSECA-SANTOS et al., 2019). Se " n " estiver entre zero e 1, o fluido é classificado como pseudoplástico, exibindo afinamento por cisalhamento (isto é, a viscosidade aparente diminui à medida que a taxa de cisalhamento aumenta).

Todos os hidrogéis apresentaram o valor de $n < 1$, indicando que as formulações desenvolvidas possuem comportamento pseudoplástico. O parâmetro índice de consistência (k) fornece uma ideia da viscosidade do fluido (BJÖRN et al., 2012)

Tabela 18 - Índice de consistência (K) e Comportamento de fluxo (n) para os Hidrogéis contendo as NETs

Formulações	Índice de consistência (Pa.s)	Comportamento de fluxo (n)	R^2
C-carbopol	389,79	0,214	0,93
C-Quitosana	77,3	0,332	0,99
C-CMC	215,16	0,246	0,99
M-Carbopol	258,89	0,187	0,92
M-Quitosana	23,32	0,406	0,99
M-CMC	328,16	0,208	0,97

C – P-cimeno; M – Mirceno CMC – carboximetilcelulose.

No caso da formulação contendo p-cimeno, o hidrogel de carbopol apresentou o maior índice de consistência (389,79 Pa.s), seguido pelo de CMC (215,16) e, por último, o de quitosana (77,3 Pa.s) (Tabela 18). O carbopol é reconhecido por sua alta viscosidade e capacidade de formar hidrogéis densos, o que se reflete nos resultados. O hidrogel de CMC, embora tenha uma viscosidade considerável, ficou em segundo lugar, demonstrando sua capacidade de formar uma matriz reológica sólida. Por outro lado, o hidrogel de quitosana, apesar de ser um polímero bioadesivo, apresentou uma viscosidade mais baixa em comparação com os outros dois polímeros.

Para a formulação contendo mirceno, o hidrogel de CMC mostrou o maior índice de consistência (328,16 Pa.s), seguido pelo de carbopol (258,89 Pa.s) e, em terceiro

lugar, o de quitosana (23,32 Pa.s) (Tabela 18). Esses resultados refletem as propriedades reológicas dos polímeros. A CMC, devido à sua alta viscosidade, forma hidrogéis com características mecânicas mais sólidas. O carbopol, embora também seja viscoso, ficou em segundo lugar, mantendo sua capacidade de formar uma matriz reológica coesa. A quitosana, apesar de suas propriedades bioadesivas, apresentou uma viscosidade significativamente menor, o que pode estar relacionado à sua estrutura molecular.

A escolha do polímero desempenha um papel crítico na determinação das propriedades reológicas dos hidrogéis, afetando sua textura e capacidade de aderência à pele. Isso é importante na formulação de produtos tópicos, onde a viscosidade desempenha um papel fundamental na aplicação e na liberação controlada de ativos.

5.6.2 Reologia oscilatória

A reologia oscilatória é representada através dos módulos de armazenamento e de perda, também chamados de G' e G'' e fornecem informações a respeito da viscoelasticidade da formulação e de sua organização interna (DUARTE et al., 2020b). O módulo G' mede a energia de deformação armazenada durante o processo de cisalhamento da formulação enquanto o módulo G'' representa a energia dissipada durante o cisalhamento. Se $G'' > G'$, a amostra se comporta mais como um líquido viscoso enquanto, inversamente, quando $G' > G''$, a amostra se comporta mais como um sólido elástico (CALIXTO et al., 2018; FONSECA-SANTOS et al., 2019).

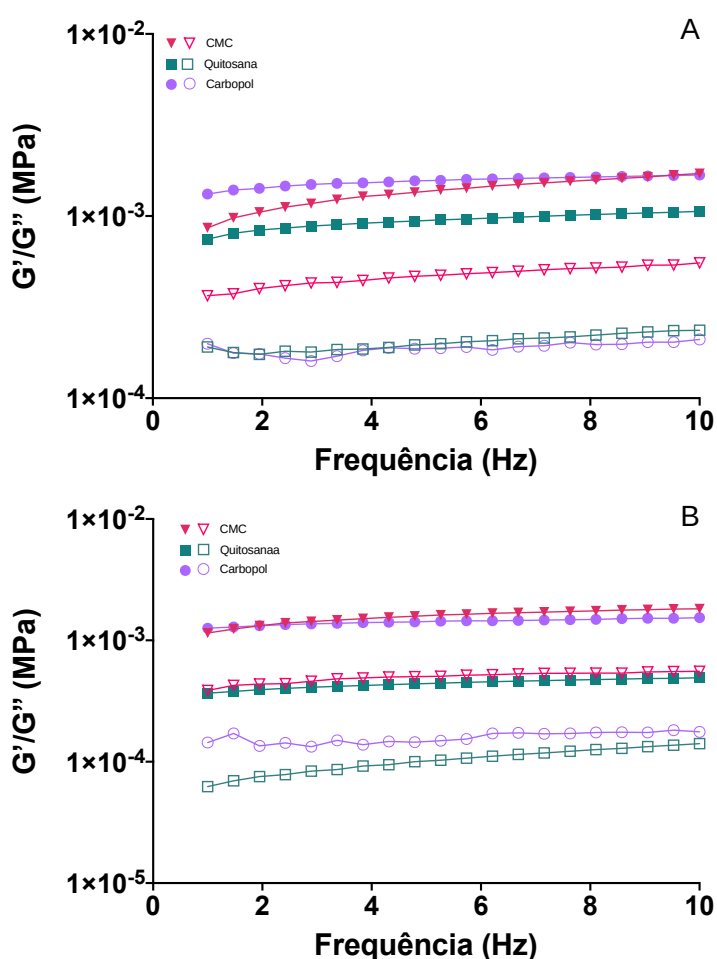
No caso dos hidrogéis com nanoemulsão de p-cimeno, aqueles formulados com carboximetilcelulose (CMC) apresentaram os maiores valores de G'' (módulo de perda), indicando uma capacidade de absorção de energia mais significativa sob carregamento oscilatório (Figura 19). Isso pode ser relacionado à alta viscosidade da CMC, que permite a formação de uma matriz mais viscosa. Essa característica pode ser vantajosa em aplicações tópicas, proporcionando uma experiência confortável na aplicação.

Em relação aos hidrogéis com carbopol, embora tenham valores de G'' ligeiramente inferiores em comparação com a CMC, eles ainda exibiram propriedades reológicas favoráveis. O carbopol é conhecido por formar matrizes com boa resistência mecânica e aderência à pele, o que é desejável em formulações tópicas. Os valores um pouco mais baixos de G'' indicam uma menor absorção de energia em comparação com a CMC, sugerindo que esses hidrogéis podem ser mais elásticos. Esse tipo de

comportamento majoritariamente elástico, é característico dos hidrogéis (PARENTE et al., 2015).

Os hidrogéis com quitosana apresentaram os menores valores de G'' entre os três polímeros. A quitosana é reconhecida por suas propriedades bioadesivas, mas os valores mais baixos de G'' podem indicar uma menor capacidade de absorção de energia sob carregamento oscilatório. Isso sugere que esses hidrogéis podem ser mais elásticos em comparação com a CMC e o carbopol.

Figura 20 - Reologia oscilatória dos Hidrogéis contendo as NETs. A – Hidrogéis contendo a Cim-NE e B – Hidrogéis contendo a Mir-NE. Símbolos preenchidos – G' e símbolos não preenchidos – G''



É importante notar que, em todos os casos, os hidrogéis exibiram valores de G' (módulo de armazenamento) maiores do que G'' , indicando que eles são predominantemente elásticos, o que é vantajoso em aplicações tópicas. Hidrogéis elásticos têm a capacidade de manter sua forma e aderir à pele de forma eficaz. A

literatura mostra que formulações com $G' > G''$ apresentam estruturas altamente organizadas (CALIXTO et al., 2018).

A escolha do polímero desempenha um papel crítico na determinação das propriedades reológicas dos hidrogéis, o que é fundamental para sua aplicação tópica na pele. Cada polímero possui características reológicas distintas que podem se adequar melhor a diferentes necessidades de aplicação, proporcionando uma experiência eficaz e confortável para o usuário. Os valores de G' e G'' fornecem informações valiosas sobre o comportamento mecânico dessas formulações, influenciando sua aplicabilidade em aplicações tópicas.

5.6.3 Perfil de textura dos hidrogéis

O perfil de textura tradicionalmente era usado na indústria de alimentos, mas atualmente tem sido empregado no desenvolvimento de produtos para aplicação farmacêutica e cosmética. O princípio do TPA consiste em deformar fisicamente uma amostra de teste de maneira controlada e medir sua resposta. Como resposta à deformação, pode-se obter características mecânicas da amostra, que estão relacionadas com os atributos sensoriais dessa amostra. Valores mais elevados de adesividade e coesão são adequados e desejáveis para formulações de aplicação tópica; por outro lado, valores moderados de compressibilidade (trabalho necessário para promover uma deformação) são preconizados, para facilitar a utilização pelo consumidor final (DUARTE et al., 2020b). A dureza consiste na força máxima necessária para causar uma deformação da amostra, a compressibilidade é o trabalho necessário para causar essa deformação, a aderência consiste no trabalho necessário para superar as forças de atração entre a sonda e as superfícies da amostra e, por último, a coesão é a razão entre as áreas de adesividade e compressibilidade (JONES; WOOLFSON; DJOKIC, 1996; RODERO et al., 2018).

Como mostrado na tabela 19 a formulação obtida com carbopol contendo a Cim-NE foi a que apresentou os maiores valores de dureza, compressibilidade, adesividade e coesão. Isso pode estar relacionado à alta viscosidade dessa formulação. Os hidrogéis contendo a Mir-NE apresentaram valores nos parâmetros mecânicos semelhantes entre os hidrogéis feitos com carbopol e os feitos com carboximetilcelulose.

Tabela 19 - Parâmetros mecânicos dos hidrogéis contendo as NETs

Formulação	Dureza (g)	Compressibilidade (g.sec)	Adesividade (g.sec)	Coesão
C-Carbopol	40,17 ± 3,50	290,70 ± 21,18	142,55 ± 29,78	217,99 ± 5,67
C-Quitosana	10,16 ± 1,34	70,31 ± 9,47	58,12 ± 7,78	58,59 ± 7,46
C-CMC	22,10 ± 2,17	153,78 ± 13,70	85,25 ± 5,86	106,63 ± 7,95
M-Carbopol	27,37 ± 0,79	203,96 ± 25,31	112,22 ± 12,86	152,70 ± 10,54
M-Quitosana	4,71 ± 0,17	29,19 ± 0,83	20,54 ± 0,80	24,51 ± 0,748
M-CMC	30,44 ± 2,16	205,06 ± 15,52	127,30 ± 9,75	151,47 ± 11,40

C – P-cimeno; M – Mirceno e CMC – carboximetilcelulose.

A análise dos dados indica que as propriedades mecânicas dos hidrogéis variaram significativamente com base na formulação, especialmente no que diz respeito à formulação contendo a nanoemulsão (NE) de p-cimeno e ao tipo de polímero utilizado. Os hidrogéis desenvolvidos com carbopol e contendo a Cim-NE demonstraram os maiores valores de dureza, compressibilidade, adesividade e coesão. Isso pode ser atribuído, em grande parte, à alta viscosidade dessa formulação, que é uma característica intrínseca do carbopol.

O carbopol é um polímero reticulado que é conhecido por conferir viscosidade e características reológicas distintas às formulações em que é incorporado. Quando associado à Cim-NE, ele parece formar uma matriz densa e elástica, resultando em uma formulação com propriedades mecânicas mais robustas. Essas propriedades podem ser desejáveis para aplicações tópicas, especialmente quando se busca uma formulação que adira bem à pele e permaneça no local de aplicação.

