

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ATIVIDADE LARVICIDA DE NANOEMULSÃO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE
Pterocaulon polystachyum CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*

Nathalya Tesch Brazil

Porto Alegre, julho de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ATIVIDADE LARVICIDA DE NANOEMULSÃO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE
Pterocaulon polystachyum CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*

Nathalya Tesch Brazil

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como
requisito parcial para a obtenção do título de
Farmacêutico, pelo curso de Farmácia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira
Coorientadora: Msc. Bruna Medeiros Neves

Porto Alegre, julho de 2017

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, que me guiou em todos os passos e capacitou para que concluísse essa graduação e me ajudou a superar todos os obstáculos.

Agradeço muito aos meus pais, Ana e Marco, pelo apoio incondicional, por aguentar todas os períodos de quase desistência, por celebrar as vitórias. Meu muito obrigada por todos os princípios ensinados e por todos os colos durante esses anos, foram essenciais para chegar até aqui. Esse momento é de vocês também.

Ao meu noivo, Felipe, que desde a escolha do curso vem me dando apoio, ajudando a pensar racionalmente nas minhas decisões, me ensinou que paciência é necessária e que às vezes ficar para trás não é tão ruim assim.

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento Galênico, por todos os conhecimentos, cafés, conversas e histórias compartilhados.

Ao Laboratório de Parasitologia, onde pude começar minha vida acadêmica científica e onde a estou concluindo.

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Helder Teixeira pela oportunidade de realizar a iniciação científica e o presente trabalho sob sua orientação, por todas as conversas, apoios, histórias e orientações. E claro, aos cafés fortes.

À Bruna, minha coorientadora inspiradora, pela paciência, pelas consultas, pelos ensinamentos, pelo ombro amigo em diversas crises de ansiedade e pelas injeções de ânimo quando tudo parecia estar saindo dos trilhos.

Aos meus amigos e colegas de faculdade, sem eles a faculdade teria sido mais difícil. Obrigada pelos carinhos, conversas, cafés, choros. Vocês são demais!

Nathalya Tesch Brazil

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Laboratório de Parasitologia desta Universidade. O texto foi redigido em formato de artigo, a ser submetido ao periódico Química Nova. As normas para submissão nesse periódico estão em Anexo.

ATIVIDADE LARVICIDA DE NANOEMULSÃO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE
Pterocaulon polystachyum CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*

Brazil, N.T.^a, Medeiros-Neves, B.^a, Apel, M.^b, Goellner, E.^c, Pilz, H.^c, Silva, O.S.^c, von Poser,
G.L.^b, Teixeira, H.F.^a

^a Departamento de Produção e Controle de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2752 Ipiranga, 90610-000, Porto Alegre, Brasil

^b Departamento de Produção de Matéria-Prima, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2752 Ipiranga, 90610-000, Porto Alegre, Brasil

^c Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 500 Sarmiento Leite, 90050-110, Porto Alegre, Brasil.

Autor correspondente:

Helder Ferreira Teixeira

helder.teixeira@ufrgs.br

RESUMO

O controle de arboviroses é deficiente em função da falta de alternativas de prevenção ou tratamentos profiláticos. Uma alternativa é o controle do vetor da transmissão, o mosquito fêmea de *Aedes aegypti*. Contudo, elevadas taxas de resistência aos inseticidas constituem um problema de controle do vetor e aumento da toxicidade. Espécies do gênero *Pterocaulon* possuem muitos relatos de uso etnofarmacológico como repelente. Dentre essas, destaca-se a *P. polystachyum*, espécie rica em óleos essenciais e que já teve sua atividade larvicida comprovada. No entanto, se tratando de óleos essenciais e conhecida volatilidade, uma estratégia que tem sido investigada consiste na incorporação em sistemas nanoestruturados, a fim de melhorar estabilidade e podendo prolongar o tempo de liberação do produto. Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo extrair e caracterizar o óleo essencial de *P. polystachyum* e incorporá-lo em um sistema nanoestruturado, visando a atividade larvicida contra as larvas de *A. aegypti*. O óleo essencial apresentou rendimento de 0,17 %. A nanoemulsão contendo o óleo (NE_{óleo}) apresentou-se estável durante o período de 60 dias. Foram testadas a atividade larvicida do óleo essencial e a NE_{óleo} nas concentrações de 750 - 23,44 µg/mL no período de 24 e 48 horas. O óleo demonstrou atividade promissora, matando até 80% das larvas em 48h. A NE_{óleo} apresentou potencial atividade também, matando próximo de 80%. Contudo, mais testes serão realizados para comprovar o perfil da atividade.