Por outro lado, os hidrogéis contendo a Mir-NE não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros mecânicos quando comparados entre os polímeros carbopol e carboximetilcelulose (CMC). Isso sugere que, no caso do mirceno, os polímeros tiveram um efeito menos pronunciado nas propriedades mecânicas da formulação. Pode ser que as características do mirceno, em combinação com a NE, resultem em uma matriz de hidrogel que não seja tão sensível às diferenças de polímero quanto no caso do p-cimeno.

No geral, essas observações ressaltam a importância de escolher cuidadosamente os polímeros e as formulações com base nas propriedades desejadas para uma aplicação específica. Os resultados indicam que o carbopol é uma escolha adequada quando se busca alta viscosidade e propriedades mecânicas fortes, enquanto o mirceno pode ser menos sensível à escolha do polímero em termos de propriedades

mecânicas. Essas descobertas têm implicações importantes no desenvolvimento de formulações de hidrogéis para aplicações farmacêuticas e cosméticas, onde as propriedades mecânicas desempenham um papel crucial na eficácia e na experiência do usuário.

5.6.4 Bioadesão *in vitro* dos hidrogéis

Para produtos destinados à aplicação tópica, a determinação da bioadesão é um parâmetro importante no desenvolvimento da formulação já que a adesividade é um fator importante para esse tipo de aplicação. As formulações que apresentaram menor trabalho de bioadesão foram as contendo quitosana. Isso se deu provavelmente por conta da quitosana possuir um grau de ionização menor em pH mais alto, possuindo uma menor carga positiva, o que pode explicar a menor interação desses hidrogéis com a pele, carregada negativamente (BARBOSA et al., 2019). Além do mais, a adição do polycarbophil à formulação pode ter neutralizado as cargas positivas da quitosana, diminuindo assim seu potencial de interação com a pele. A tabela 20 mostra as propriedades bioadesivas contendo as NEs.

Tabela 20 - Propriedades bioadesivas dos hidrogéis contendo as NETs.

Formulação	Força (N)	Trabalho de bioadesão (g.sec)
C-Carbopol	$0,057 \pm 0,06$	$27,72 \pm 1,87$
C-Quitosana	$0,02 \pm 0,003$	$6,06 \pm 1,39$
C-CMC	$0,04 \pm 0,005$	$31,73 \pm 2,54$
M-Carbopol	$0,04 \pm 0,005$	$17,56 \pm 4,10$
M-Quitosana	$0,015 \pm 0,005$	$7,75 \pm 0,18$
M-CMC	$0,06 \pm 0,003$	$39,64 \pm 2,01$

C – P-cimeno; M – Mirceno

Os hidrogéis obtidos com carbopol e carboximetilcelulose apresentaram os maiores trabalhos de bioadesão entre os hidrogéis desenvolvidos. O carbopol é um polímero derivado do ácido poliacrílico e que possui propriedades bioadesivas (PARENTE et al., 2015). A neutralização do carbopol durante o processo de fabricação do hidrogel leva à ionização dos grupos carboxílicos do polímero, levando a formação de

um gel bastante viscoso (BONACUCINA et al., 2006). Essa ionização pode levar a uma maior interação do hidrogel de carbopol com a pele, quando comparada ao hidrogel feito com quitosana.

A escolha do hidrogel de carboximetilcelulose (CMC) para prosseguimento dos estudos se baseou em diversas razões fundamentais. Primeiramente, a CMC se destacou por sua excepcional capacidade de bioadesão, que é uma propriedade altamente desejada quando se busca uma formulação que permaneça na superfície da pele por um período prolongado. Essa característica garante uma maior eficácia na liberação controlada dos terpenos nanoemulsionados, maximizando o tempo de contato com a pele e, portanto, a potencial atividade repelente. Além disso, a CMC contribui para a formação de uma matriz viscosa e altamente elástica, conferindo ao hidrogel uma consistência que é facilmente espalhável e agradável ao toque, tornando-o mais aceitável em termos de características sensoriais para os usuários finais.

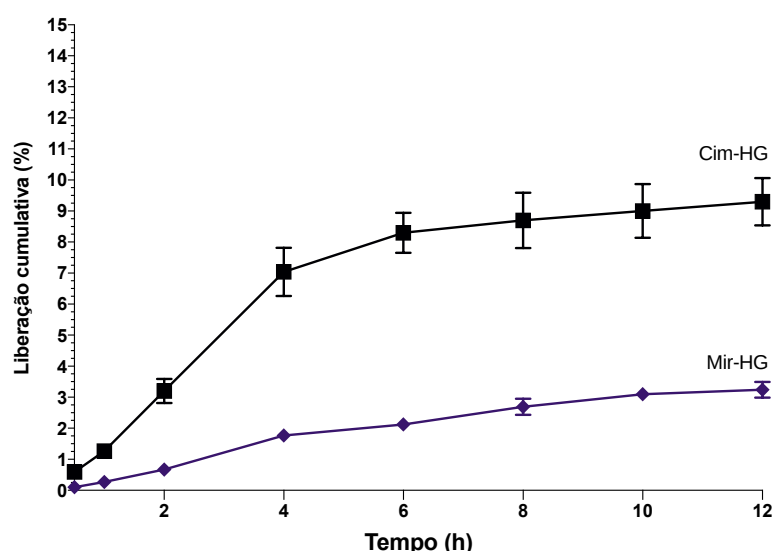
5.6.5 Ensaio de liberação *in vitro* dos hidrogéis

Os resultados indicaram que a liberação dos monoterpenos a partir dos hidrogéis constituídos por carboximetilcelulose foi significativamente menor em comparação com a liberação das nanoemulsões. Essa observação é consistente com estudos anteriores que relataram a capacidade das nanoemulsões de proporcionar uma liberação mais rápida e eficaz de compostos ativos quando comparadas a sistemas de liberação de fármacos baseados em hidrogéis (ALMEIDA et al., 2018; BATTAGLIA et al., 2022).

Após 30 minutos, o hidrogel contendo p-cimeno liberou apenas 0,59% do composto, enquanto o hidrogel com mirceno liberou somente 0,1% (Figura 20). Esses resultados sugerem que a liberação inicial dos monoterpenos dos hidrogéis é bastante limitada, indicando uma possível retenção dos compostos dentro da matriz do hidrogel. Isso pode ser atribuído à natureza altamente retentiva dos hidrogéis, que retêm os monoterpenos, liberando-os de forma gradual e controlada ao longo do tempo (ALMEIDA et al., 2018).

Após 12 horas, observou-se um aumento na quantidade liberada de ambos os monoterpenos dos hidrogéis, com o p-cimeno-hidrogel liberando 9,3% e o mirceno-hidrogel liberando 3,24%. Esse aumento ao longo do tempo é indicativo da natureza de liberação sustentada dos hidrogéis, que continuam a liberar os monoterpenos ao longo do período de observação.

Figura 21 – Perfil de liberação *in vitro* dos hidrogéis contendo as NETs.



Assim como observado nas nanoemulsões, também foi notada uma diferença na quantidade liberada entre o p-cimeno e o mirceno à partir dos hidrogéis. Essa variação pode ser atribuída às diferenças nas propriedades físico-químicas dos monoterpenos individuais, incluindo solubilidade e afinidade com a matriz do hidrogel.

Os resultados também indicam que a presença da carboximetilcelulose (CMC) nas nanoemulsões resultou em uma diminuição na quantidade de monoterpenos liberados. A presença de CMC pode resultar em uma matriz mais viscosa e estável, o que, por sua vez, pode diminuir a taxa de difusão dos monoterpenos através da fase aquosa (MORADI et al., 2022a).

Essa diminuição na liberação de monoterpenos pode ser explicada pela interação entre a CMC e os monoterpenos. A CMC pode formar uma rede tridimensional na fase aquosa, criando obstáculos para a difusão dos monoterpenos através dessa matriz. Além disso, a CMC pode adsorver-se à interface óleo-água das nanoemulsões, contribuindo para a estabilização da emulsão e, ao mesmo tempo, dificultando a liberação de ativos a partir dos hidrogéis (ARANCIBIA et al., 2016; SHARMA; TAILANG, 2020).

A literatura já relatou que polímeros semelhantes, com propriedades espessantes e estabilizadoras, podem afetar a liberação de ativos em sistemas coloidais (HU et al., 2021; KIM et al., 2020; MORADI et al., 2022b). Esses polímeros são frequentemente usados para controlar a liberação de compostos ativos em aplicações farmacêuticas e cosméticas, onde é desejada uma entrega controlada ao longo do tempo. A presença de CMC nas nanoemulsões, portanto, age como um fator determinante na taxa de liberação dos monoterpenos.

5.6.6 Permeação e retenção *in vitro*

Nossos resultados mostram os níveis de permeação dos monoterpenos (p-cimeno e mirceno) em diferentes formulações (terpeno livre, nanoemulsão e hidrogel) através de modelos de pele após 8 horas de exposição.

Após 8 horas de permeação, observou-se diferentes níveis de liberação dos monoterpenos nas formulações testadas. O p-cimeno livre mostrou uma liberação substancial, com $95,7 \pm 0,942 \mu\text{g/mL}$ (1,68%) detectados no meio de permeação. Por outro lado, a nanoemulsão demonstrou uma liberação ainda maior, com $136,7 \pm 9,2 \mu\text{g/mL}$ (2,27%) do p-cimeno alcançando o meio de permeação. No caso do mirceno, após 8 horas de permeação, a quantidade quantificada de mirceno livre foi de $2,14 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ (0,036%). Para a nanoemulsão de mirceno, observou-se uma quantidade ligeiramente maior permeada, $5,1 \pm 0,915 \mu\text{g/mL}$ (0,08%).

Esses resultados sugerem que a nanoemulsificação pode facilitar a liberação dos monoterpenos, possivelmente devido à sua capacidade de melhorar a solubilidade desses compostos em sistemas aquosos e devido ao tamanho diminuto das gotículas pode penetrar mais na pele, aumentando então a permeação quando comparada aos terpenos livres (BARRADAS et al., 2017; SONNEVILLE-AUBRUN; SIMONNET; L'ALLORET, 2004).

Quando se trata dos hidrogéis no caso do p-cimeno, a quantidade quantificada após 8 horas foi de $25,4 \pm 1,6 \mu\text{g/mL}$ (1,1%), enquanto para o mirceno, foi de $4 \pm 0,047 \mu\text{g/mL}$ (0,178%) na formulação de hidrogel.

A retenção significativa dos monoterpenos no estrato córneo, especialmente com o uso do hidrogel, é de particular relevância. A quantidade retida foi de $8,44 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$ (0,037%) para o terpeno livre e $71,8 \pm 2,5 \mu\text{g/mL}$ (0,8%) para o hidrogel de p-cimeno. Para o hidrogel contendo mirceno $11,7 \mu\text{g/mL}$ (0,139%) foram retidos para o monoterpeno livre e $4 \pm 0,047 \mu\text{g/mL}$ (0,178%) para o hidrogel. A retenção exclusiva dos monoterpenos no estrato córneo pode ser atribuído à capacidade intrínseca dos monoterpenos de interagir com os lipídios intercelulares do estrato córneo (CHEN et al., 2016).

Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que relatam uma baixa taxa de permeação cutânea para terpenos devido às suas propriedades lipofílicas, o que resulta em uma maior retenção na camada superficial da pele, o

estrato córneo (LI et al., 2022; LUCCA et al., 2015; PARISOTTO-PETERLE et al., 2020b).

Tabela 21 - Perfil de permeação e retenção cutânea *in vitro* dos monoterpenos livres, NETs e hidrogéis contendo as nanoemulsões após 8 horas de experimento

		P-cimeno			Mirceno		
	Unidade	Livre	NE	HG	Livre	NE	HG
Estrato córneo	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	$8,44 \pm 0,35$	ND	$71,8 \pm 2,5$	$0,57 \pm 0,01$	ND	$11,7 \pm 0,12$
	%	$0,037 \pm 0,017$	ND	$0,8 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,0004$	ND	$0,139 \pm 0,001$
Epiderme/ Derme	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	%	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Meio receptor	$\mu\text{g}/\text{ml}$	$95,7 \pm 0,942$	$136,7 \pm 9,2$	$25,4 \pm 1,6$	$2,14 \pm 0,2$	$5,1 \pm 0,915$	$4 \pm 0,047$
	%	$1,68 \pm 0,2$	$2,27 \pm 0,14$	$1,1 \pm 0,09$	$0,036 \pm 0,003$	$0,08 \pm 0,001$	$0,178 \pm 0,001$

ND – Não detectado

Considerando o uso desses monoterpenos em formulações repelentes, a capacidade dos hidrogéis de reter os compostos no estrato córneo da pele pode ser vista como uma vantagem. Isso significa que, mesmo que a permeação para camadas mais profundas seja limitada, a ação repelente pode ser mantida na superfície da pele, onde os insetos costumam fazer contato, sendo hidrogéis adequados para aplicações de tópicos, proporcionando uma ação mais prolongada na camada córnea da pele. Essa compreensão pode orientar o design e a formulação de repelentes mais eficazes, contribuindo assim para a proteção contra insetos transmissores de doenças.

5.7 ATIVIDADE REPELENTE

5.7.1 Ensaio de repelência espacial

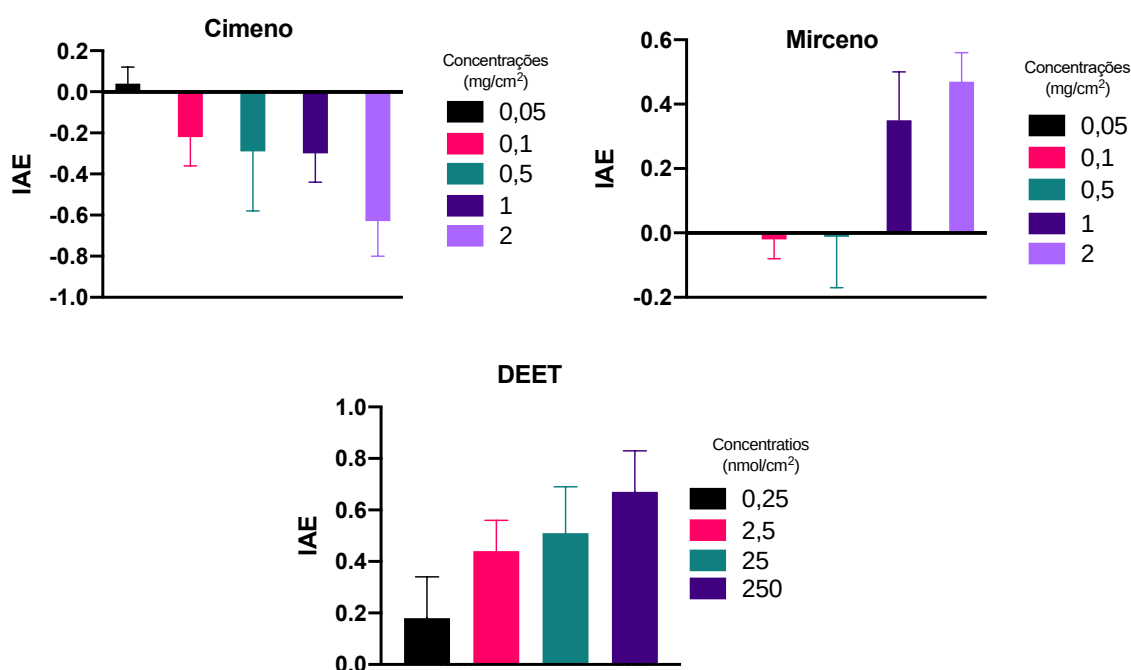
O índice de repelência espacial (IRE) para DEET e monoterpenos é mostrado na Figura 21. O DEET mostrou uma clara atividade repelente espacial dose-dependente. Na maior concentração testada ($250 \text{ nmol}/\text{cm}^2$), $23,5 \pm 3,7 \%$ dos mosquitos deslocaram-se da câmara transparente central para a câmara controle.

Nas duas maiores doses testadas (1 e $2 \text{ mg}/\text{cm}^2$), o mirceno apresentou resposta repelente, com $\text{IRE} > 0$. Na maior concentração, $48,8 \pm 7,4 \%$ dos mosquitos deslocaram-se da câmara clara para a câmara controle.

O p-cimeno apresentou aparente atratividade de mosquitos, com um $\text{SAI} < 0,60,5 \pm 7,2 \%$ dos mosquitos do sistema deslocados para a câmara tratada na concentração de $2 \text{ mg}/\text{cm}^2$. Embora não se tenha uma explicação para esses

resultados surpreendentes, suspeitamos de alguns vieses no experimento porque uma alta proporção de mosquitos foi encontrada derrubada a 2 mg/cm² (um mosquito KD não é capaz de voar). Mais trabalhos são necessários para entender o comportamento dos mosquitos após a exposição ao mirceno e p-cimeno.

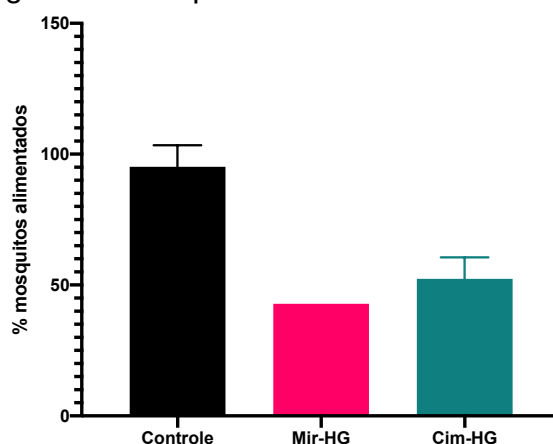
Figura 22 - Índice de repelência espacial de DEET e monoterpenos



5.7.2 Teste comportamental com o alimentador artificial

Neste teste, cada alimentador forneceu sangue heparinizado de coelho e os mosquitos foram expostos aos hidrogéis contendo as nanoemulsões de monoterpenos. No grupo controle, 95% dos mosquitos alimentaram-se do alimentador artificial (Figura 22) o que indica que não houve repelência.

No grupo tratado com hidrogel contendo mirceno, 57% dos mosquitos evitaram se alimentar da membrana sanguínea, enquanto no grupo tratado com o hidrogel contendo mirceno apenas 47% evitaram se alimentar. Em conjunto, esses resultados sugerem que as formulações apresentaram atividade repelente contra fêmeas de *mosquitos Ae. aegypti*.

Figura 23 – Porcentagem de mosquitos alimentados através do alimentador artificial

A literatura já demonstrou que ambos monoterpenos apresentam atividade repelente contra insetos. Choi et al (2002) demonstrou que o p-p-cimeno levou a uma repelência contra o mosquito *Culex quinquefasciatus* semelhante ao DEET (WON-SIK CHOI, 2002). Em outro estudo o mirceno exerceu uma pronunciada atividade repelente contra o coleóptera *Rhyzopertha dominica* (BEDINI et al., 2015). Um óleo essencial de *Siparuna guianensis* rico em mirceno apresentou resultados promissores como repelente do *Ae. aegypti* e do *C. quinquefasciatus*, apresentado uma atividade repelente superior ao DEET (AGUIAR et al., 2015). Esses resultados em conjunto demonstram o potencial dos hidrogéis desenvolvidos no nosso trabalho como potenciais repelentes contra o *Aedes aegypti*.

5.7.3 Docking molecular em possível alvo repelente

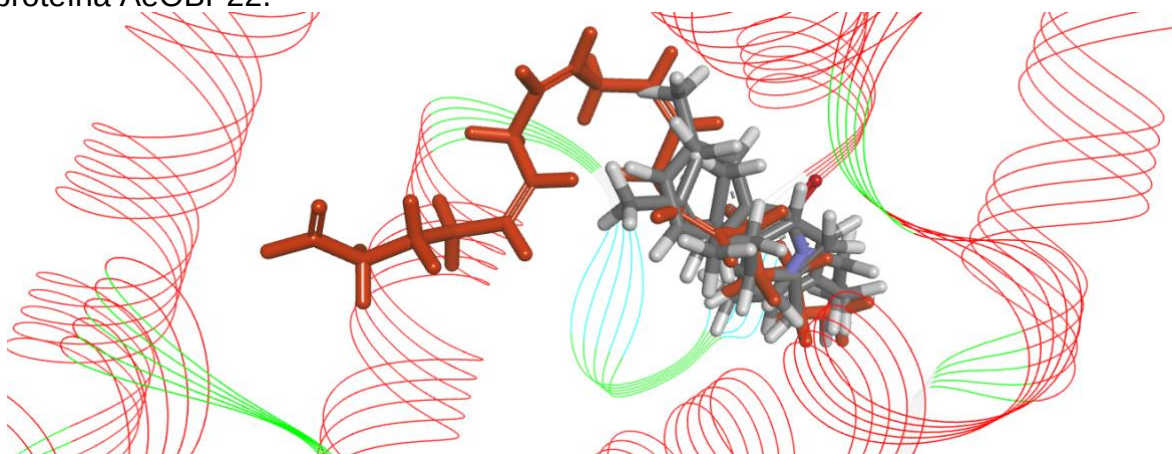
Comportamentos relacionados à reprodução, busca de hospedeiro e alimentação por mosquitos são mediados por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos. E um fator importante que medeia a sobrevivência dessas espécies é quanto a pista olfativa, que interfere em muitas expressões comportamentais dos insetos. De maneira simplificada, a percepção de semioquímicos voláteis pelos mosquitos é mediado por neurônios quimiossensoriais, presentes nas sensilas olfativas específicas, que se localizam especialmente nas antenas e papos maxilares. Com isso, essas substâncias, geralmente com características hidrofóbicas, entram em contato com essas regiões sensoriais, por meio de poros e passam pela linfa sensilar, no qual é caracterizada por apresentar concentrações elevadas de proteínas de ligação de odorantes (OBPs), que por sua vez, são responsáveis por solubilizar e

transportar essas moléculas odorantes da superfície cuticular porosa da sensila antenal até os receptores olfativos (YANG et al., 2011; ZAFAR et al., 2022).

A Proteína de ligação odorante 22 do *Aedes aegypti* (AeOBP22), é um dos membros da família dos OBPs, que é intrinsecamente relacionada com os padrões alimentares dos mosquitos da espécie, uma vez que é característica dos insetos hematófagos localizarem e selecionarem o local de picada por meio de estímulos quimiossensoriais (WANG et al., 2020). Com isso, diversos estudos estão sendo desenvolvidos justamente para a busca de propostas que possam provocar alteração no sistema olfativo dos insetos e com isso, a impedir a interação hospedeiro-inseto, visando assim o controle de diversas doenças que são transmitidas por esses vetores (TSITSANOU et al., 2012).

Diante disso, o estudo de *docking* foi aplicado para avaliar a interação do p-cimeno e mirceno, e comparar com o DEET, com o AeOBP22, para avaliar o potencial de repelência. Para tanto, o alvo (PDB: 6OII), foi validado por meio do valor do RMSD, que foi o de 1,038 Å. Esse parâmetro avalia a qualidade de interação entre o ligante e a proteína. Essa qualidade é determinada, por sua vez, pelo valor do RMSD, no qual quando menor que 2Å, indica que o programa identificou, com alta precisão, a correta orientação do ligante no sítio, validando que o método ocorreu de maneira correta (HEVENER et al., 2009). Para a identificação da região do sítio, foi dada pelo programa, as coordenadas de origem: x = 16.21; y = 22.96 e z = -1.94; em um raio de 13,1 Å (Figura 24).

Figura 24 - Posição das melhores poses dos ligantes (p-cimeno, mirceno e DEET) e do ligante cristalográfico (ácido araquidônico), destacado em laranja, no sítio da proteína AeOBP22.



Fonte: Autoria própria

Utilizou-se como molécula de referência para o estudo de docking, o composto DEET, que é um conhecido repelente químico sintético, visto sua capacidade de interagir com os receptores olfativos de diferentes insetos e interferir na sensibilidade sensorial, mas que devido sua natureza sintética pode trazer diversos riscos à saúde (KRISNAMURTI; RATIH; SARI, 2023; TSITSANOU et al., 2012).

Neste estudo, a simulação entre o DEET e a AeOBP22, apresentou um valor de 59.57 de goldscore, apresentando ao todo dez interações hidrofóbicas, das quais uma do tipo π - π stacked, sete do tipo alkyl e duas π -alkyl, envolvendo os resíduos de aminoácidos Phe108, Pro63, Leu68, Val85, Cys88, Leu72 e Ile116. As ligações π - π stacked ocorrem quando envolvem sistemas cíclicos (ordem sp^2), em que dois anéis aromáticos de diferentes ligantes interagem (CHEN; LI; LIU, 2018). Em relação às interações do tipo alkyl (mais prevalentes), ocorreram entre os grupos alquilas dos aminoácidos (Pro63, Leu68, Val85, Cys88, Val89, Leu72, Ile116) e o ligante DEET. As π -alkyl são caracterizadas pela interação entre a porção alquila de uma molécula com o anel aromático da outra, sendo observado entre Leu72 e Ile116 com a porção cíclica do DEET (Tabela 22 e Figura 25).

Tabela 22 - Interações e os tipos de interações realizadas entre os ligantes p-cimeno, mirceno, DEET e o alvo OBP22.

Ligante	Aminoácido	Átomo do ligante	Interação	Tipo	Distância	Score
DEET	PHE108	Ligand	Hydrophobic	Pi-pi Stacked	5.22	59.57
	PRO63	C1	Hydrophobic	Alkyl	4.43	
	LEU68	C1	Hydrophobic	Alkyl	4.86	
	VAL85	C1	Hydrophobic	Alkyl	4.49	
	CYS88	C1	Hydrophobic	Alkyl	4.74	
	VAL89	C1	Hydrophobic	Alkyl	4.71	
	LEU72	C14	Hydrophobic	Alkyl	4.20	
	ILE116	C14	Hydrophobic	Alkyl	4.26	
	LEU72	Ligand	Hydrophobic	Pi-Alkyl	5.33	
	ILE116	Ligand	Hydrophobic	Pi-Alkyl	4.22	
P-cimeno	LEU68	Ligand	Hydrophobic	Pi-Sigma	3.82	51.92
	PHE108	C1	Hydrophobic	Pi-Pi Stacked	4.84	
	LEU68	C10	Hydrophobic	Alkyl	5.36	
	PRO63	C10	Hydrophobic	Alkyl	4.62	
	LEU68	C10	Hydrophobic	Alkyl	4.95	
	VAL85	C10	Hydrophobic	Alkyl	4.33	
	CYS88	C10	Hydrophobic	Alkyl	4.57	

	VAL89	C10	Hydrophobic	Alkyl	4.67	
	PHE51	C1	Hydrophobic	Pi-alkyl	4.80	
	PHE108	C1	Hydrophobic	Pi-alkyl	5.18	
	VAL85	Ligand	Hydrophobic	Pi-alkyl	5.27	
	ILE116	C6	Hydrophobic	Alkyl	3.90	
	LEU72	C7	Hydrophobic	Alkyl	4.64	
	ILE116	C7	Hydrophobic	Alkyl	3.82	
	LEU68	C9	Hydrophobic	Alkyl	4.32	
	VAL85	C10	Hydrophobic	Alkyl	4.05	
	PRO63	C10	Hydrophobic	Alkyl	4.18	
	LEU68	C10	Hydrophobic	Alkyl	5.29	
Mirceno	VAL85	C10	Hydrophobic	Alkyl	5.19	52.55
	CYS88	C10	Hydrophobic	Alkyl	4.68	
	VAL89	C10	Hydrophobic	Alkyl	4.80	
	PHE51	Ligand	Hydrophobic	Pi-alkyl	5.09	
	PHE51	C6	Hydrophobic	Pi-alkyl	4.62	
	PHE105	C6	Hydrophobic	Pi-alkyl	4.71	
	PHE108	Ligand	Hydrophobic	Pi-alkyl	4.88	
	PHE108	C9	Hydrophobic	Pi-alkyl	3.95	

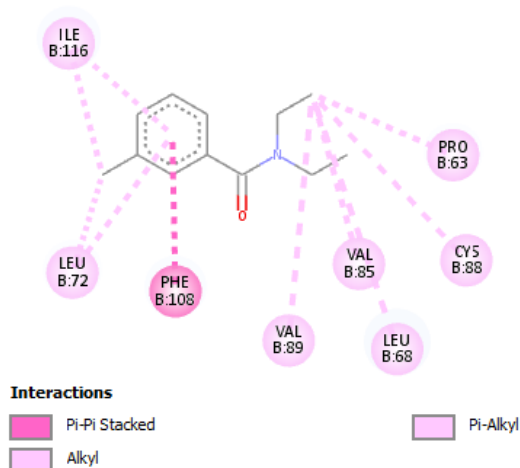
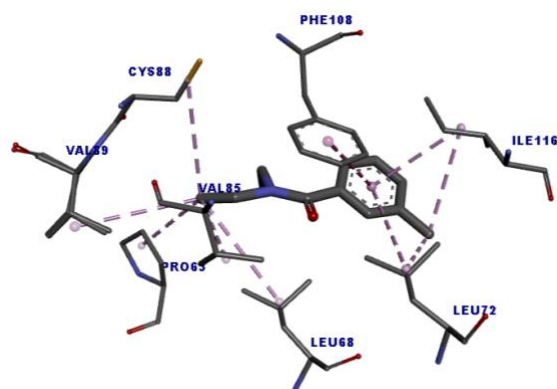
Fonte: Autoria própria

Quando comparado com a molécula de referência, a simulação do docking do p-cimeno, pode-se observar que ocorreu uma interação a mais (total de onze), das quais todas foram também interações hidrofóbicas, sendo uma do tipo π -sigma (Leu68), que envolve interações de ordem sp^2 , uma π - π Stacked (Phe108), três do tipo π -alkyl (Phe51, Phe108 e Val85) e o restante todas alkyl, envolvendo os resíduos Leu68, Pro63, Val85 e Cys88. No entanto, a afinidade do p-cimeno pelo alvo foi um pouco menor que o DEET, pois a simulação apresentou um score de 51.92.

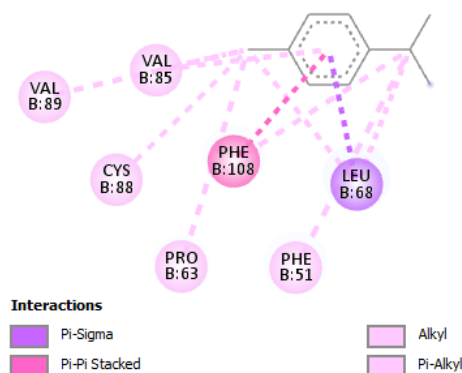
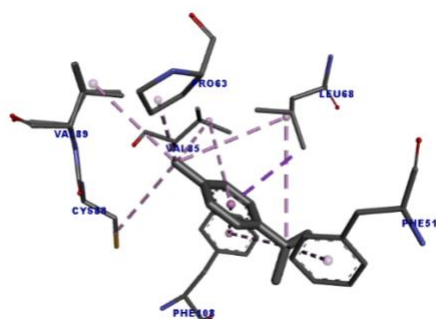
Já em relação à última molécula testada, mirceno, foi a que mais apresentou interações, com o total de quinze, com os aminoácidos Ile116, Leu72, Leu68, Val85, Pro63, Cys88, Phe51, Phe105 e Phe108. Assim como nas outras simulações, todas foram interações hidrofóbicas, nas quais dez do tipo alkyl e cinco π -alkyl. Apresentou um goldscore um pouco superior ao p-cimeno (52.55), mas que ainda permaneceu inferior ao DEET, indicando que este último apresenta um pouco mais de afinidade ao alvo. Entretanto, é importante ressaltar inclusive, que a diferenças entre os valores não é tão discrepante.

Figura 25 - Simulação do docking molecular do DEET, p-cimeno mirceno no alvo AeOBP22, nas dimensões 2D e 3D.

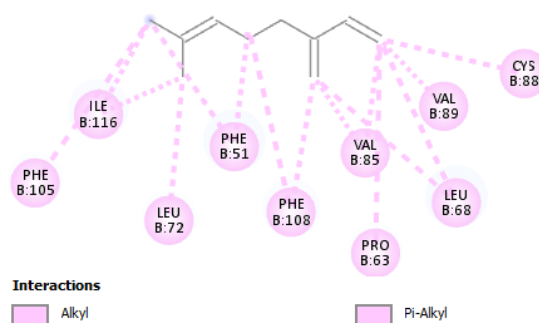
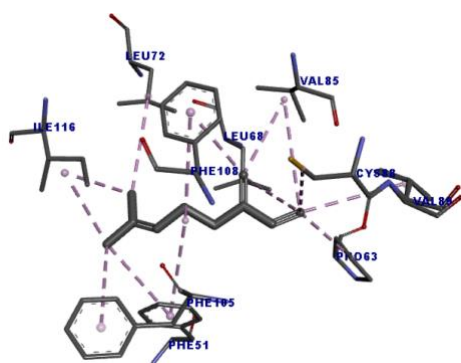
DEET



P-cimeno



Mirceno



As interações intermoleculares do tipo alkyl e π -alkyl estão representadas pela cor rosa claro; as do tipo π - π stacked pela cor rosa escuro; e a π -sigma pela cor roxa.

Fonte: Autoria própria

O estudo desenvolvido por (ADHIKARI et al., 2022) teve como finalidade de avaliar a atividade de repelência de dois constituintes de óleos essenciais derivados de frutas cítricas, o citral e limoneno contra o *Aedes aegypti*. Em uma das etapas do estudo, foi realizada a simulação do docking, em três alvos, OBP21, OBP22 e AChE, para verificar quais e os tipos de interações entre os compostos citral, limoneno e DEET (molécula de referência) e os referidos receptores. Foi constatado que todos os ligantes apresentaram interações em comum no alvo OBP22, com três aminoácidos, Leu11, Ile116 e Phe37, indicando que estes são resíduos chave para a interação, encontrados no sítio ativo.

Nesse sentido, de acordo com os resultados apresentados, foi possível detectar uma das interações com um aminoácido importante, a Ile116, que foi constatado no docking do DEET e mirceno. Isto, por sua vez, indica que o mirceno possui maior potencial de ação, visto sua maior afinidade com o alvo, quando comparado ao p-cimeno, por ter interagido com um aminoácido importante, além de apresentar um número de interações maior. No entanto, não exclui as possíveis atividades de repelência do p-cimeno, uma vez que apresentou padrão semelhante, no estudo de docking, ao DEET.

6 CONCLUSÕES

Esta tese representa um marco significativo no campo da pesquisa de monoterpenos para o controle de *Aedes aegypti*, um vetor de doenças transmitidas por mosquitos de importância global. Nossos estudos se concentraram em vários aspectos, desde o desenvolvimento de métodos analíticos até a avaliação do potencial de formulações de nanoemulsões e hidrogéis, além de investigações sobre a atividade repelente e tóxica dos monoterpenos p-cimeno e mirceno.

Em primeiro lugar, desenvolveu-se um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que demonstrou ser linear, preciso, exato, seletivo e robusto para a quantificação precisa dos monoterpenos p-cimeno e mirceno. Isso estabeleceu uma base sólida para a análise desses compostos em nossos estudos subsequentes.

Além disso, determinou-se o Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) necessário para ambos os monoterpenos, p-cimeno e mirceno, utilizando o par de tensoativos Tween 20 e Span 80. Essa informação foi fundamental para o desenvolvimento das nanoemulsões.

As nanoemulsões obtidas foram altamente promissoras, com tamanho de gotícula em torno de 100 nm e estabilidade mantida por 60 dias, conforme confirmado por técnicas de análise de tamanho de gotícula (DLS) e análise por rastreamento de nanopartículas (NTA). A liberação controlada e sustentada dos monoterpenos a partir dessas nanoemulsões por um período de 24 horas é uma característica crucial para aplicações de controle de mosquitos.

A avaliação da citocompatibilidade em queratinócitos humanos e a ausência de toxicidade aguda contra larvas de *Galleria* e Zebrafish demonstraram a segurança dessas formulações, um fator fundamental quando se trata de produtos para controle de vetores.

Além disso, as nanoemulsões apresentaram eficácia larvicida tanto em cepas suscetíveis quanto resistentes de *Ae. aegypti*, embora em doses mais elevadas em comparação com o temephos, um inseticida organofosforado recomendado pela OMS para o controle de *Aedes*.

A ausência de resistência cruzada entre terpenóides e temephos e a falta de interações positivas entre o mirceno e o p-cimeno na toxicidade larval indicam a viabilidade desses compostos como ferramentas adicionais no controle de mosquitos. As nanoemulsões mostraram atividade larvicida após 45 dias de armazenamento, o que sugere sua eficácia na prevenção da volatilização dos monoterpenos.

A partir das nanoemulsões, desenvolveu-se com sucesso hidrogéis com propriedades reológicas e mecânicas adequadas para aplicação tópica, bem como propriedades bioadesivas em pele de orelha suína *ex vivo*. Os hidrogéis também exibiram baixas taxas de liberação e permeação, o que é desejável para formulações repelentes.

Além disso, observou-se que o mirceno apresentou uma atividade repelente espacial semelhante à do DEET, enquanto o p-p-cimeno exerceu um efeito atrativo nos mosquitos, um achado que requer investigações adicionais. Finalmente, através de estudos de docking molecular, confirmou-se a atividade repelente dos hidrogéis, semelhante à do DEET.

Em resumo, esta pesquisa abre caminho para o desenvolvimento de formulações baseadas em monoterpenos para o controle eficaz de *Aedes aegypti*, um vetor de doenças de grande relevância em saúde pública. As nanoemulsões e hidrogéis apresentaram uma série de propriedades e atividades promissoras, destacando seu potencial como ferramentas complementares no combate a doenças transmitidas por mosquitos. As descobertas desta tese contribuem para o avanço da pesquisa em controle de vetores e representam um passo importante na busca por estratégias mais seguras e eficazes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, F. R. et al. Ecotoxicity and Environmental Risk Assessment of Larvicides Used in the Control of *Aedes aegypti* to *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 77, n. 1–3, p. 37–45, 20 fev. 2014.
- ADHIKARI, K. et al. Repellent Activity of Citrus Essential Oils and Two Constituent Compounds Against *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences**, v. 92, n. 3, p. 621–628, 2022.
- AGUIAR, R. W. S. et al. Insecticidal and Repellent Activity of *Siparuna guianensis* Aubl. (Negrámina) against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0116765, 3 fev. 2015.
- ALLEGRA, E. et al. *Galleria mellonella* larvae allow the discrimination of toxic and non-toxic chemicals. **Chemosphere**, v. 198, p. 469–472, 1 maio 2018.
- ALMADIY, A. A.; NENAAH, G. E. Essential oil of *Origanum vulgare*, its nanoemulsion and bioactive monoterpenes as eco-friendly novel green pesticides for controlling *Aedes aegypti*, the common vector of Dengue virus. **Journal of Essential Oil Research**, v. 34, n. 5, p. 424–438, 2022a.
- ALMADIY, A. A.; NENAAH, G. E. Essential oil of *Origanum vulgare*, its nanoemulsion and bioactive monoterpenes as eco-friendly novel green pesticides for controlling *Aedes aegypti*, the common vector of Dengue virus. **Journal of Essential Oil Research**, v. 34, n. 5, p. 424–438, 3 set. 2022b.
- ALMEHMADI, R. M. Larvicidal, Histopathological and Ultra-structure Studies of *Matricharia chamomella* Extracts Against the Rift Valley Fever Mosquito *Culex*

- quinquefasciatus (Culicidae: Diptera). **Journal of Entomology**, v. 8, n. 1, p. 63–72, 15 dez. 2010.
- AL-MEHMADI, R. M.; AL-KHALAF, A. A. Larvicidal and histological effects of Melia azedarach extract on Culex quinquefasciatus Say larvae (Diptera: Culicidae). **Journal of King Saud University - Science**, v. 22, n. 2, p. 77–85, abr. 2010.
- ALMEIDA, K. B. et al. In vitro release and anti-herpetic activity of Cymbopogon citratus volatile oil-loaded nanogel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, p. 495–502, 2018.
- AMELIA-YAP, Z. H. et al. Pyrethroid resistance in the dengue vector Aedes aegypti in Southeast Asia: present situation and prospects for management. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 332, 4 dez. 2018.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION (AVMA). **Guidelines for the euthanasia of animals**. 2020. ed. Schaumburg: [s.n.].
- 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, n. 11, p. 1–15, 1 nov. 2020.
- ANZALI, S. et al. Discriminating between Drugs and Nondrugs by Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 15, p. 2432–2437, jul. 2001.
- AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis**. Disponível em: <<https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis/>>. Acesso em: 23 set. 2023.
- ARANCIBIA, C. et al. Application of CMC as thickener on nanoemulsions based on olive oil: Physical properties and stability. **International Journal of Polymer Science**, v. 2016, 2016.
- ARUNACHALAM, N. et al. Community-based control of Aedes aegypti by adoption of eco-health methods in Chennai City, India. <https://doi.org/10.1179/2047773212Y.0000000056>, v. 106, n. 8, p. 488–496, dez. 2013.
- ASWIN JENO, J. G.; NAKKEERAN, E. Histological changes in the Dengue vector, Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) larvae treated with neem oil loaded niosomes. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 25, n. 3, p. 101943, set. 2022.
- AZEVEDO, R. DO S. DA S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. DA C. Chikungunya risk for Brazil. **Revista de Saude Publica**, v. 49, 2015.
- BABY, D. K. **Rheology of hydrogels**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.
- BÄCK, A. T.; LUNDKVIST, Å. Dengue viruses – an overview. <http://dx.doi.org/10.3402/iee.v3i0.19839>, v. 3, n. 1, p. 19839, jan. 2013.
- BADOLO, A. et al. Insecticide resistance levels and mechanisms in Aedes aegypti populations in and around Ouagadougou, Burkina Faso. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007439, 23 maio 2019.
- BALAHBIB, A. et al. Health beneficial and pharmacological properties of p-cymene. **Food and Chemical Toxicology**, v. 153, p. 112259, 1 jul. 2021.
- BALASUBRAMANI, S. et al. Development of nanoemulsion from Vitex negundo L. essential oil and their efficacy of antioxidant, antimicrobial and larvicidal activities (Aedes aegypti L.). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 17, p. 15125–15133, 2017.
- BARBOSA, J. A. C. et al. Using zeta potential to study the ionisation behaviour of polymers employed in modified-release dosage forms and estimating their pKa. **International Journal of Pharmaceutics: X**, v. 1, p. 100024, dez. 2019.
- BARRADAS, T. N. et al. Hydrogel-thickened nanoemulsions based on essential oils for topical delivery of psoralen: Permeation and stability studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 116, p. 38–50, 1 jul. 2017.

- BARRADAS, T. N.; DE HOLANDA E SILVA, K. G. Nanoemulsions of essential oils to improve solubility, stability and permeability: a review. **Environmental Chemistry Letters** **2020** **19**:2, v. 19, n. 2, p. 1153–1171, 23 nov. 2020.
- BASHIR, S. et al. Fundamental Concepts of Hydrogels: Synthesis, Properties, and Their Applications. **Polymers**, v. 12, n. 11, p. 2702, 16 nov. 2020.
- BATTAGLIA, L. et al. Piper aduncum Essential Oil Rich in Dillapiol: Development of Hydrogel-Thickened Nanoemulsion and Nanostructured Lipid Carrier Intended for Skin Delivery. 2022.
- BEDINI, S. et al. Not just for beer: evaluation of spent hops (*Humulus lupulus* L.) as a source of eco-friendly repellents for insect pests of stored foods. **Journal of Pest Science**, v. 88, n. 3, p. 583–592, 20 set. 2015.
- BENELLI, G.; JEFFRIES, C. L.; WALKER, T. Biological Control of Mosquito Vectors: Past, Present, and Future. **Insects** **2016**, Vol. 7, Page 52, v. 7, n. 4, p. 52, 3 out. 2016.
- BJÖRN, A. et al. Rheological Characterization. Em: KUMAR, S. (Ed.). **Biogas**. [s.l: s.n.].
- BONACUCINA, G. et al. Rheological, adhesive and release characterisation of semisolid Carbopol/tetraglycol systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 2, p. 129–140, jan. 2006.
- BORGES, R. S. et al. Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 1, 2018.
- BOSE, A. HPLC Calibration Process Parameters in Terms of System Suitability Test. **Austin Chromatography**, v. 1, n. 2, 2014.
- BOTAS, G. et al. *Baccharis reticularia* DC. and Limonene Nanoemulsions: Promising Larvicidal Agents for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Control. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1990, 17 nov. 2017.
- BOURTZIS, K.; VREYSEN, M. J. B. Sterile Insect Technique (SIT) and Its Applications. **Insects**, v. 12, n. 7, p. 638, 13 jul. 2021.
- BOYD, R. D.; PICHAIMUTHU, S. K.; CUENAT, A. New approach to inter-technique comparisons for nanoparticle size measurements; using atomic force microscopy, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 387, n. 1–3, p. 35–42, ago. 2011.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 179–293, dez. 2007.
- CABRAL, C. et al. Essential oil of *juniperus communis* subsp. *alpina* (Suter) Čelak needles: Chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 9, p. 1352–1357, set. 2012.
- CALIXTO, G. M. F. et al. Polyethyleneimine and Chitosan Polymer-Based Mucoadhesive Liquid Crystalline Systems Intended for Buccal Drug Delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 2, p. 820–836, 10 fev. 2018.
- CAMPOS, K. B. et al. Assessment of the susceptibility status of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations to pyriproxyfen and malathion in a nation-wide monitoring of insecticide resistance performed in Brazil from 2017 to 2018. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2020.
- CARVALHO, J. C. T. et al. Effects of *Bothrops alternatus* venom in zebrafish: a histopathological study. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 273–284, 1 fev. 2018.
- CATTEL, J. et al. Combining genetic crosses and pool targeted DNA-seq for untangling genomic variations associated with resistance to multiple insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*. **Evolutionary applications**, v. 13, n. 2, p. 303–317, 1 fev. 2019.
- CATTEL, J. et al. Impact of selection regime and introgression on deltamethrin resistance in the arbovirus vector *Aedes aegypti* – a comparative study between contrasted situations in

- <scp>New Caledonia</scp> and <scp>French Guiana</scp>. **Pest Management Science**, v. 77, n. 12, p. 5589–5598, 26 dez. 2021.
- CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH (CDER). **Reviewer Guidance' Validation of Chromatographic Methods**. [s.l.: s.n.].
- CHAMUNDEESWARI, M.; JESLIN, J.; VERMA, M. L. Nanocarriers for drug delivery applications. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, n. 2, p. 849–865, 21 jun. 2019.
- CHANDAK, N. et al. Dual evaluation of some novel 2-amino-substituted coumarinylthiazoles as anti-inflammatory–antimicrobial agents and their docking studies with COX-1/COX-2 active sites. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 4, p. 476–484, 1 ago. 2014.
- CHANG, Y.; MCLANDSBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Physicochemical Properties and Antimicrobial E ffi cacy of Carvacrol Nanoemulsions Formed by Spontaneous Emulsi fi cation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 61, p. 8906–8913, 2013.
- CHEN, J. et al. Natural Terpenes as Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1709, 11 dez. 2016.
- CHEN, T.; LI, M.; LIU, J. π - π Stacking Interaction: A Nondestructive and Facile Means in Material Engineering for Bioapplications. **Crystal Growth and Design**, v. 18, n. 5, p. 2765–2783, 2018.
- CHONG, W.-T. et al. Optimization of process parameters in preparation of tocotrienol-rich red palm oil-based nanoemulsion stabilized by Tween80-Span 80 using response surface methodology. 2018.
- CHOU, T.-C.; TALALAY, P. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 4, p. 450–454, jan. 1983.
- CHRISTOPHERS, S. R. **Aedes aegypti (L.) The yellow fever mosquito: Its life history, bionomics and structure**. 1. ed. Londres: [s.n.].
- COLE, J. C. et al. Comparing protein-ligand docking programs is difficult. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 60, n. 3, p. 325–332, 3 jun. 2005.
- CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1998. v. 11
- CORBEL, V. et al. International workshop on insecticide resistance in vectors of arboviruses, December 2016, Rio de Janeiro, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 278, 2 dez. 2017.
- CORBEL, V. et al. Second WIN International Conference on “Integrated approaches and innovative tools for combating insecticide resistance in vectors of arboviruses”, October 2018, Singapore. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 331, 3 dez. 2019.
- DA SILVA, M. R. M.; RICCI-JÚNIOR, E. An approach to natural insect repellent formulations: from basic research to technological development. **Acta Tropica**, v. 212, p. 105419, 1 dez. 2020.
- DARRIET, F.; CORBEL, V. Laboratory Evaluation of Pyriproxyfen and Spinosad, Alone and in Combination, Against *Aedes aegypti* Larvae. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 6, p. 1190–1194, 1 nov. 2006.
- DE OLIVEIRA, J. L. et al. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1550–1561, 2014.
- DE SOUZA, A. A. et al. Acute Toxicity and Anti-Inflammatory Activity of *Trattinnickia rhoifolia* Willd (Scuruba) Using the Zebrafish Model. **Molecules** 2022, Vol. 27, Page 7741, v. 27, n. 22, p. 7741, 10 nov. 2022.
- DE SOUZA, G. C. et al. Reproductive toxicity of the hydroethanolic extract of the flowers of *Acmella oleracea* and *spilanthol* in zebrafish: In vivo and in silico evaluation. **Human & experimental toxicology**, v. 39, n. 2, p. 127–146, 1 fev. 2020.

- DE VILLIERS, M. M.; ARAMWIT, P.; KWON, G. S. (EDS.). **Nanotechnology in Drug Delivery**. New York, NY: Springer New York, 2009.
- DEBBOUN, M.; FRANCES, S. P.; STTRICKMAN, D. **Insect Repellents: Principles, Methods, and Uses**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.
- DHINAKARAN, S. R.; MATHEW, N.; MUNUSAMY, S. Synergistic terpene combinations as larvicides against the dengue vector *Aedes aegypti* Linn. **Drug development research**, v. 80, n. 6, p. 791–799, 1 set. 2019.
- DIAZ, J. H. Chemical and Plant-Based Insect Repellents: Efficacy, Safety, and Toxicity. **Wilderness & Environmental Medicine**, v. 27, n. 1, p. 153–163, 1 mar. 2016.
- DICKENS, J. C.; BOHBOT, J. D. Mini review: Mode of action of mosquito repellents. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 106, n. 3, p. 149–155, 1 jul. 2013.
- DUARTE, J. L. et al. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of rosmarinus officinalis essential oil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 2, p. 189–192, 2015a.
- DUARTE, J. L. et al. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of Rosmarinus officinalis essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 189–192, mar. 2015b.
- DUARTE, J. L. et al. Botanical insecticide-based nanosystems for the control of *Aedes (Stegomyia) aegypti* larvae. **Environmental Science and Pollution Research**, 27 maio 2020a.
- DUARTE, J. L. et al. Novel bioadhesive polycarbophil-based liquid crystal systems containing *Melaleuca alternifolia* oil as potential repellents against *Aedes aegypti*. **Journal of Molecular Liquids**, v. 314, p. 113626, set. 2020b.
- DUARTE, J. L. et al. Nanotechnology as a tool for detection and treatment of arbovirus infections. **Acta Tropica**, v. 216, 2021.
- DUBEY, A. K.; MOSTAFAVI, E. Phyto-insect repellents: A nanotechnology-based approach of sustainability towards synthetic insect repellents. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 41, p. 100827, 1 jun. 2023.
- EPELBOIN, Y. et al. CYP450 core involvement in multiple resistance strains of *Aedes aegypti* from French Guiana highlighted by proteomics, molecular and biochemical studies. **PLOS ONE**, v. 16, n. 1, p. e0243992, 11 jan. 2021.
- EVERDS, N. E. et al. Interpreting Stress Responses during Routine Toxicity Studies. **Toxicologic Pathology**, v. 41, n. 4, p. 560–614, 7 jun. 2013.
- FAUCON, F. et al. Identifying genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing. **Genome Research**, v. 25, n. 9, p. 1347–1359, set. 2015.
- FAUSTINO, C. G. et al. Larvicide Activity on *Aedes aegypti* of Essential Oil Nanoemulsion from the Protium heptaphyllum Resin. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5333, 16 nov. 2020.
- FDA/CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH. **Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products**. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>>. Acesso em: 25 dez. 2022.
- FERNANDES, C. P. et al. HLB value, an important parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 108–114, jan. 2013.
- FERREIRA, R. M. DOS A. et al. Nano-emulsification Enhances the Larvicidal Potential of the Essential Oil of *Siparuna guianensis* (Laurales: Siparunaceae) Against *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 57, n. 3, p. 788–796, 4 maio 2020.

- FONSECA-SANTOS, B. et al. An effective mosquito-repellent topical product from liquid crystal-based tea tree oil. **Industrial Crops and Products**, v. 128, n. October 2018, p. 488–495, 2019.
- FORGIARINI, A. et al. Studies of the relation between phase behavior and emulsification methods with nanoemulsion formation. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 115, p. 36–39, 2000.
- GAO, J. et al. Volume-based size distribution of accumulation and coarse particles (PM_{0.1–10}) from cooking fume during oil heating. **Building and Environment**, v. 59, p. 575–580, 1 jan. 2013a.
- GAO, Y. et al. In Vitro Release Kinetics of Antituberculosis Drugs from Nanoparticles Assessed Using a Modified Dissolution Apparatus. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013b.
- GONZALEZ-COLOMA, A. et al. Natural Product-Based Biopesticides for Insect Control. Em: **Comprehensive Natural Products II**. [s.l.] Elsevier, 2010. v. 3p. 237–268.
- GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, S. DE S. **ARBOVIROSES URBANAS: DENGUE, CHIKUNGUNYA E ZIKA**. Disponível em: <http://saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/boletim/boletim_epidemiase0131_deng_chikun_zika.pdf>. Acesso em: 31 ago. 2023.
- GRIECO, J. P. et al. A novel high-throughput screening system to evaluate the behavioral response of adult mosquitoes to chemicals. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 21, n. 4, p. 404–411, 2005.
- GRIFFIN, W. C. CLASSIFICATION OF SURFACE-ACTIVE AGENTS BY “HLB”. **The Official Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 01, n. 05, p. 311–326, 1949.
- GUBLER, D. J.; HALSTEAD, S. B. Is Dengvaxia a useful vaccine for dengue endemic areas? **Bmj**, v. 5710, n. October, p. 15710, 2019.
- GUPTA, S.; MOHAN, C. G. Dual Binding Site and Selective Acetylcholinesterase Inhibitors Derived from Integrated Pharmacophore Models and Sequential Virtual Screening. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–21, 2014.
- GUTOWSKA, I.; MACHOY, Z.; MACHALIŃSKI, B. The role of bivalent metals in hydroxyapatite structures as revealed by molecular modeling with the HyperChem software. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 75, n. 4, p. 788–793, 15 dez. 2005.
- HERRADA-MANCHÓN, H.; FERNÁNDEZ, M. A.; AGUILAR, E. Essential Guide to Hydrogel Rheology in Extrusion 3D Printing: How to Measure It and Why It Matters? **Gels** **2023, Vol. 9, Page 517**, v. 9, n. 7, p. 517, 26 jun. 2023.
- HEVENER, K. E. et al. Validation of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase. **J Chem Inf Model**, v. 49, n. 2, p. 444–460, 2009.
- HILBIG, J. et al. Physical and antimicrobial properties of cinnamon bark oil co-nanoemulsified by lauric arginate and Tween 80. **International Journal of Food Microbiology**, v. 233, p. 52–59, 2016.
- HOLANDA, F. H. et al. Anti-inflammatory potential of baicalein combined with silk fibroin protein in a zebrafish model (Danio rerio). **Biotechnology Letters** **2022 45:2**, v. 45, n. 2, p. 235–253, 22 dez. 2022.
- HOLYŃSKA-IWAN, I.; SZEWCZYK-GOLEC, K. Pyrethroids: How They Affect Human and Animal Health? **Medicina**, v. 56, n. 11, p. 582, 30 out. 2020.
- HOU, J. et al. Nanoparticle tracking analysis versus dynamic light scattering: Case study on the effect of Ca²⁺ and alginate on the aggregation of cerium oxide nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 360, p. 319–328, out. 2018.

- HU, Y. et al. A double-layer hydrogel based on alginate-carboxymethyl cellulose and synthetic polymer as sustained drug delivery system. **Scientific Reports** **2021** **11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 28 abr. 2021.
- HUANG, Y. J. S.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. L. Biological Control Strategies for Mosquito Vectors of Arboviruses. **Insects**, v. 8, n. 1, 1 mar. 2017.
- ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. **International Conference on Harmonization**, v. 1994, n. November 1996, p. 17, 2005.
- ITURBE-ORMAETXE, I.; WALKER, T.; O'NEILL, S. L. Wolbachia and the biological control of mosquito-borne disease. **EMBO reports**, v. 12, n. 6, p. 508–518, 1 jun. 2011.
- IZQUIERDO, P. et al. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 285, n. 1, p. 388–394, 2005.
- JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123, 1 abr. 2015.
- JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; DJOKIC, J. Texture profile analysis of bioadhesive polymeric semisolids: Mechanical characterization and investigation of interactions between formulation components. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 61, n. 12, p. 2229–2234, 19 set. 1996.
- JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926–935, 15 jul. 1983.
- K. GURPRET; S. K. SINGH. Review of Nanoemulsion Formulation and Characterization Techniques. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 5, 2018.
- KASAI, S. et al. Discovery of super-insecticide-resistant dengue mosquitoes in Asia: Threats of concomitant knockdown resistance mutations. **Science Advances**, v. 8, n. 51, 23 dez. 2022.
- KAWAKAMI, M. Y. M. et al. Efficacy of nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel oleoresin for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 134, 2021.
- KHUMPIRAPANG, N. et al. Self-microemulsifying drug delivery system and nanoemulsion for enhancing aqueous miscibility of *Alpinia galanga* oil. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0188848, 30 nov. 2017.
- KIM, Y. et al. Azobenzene-grafted carboxymethyl cellulose hydrogels with photo-switchable, reduction-responsive and self-healing properties for a controlled drug release system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 824–832, 15 nov. 2020.
- KLANG, V. et al. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. **Micron**, v. 43, n. 2–3, p. 85–103, fev. 2012.
- KRAEMER, M. U. G. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **eLife**, v. 4, n. JUNE2015, 30 jun. 2015.
- KRISNAMURTI, G. C.; RATIH, D.; SARI, T. Unveiling the Potency of *Coriandrum sativum* as Repellent for Antimalarial : In silico Study. p. 563–567, 2023.
- KUMAR, M. et al. Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 24, n. 3, p. 225–234, 30 set. 2019.
- LAGUNIN, A. et al. PASS: prediction of activity spectra for biologically active substances. **Bioinformatics**, v. 16, n. 8, p. 747–748, 1 ago. 2000.
- LEAL, W. S. The enigmatic reception of DEET — the gold standard of insect repellents. **Current Opinion in Insect Science**, v. 6, p. 93–98, 1 dez. 2014.
- LEE, D. C.; AHN, Y. J. Laboratory and Simulated Field Bioassays to Evaluate Larvicidal Activity of *Pinus densiflora* Hydrodistillate, Its Constituents and Structurally Related Compounds against *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens* in Relation to

- Their Inhibitory Effects on Acetylcholinesterase Activity. **Insects**, v. 4, n. 2, p. 217–229, 2013.
- LEE, J. H. et al. Anti-invasive effect of β -myrcene, a component of the essential oil from *Pinus koraiensis* cones, in metastatic MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 563–569, 30 ago. 2015.
- LI, Y.-C. et al. Structures of Prostacyclin Synthase and Its Complexes with Substrate Analog and Inhibitor Reveal a Ligand-specific Heme Conformation Change. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 5, p. 2917–2926, fev. 2008.
- LOPES ROCHA CORREA, V. et al. Melatonin loaded lecithin-chitosan nanoparticles improved the wound healing in diabetic rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 1465–1475, 1 nov. 2020.
- LÓPEZ-CAMACHO, E. et al. A new multi-objective approach for molecular docking based on rmsd and binding energy. **Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)**, v. 9702, p. 65–77, 2016.
- LUCIA, A.; ZERBA, E.; MASUH, H. Knockdown and larvicidal activity of six monoterpenes against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and their structure-activity relationships. **Parasitology Research**, v. 112, n. 12, p. 4267–4272, 8 dez. 2013.
- MACIEL-DE-FREITAS, R. et al. Undesirable Consequences of Insecticide Resistance following *Aedes aegypti* Control Activities Due to a Dengue Outbreak. **PLOS ONE**, v. 9, n. 3, p. e92424, 27 mar. 2014.
- MALEKJANI, N.; JAFARI, S. M. Modeling the release of food bioactive ingredients from carriers/nanocarriers by the empirical, semiempirical, and mechanistic models. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 1, p. 3–47, 29 jan. 2021.
- MARAFON, P. et al. Development, physico-chemical characterization and in-vitro studies of hydrogels containing rosmarinic acid-loaded nanoemulsion for topical application. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, n. 8, p. 1199–1208, 3 jul. 2019.
- MARCHESE, A. et al. Update on Monoterpenes as Antimicrobial Agents: A Particular Focus on p-Cymene. **Materials**, v. 10, n. 8, p. 947, 15 ago. 2017.
- MARCOMBE, S. et al. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: A case study in Martinique Island (French West Indies). **BMC Genomics**, v. 10, p. 494, 2009.
- MARCOMBE, S. et al. Field Efficacy of New Larvicide Products for Control of Multi-Resistant *Aedes aegypti* Populations in Martinique (French West Indies). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 1, p. 118–126, 5 jan. 2011.
- MARENA, G. D. et al. *Galleria mellonella* for systemic assessment of anti-*Candida auris* using amphotericin B loaded in nanoemulsion. **Science of The Total Environment**, v. 807, p. 151023, 10 fev. 2022.
- MARTINS, M. M.; PRATA-BARBOSA, A.; CUNHA, A. J. L. A. DA. Arboviral diseases in pediatrics†. **Jornal de Pediatria**, n. xx, out. 2019.
- MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719–1729, 2012.
- MELO COSTA, M. et al. Kdr genotyping in *Aedes aegypti* from Brazil on a nation-wide scale from 2017 to 2018. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.
- MIASTKOWSKA, M.; SLIWA, P. Influence of Terpene Type on the Release from an O/W Nanoemulsion: Experimental and Theoretical Studies. **Molecules**, v. 25, n. 12, 1 jun. 2020.

- MORADI, M. et al. CMC-based hydrogels loaded with *Hypericum perforatum* nanoemulsion for potential wound dressing applications. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 37, n. 4, p. 316–331, 1 jul. 2022a.
- MORADI, M. et al. CMC-based hydrogels loaded with *Hypericum perforatum* nanoemulsion for potential wound dressing applications. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 37, n. 4, p. 316–331, 1 jul. 2022b.
- MÜLLER, G. C. et al. Efficacy of the botanical repellents geraniol, linalool, and citronella against mosquitoes. **Journal of Vector Ecology**, v. 34, n. 1, p. 2–8, 1 jun. 2009.
- MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V. M.; GUBLER, D. J. Zika virus: Following the path of dengue and chikungunya? **The Lancet**, v. 386, n. 9990, p. 243–244, 2015.
- MUSTAFA, I. F.; HUSSEIN, M. Z. Synthesis and Technology of Nanoemulsion-Based Pesticide Formulation. **Nanomaterials** 2020, Vol. 10, Page 1608, v. 10, n. 8, p. 1608, 17 ago. 2020.
- NAZARZADEH, E.; ANTHONYPILLAI, T.; SAJJADI, S. On the growth mechanisms of nanoemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 397, p. 154–162, 2013.
- OLIVEIRA, A. E. M. F. M. et al. Development of ? larvicidal nanoemulsion with pterodon emarginatus Vogel oil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, 2016.
- OLIVEIRA, A. E. M. F. M. et al. Essential oil from *Pterodon emarginatus* as a promising natural raw material for larvicidal nanoemulsions against a tropical disease vector. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 6, p. 1–9, 2017a.
- OLIVEIRA, A. E. M. F. M. et al. *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion as a promising tool for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) control. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, 2017b.
- OLIVEIRA, F. M. et al. Histological, histochemical and energy disorders caused by R-limonene on *Aedes aegypti* L. larvae (Diptera: Culicidae). **Acta Tropica**, v. 221, p. 105987, set. 2021.
- ORAFIDIYA, L. O.; OLADIMEJI, F. A. Determination of the required HLB values of some essential oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 237, n. 1–2, p. 241–249, abr. 2002.
- ORLANDO, B. J.; MALKOWSKI, M. G. Substrate-selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Fenamic Acid Derivatives Is Dependent on Peroxide Tone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 29, p. 15069–15081, jul. 2016.
- 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.
- 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, dez. 2020.
- OSTERTAG, F.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 388, n. 1, p. 95–102, 2012.
- PARENTE, M. E. et al. Bioadhesive hydrogels for cosmetic applications. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 37, n. 5, p. 511–518, out. 2015.
- PARISOTTO-PETERLE, J. et al. Healing activity of hydrogel containing nanoemulsified β -caryophyllene. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 148, p. 105318, maio 2020.
- PAVELA, R. et al. Understanding Synergistic Toxicity of Terpenes as Insecticides: Contribution of Metabolic Detoxification in *Musca domestica*. 2018.
- PEREIRA, B. B. et al. Toxicological assessment of spinosad: Implications for integrated control of *Aedes aegypti* using larvicides and larvivorous fish. <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2016.1176974>, v. 79, n. 12, p. 477–481, 17 jun. 2016.

- PERUMALSAMY, H. et al. Novel Histopathological and Molecular Effects of Natural Compound Pellitorine on Larval Midgut Epithelium and Anal Gills of *Aedes aegypti*. **PLOS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80226, 18 nov. 2013.
- POGODIN, P. V. et al. PASS Targets: Ligand-based multi-target computational system based on a public data and naïve Bayes approach. **SAR and QSAR in environmental research**, v. 26, n. 10, p. 783–793, 3 out. 2015.
- POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. Em: MULLER, R.; LLOYD, R. (Eds.). **In Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish**. Farnham:Oxford: Fishing News Books Ltd, 1994. p. 339–352.
- POROIKOV, V. V. et al. PASS biological activity spectrum predictions in the enhanced open NCI database browser. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 43, n. 1, p. 228–236, jan. 2003.
- QI, X. et al. Mechanisms of antifungal and mycotoxin inhibitory properties of *Thymus vulgaris* L. essential oil and their major chemical constituents in emulsion-based delivery system. **Industrial Crops and Products**, v. 197, p. 116575, 1 jul. 2023.
- RAWANI, A.; GHOSH, A.; CHANDRA, G. Mosquito larvicidal and antimicrobial activity of synthesized nano-crystalline silver particles using leaves and green berry extract of *Solanum nigrum* L. (Solanaceae: Solanales). **Acta Tropica**, v. 128, n. 3, p. 613–622, 2013.
- RODERO, C. F. et al. Curcumin-Loaded Liquid Crystalline Systems for Controlled Drug Release and Improved Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, n. 10, p. 4491–4504, 5 out. 2018.
- RODRIGUES, V. et al. Chemical composition, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of *Thymus zygis* L. subsp. *sylvestris* (Hoffmanns. & Link) Cout. essential oil and its main compounds. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 3236–3243, 1 dez. 2019.
- RODRÍGUEZ, M. M. et al. Detection of Insecticide Resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba and Venezuela. **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 5, p. 623–628, 1 set. 2001.
- ROIZ, D. et al. Integrated Aedes management for the control of Aedes-borne diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 12, p. e0006845, 1 dez. 2018.
- ROMERO, I. C. **A gestão de doenças infecto-contagiosas: o impacto do dengue na saúde pública**. Trabalho de Conclusão de curso—Araraquara: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2014.
- ROMERO-VIVAS, C. M. E.; WHEELER, J. G.; FALCONAR, A. K. I. AN INEXPENSIVE INTERVENTION FOR THE CONTROL OF LARVAL AEDES AEGYPTI ASSESSED BY AN IMPROVED METHOD OF SURVEILLANCE AND ANALYSIS. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 18, n. 1, p. 40–46, 2002.
- SANDY, M.; BUTLER, A. Microbial Iron Acquisition: Marine and Terrestrial Siderophores. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 10, p. 4580–4595, out. 2009.
- SANTOS, S. R. L. et al. Toxic Effects on and Structure-Toxicity Relationships of Phenylpropanoids, Terpenes, and Related Compounds in *Aedes aegypti* Larvae. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1049–1054, 1 dez. 2010.
- SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 491–500, 2010.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE | MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico: Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022**. [s.l.: s.n.].
- SHARMA, P.; TAILANG, M. Design, optimization, and evaluation of hydrogel of primaquine loaded nanoemulsion for malaria therapy. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences** 2020 6:1, v. 6, n. 1, p. 1–11, 23 jun. 2020.

- SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, abr. 2017.
- SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 246–254, 2012.
- SONEBI, M.; YAHIA, A. Mix design procedure, tests, and standards. Em: **Self-Compacting Concrete: Materials, Properties and Applications**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 1–30.
- SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J. T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 145–149, 20 maio 2004.
- SOUZA, G. C. DE et al. Obtainment and Study of the Toxicity of Perillyl Alcohol Nanoemulsion on Zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Nanomedicine Research**, v. 4, n. 4, p. 18–20, 6 dez. 2016.
- SPINOZZI, E. et al. Spilanthol-rich essential oil obtained by microwave-assisted extraction from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen and its nanoemulsion: Insecticidal, cytotoxic and anti-inflammatory activities. **Industrial Crops and Products**, v. 172, p. 114027, nov. 2021.
- STANCZYK, N. M. et al. Mosquito repellents for travellers. **BMJ**, v. 350, n. feb19 13, p. h99–h99, 19 fev. 2015.
- SUBAHARAN, K. et al. Ultrasound-assisted nanoemulsion of *Trachyspermum ammi* essential oil and its constituent thymol on toxicity and biochemical aspect of *Aedes aegypti*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 47, p. 71326–71337, 21 out. 2022.
- SUGUMAR, S. et al. Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 104, n. 3, p. 393–402, 2014.
- SUNDARARAJAN, B. et al. Formulation of nanoemulsion from leaves essential oil of *Ocimum basilicum* L. and its antibacterial, antioxidant and larvicidal activities (*Culex quinquefasciatus*). **Microbial Pathogenesis**, v. 125, p. 475–485, dez. 2018.
- SURENDRAN, S. et al. Myrcene—What Are the Potential Health Benefits of This Flavouring and Aroma Agent? **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 400, 19 jul. 2021.
- TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, 2004.
- TALLARIDA, R. J. The interaction index: a measure of drug synergism. **Pain**, v. 98, n. 1–2, p. 163–168, 1 jul. 2002.
- THOMAS, S. J.; YOON, I.-K. A review of Dengvaxia®: development to deployment. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, p. 1–20, 2019.
- TSITSANOU, K. E. et al. Anopheles gambiae odorant binding protein crystal complex with the synthetic repellent DEET: Implications for structure-based design of novel mosquito repellents. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 2, p. 283–297, 2012.
- TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of Essential Oils: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40–53, 1 jan. 2013.
- VALTIERRA-DE-LUIS, D. et al. Potential for *Bacillus thuringiensis* and Other Bacterial Toxins as Biological Control Agents to Combat Dipteran Pests of Medical and Agronomic Importance. **Toxins** 2020, Vol. 12, Page 773, v. 12, n. 12, p. 773, 5 dez. 2020.
- VIEIRA SANTOS, V. S. et al. Ecotoxicological effects of larvicide used in the control of *Aedes aegypti* on nontarget organisms: Redefining the use of pyriproxyfen. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 80, n. 3, p. 155–160, 1 fev. 2017.
- WALIA, N. et al. A low energy approach to develop nanoemulsion by combining pea protein and Tween 80 and its application for vitamin D delivery. **Food Hydrocolloids for Health**, v. 2, p. 100078, 1 dez. 2022.

- WALKER, R. D.; ERSKINE HAWKINS, J. The Ultraviolet Absorption Spectra of Some Terpene Hydrocarbons. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, n. 16, p. 4209–4210, 1 ago. 1952.
- WANG, J. et al. Aedes aegypti Odorant Binding Protein 22 selectively binds fatty acids through a conformational change in its C-terminal tail. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020.
- WHO. **Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors**. Geneva: [s.n.].
- WHO. Monitoring and managing insecticide resistance in Aedes mosquito populations. **Who**, v. 16, n. 10665, p. 7, 2016.
- WON-SIK CHOI, I. B.-S. P. S.-K. K. A. S.-E. L. REPELLENT ACTIVITIES OF ESSENTIAL OILS AND MONOTERPENES AGAINST CULEX PIPIENS PALLENS. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 18, n. 4, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. **World Health Organization**, p. 1–41, 2005.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. A global brief on vector-borne diseases. **World Health Organization**, n. September, p. 9, 2014.
- WU, I. Y. et al. Interpreting non-linear drug diffusion data: Utilizing Korsmeyer-Peppas model to study drug release from liposomes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 138, p. 105026, 1 out. 2019.
- XANTHIS, V. et al. Antioxidant and Cytoprotective Potential of the Essential Oil Pistacia lentiscus var. chia and Its Major Components Myrcene and α -Pinene. **Antioxidants 2021, Vol. 10, Page 127**, v. 10, n. 1, p. 127, 18 jan. 2021.
- YANG, G. et al. Expression, purification and functional analysis of an odorant binding protein AaegOBP22 from Aedes aegypti. **Protein Expression and Purification**, v. 75, n. 2, p. 165–171, 2011.
- YU, K.-X. et al. Larvicidal activity, inhibition effect on development, histopathological alteration and morphological aberration induced by seaweed extracts in Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 12, p. 1006–1012, dez. 2015.
- ZAFAR, Z. et al. Odorant Binding Proteins (OBPs) and Odorant Receptors (ORs) of Anopheles stephensi: Identification and comparative insights. **PLoS ONE**, v. 17, n. 3 March, p. 1–21, 2022.
- ZARA, A. L. DE S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 391–404, 1 abr. 2016.
- ZHANG, H.; GEORGESCU, P.; HASSAN, A. S. Mathematical insights and integrated strategies for the control of Aedes aegypti mosquito. **Applied Mathematics and Computation**, v. 273, p. 1059–1089, 15 jan. 2016.
- ZIELIŃSKA, A. et al. Loading, release profile and accelerated stability assessment of monoterpenes-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 25, n. 7, p. 832–844, 8 ago. 2020.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos publicados

1

Environmental Science and Pollution Research (2020) 27:28737–28748
<https://doi.org/10.1007/s11356-020-09278-y>

REVIEW ARTICLE



Botanical insecticide-based nanosystems for the control of *Aedes (Stegomyia) aegypti* larvae

Jonatas Lobato Duarte¹ · Anna Eliza Maciel de Faria Motta Oliveira² · Mara Cristina Pinto¹ · Marlus Chorilli¹

Received: 31 March 2020 / Accepted: 12 May 2020 / Published online: 27 May 2020
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Aedes (Stegomyia) aegypti is a cosmopolitan species that transmits arbovirus of medical importance as dengue, Zika, and chikungunya. The main strategy employed for the control of this mosquito is the use of larvicidal agents. However, the overuse of synthetic chemical larvicides has led to an increase in resistant insects, making management difficult. Therefore, the use of botanical insecticide-based nanosystems as an alternative to the use of synthetic agents for the control of *Ae. aegypti* has gained more considerable attention in the last years, mainly due to the advantages of nanostructured delivery systems, such as (a) controlled release; (b) greater surface area; (c) improvement of biological activity; (d) protection of natural bioactive agents from the environment and thus achieving stability; and (e) lipophilic drugs are easier dispersed even in aqueous vehicles. This review summarizes the current knowledge about botanical insecticide-based nanosystems as larvicidal against *Ae. aegypti* larvae. The majority of papers used metallic nanoparticles (NPs) as larvicidal agents, mainly silver nanoparticles (AgNPs), showing potential for their use as an alternative, followed by nanoemulsions containing vegetable oils, most essential oils, nanosystems that allow the dispersion of this high hydrophobic product in water, the environment of larval development. The final section describes scientific findings about the mode of action of these NPs, showing the gap about this subject in literature.

Keywords Arboviruses · Nanotechnology · Metallic nanoparticles · Nanoemulsions · Natural products

2



Acta Tropica

Volume 216, April 2021, 105848



Nanotechnology as a tool for detection and treatment of arbovirus infections

Jonatas Lobato Duarte^a, Leonardo Delello Di Filippo^a, Victor Hugo Sousa Araujo^a,
 Anna Eliza Maciel de Faria Motta Oliveira^b, Jennifer Thayanne Cavalcante de Araújo^a,
 Flávia Benini da Rocha Silva^a, Mara Cristina Pinto^a, Marlus Chorilli^a

Artigos submetidos

1 – Submetido para o periódico PlosOne

**1 Larvicidal properties of terpenoid-based nanoemulsions against the
2 Dengue vector *Aedes aegypti* L. and their potential toxicity against non-
3 target organism**

4

5 Jonatas Lobato Duarte¹, Stéphane Duchon², Leonardo Delello Di Filippo¹, Marlus
6 Chorilli¹, Vincent Corbel^{2,3}

7

8 ¹Department of Drugs and Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo
9 State University (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brazil

10 ² Institut de Recherche pour le Développement (IRD), MIVEGEC, Univ. Montpellier,
11 CNRS, IRD, 911 Av Agropolis, 34 394 Montpellier, France

12 ³ Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Laboratório de
13 Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (Laficave). Avenida Brasil, 4365
14 Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ, CEP: 21040-360, Brazil

2 – Submetido para o periódico Beilstein Journal of nanotechnology

**"Nanoscale Solutions for Macro-Sized Problems: Development and
characterization of potential larvicidal Nanoemulsions against *Aedes
aegypti*"**

Jonatas L. Duarte^{1*}, Leonardo Delello Di Filippo¹, Anna Eliza Maciel de Faria Mota
Oliveira⁴, Rafael Miguel Sábio¹, Gabriel Davi Marena^{1,2}, Tais Maria Bauab², Cristiane
Duque³, Vincent Corbel^{5,6}, Marlus Chorilli^{1*}

¹Department of Drugs and Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State
University (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brazil

²Department of Biological Sciences, São Paulo State University (UNESP), School of
Pharmaceutical Sciences, Campus Araraquara, São Paulo, Brazil

³Department of Preventive and Restorative Dentistry, Araçatuba Dental School - São Paulo State
University (UNESP), Araçatuba, SP, Brazil.

⁴Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Macapá, AP,
Brazil

⁵Institut de Recherche pour le Développement (IRD), MIVEGEC, Univ. Montpellier,
CNRS, IRD, 911 Av Agropolis, 34 394 Montpellier, France

⁶Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Laboratório de
Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (Laficave). Avenida Brasil, 4365
Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ, CEP: 21040-360, Brazil

*Corresponding author

3 - submetido para o periódico Journal of AOAC

High-performance liquid chromatography analytical method for quantification of monoterpenoids p-cymene or myrcene in nanoemulsions ¶

Jonatas Lobato Duarte^{1*}, Leonardo Delello Di Filippo¹, Alberto Gomes Tavares Junior¹, Marlus Chorilli¹ ¶

¹Department of Drugs and Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brazil ¶

*Corresponding authors' email address: jl.duarte@unesp.br ¶

ORCID Numbers for all authors: ¶

Jonatas Duarte, 0000-0002-7276-3686 ¶

Leonardo Di Filippo, 0000-0001-6365-8756 ¶

Alberto G.T. Junior, 0000-0002-6083-8177 ¶

Marlus Chorilli, 0000-0002-6698-0545 ¶

Manuscrito em produção ¶

¶

Monoterpenes hydrogels as repellents against *Aedes aegypti* L. ¶

¶

Jonatas L. Duarte¹, Leonardo Delello Di Filippo¹, Tais de Cássia Ribeiro¹, Vincent Corbel², David Carrasco², [Stephane Duchon](#)², Marlus Chorilli² ¶

¶

¹Department of Drugs and Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brazil ¶

²MIVEGEC, University of Montpellier, IRD, CNRS, 34000 Montpellier, [France](#); ¶

¶

¶