Palavras-chaves: *Pterocaulon polystachyum*, óleo essencial, *Aedes aegypti*, nanoemulsão.

ABSTRACT

The control of arbovirosis is deficient due to the lack of prevention alternatives or prophylactic treatments. Current option is to control the transmission vector which is *Aedes aegypti* female mosquito. However, a vector control issue arises due to the high resistance rate of the most commonly used insecticides. It is described for the species inside the genus *Pterocaulon* spp. ethnopharmacological activity as a repellent agent. The species *P. polystachyum* is one of the richest in essential oil and has larvicidal activity described. However, essential oils are volatile compounds and a strategy used for it is the incorporation in nanostructures systems with the intent of improve stability and increase release time. Moving forward, the aim of this study was to elicit the essential oil of *P. polystachyum* and incorporate it in a nanostructured system, aiming the larvicidal activity against *A. aegypti* larvae. The essential oil yielded 0,17% (w/v). The nanoemulsion holding the oil (NE_{oil}) remained stable during the 60 days period. Larvicidal activity were tested for both essential oil and NE_{oil} using the concentration range of 750 - 23,44 µg/mL in 24 and 48 hours periods. The essential oil demonstrated promising activity, killing 80% of the larvae in 48h. Also, the nanoemulsion showed potential activity as well, killing approximately 80%. More tests will be done to evidence the activitie's profile.

Keywords: *Pterocaulon polystachyum*, essential oil, *Aedes aegypti*, nanoemulsion.

1. INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* é o vetor mais comum transmissor de arboviroses como a dengue, febre chikungunya, zika vírus, febre amarela, dentre outras doenças. Atualmente, a dengue é a arbovirose mais transmitida^{20,36}, gerando de 50 a 100 milhões de infecções por ano.⁶ De origem africana subsaariana, o mosquito *A. aegypti* é o de maior importância epidemiológica. O ciclo de vida deste gênero leva de 7 a 10 dias para chegar ao estado adulto, responsável pela transmissão da dengue, da febre chikungunya e da doença da zika.^{14,36}

O vírus da dengue e do zika são vírus de RNA pertencentes ao gênero *Flavivirus* da família Flaviviridae, já o vírus da febre chikungunya pertence ao gênero *Alphavirus*, da família Togaviridae. A dengue ainda não possui nenhum método de profilaxia como vacinas ou medicamentos, por isso o controle de proliferação do vetor se torna relevante no controle dos casos novos e recidivas, além de prevenir a co-infecção por mais de um sorotipo de vírus. Já foram descritos, até o momento, 4 sorotipos de vírus da dengue e a co-infecção por mais de um tipo torna agravante a situação do paciente infectado.^{6,14} Assim como a dengue, a chikungunya e o zika vírus não possuem métodos de prevenção, também necessitando do controle do vetor para diminuir o número de novos casos.

Após a infecção pelo vírus os sintomas começam a aparecer entre 4 e 7 dias e podem durar de 3 a 10 dias¹⁴ pode se apresentar de duas formas: a dengue clássica e a febre hemorrágica da dengue, sendo essa a mais grave e potencialmente fatal. O Ministério da Saúde, até a semana epidemiológica 19 de 2017, registrou mais de 140.000 de casos prováveis de dengue, acima de 80.000 casos prováveis de febre chikungunya e acima de 9.000 casos prováveis de zika vírus.⁷

A necessidade de atingir o vetor pelo seu estado larval se dá pelo elevado grau de domesticação do mosquito adulto, que habita residências, principalmente urbanas e sua elevada taxa de resistência aos inseticidas piretróides, organoclorados e organofosforados já encontrados no mercado.⁸ Além da resistência aos repelentes no mercado, no caso dos organoclorados seu uso contínuo e a aplicação com frequência na pele não são medidas recomendadas, devido aos potenciais efeitos tóxicos dos compostos que são absorvidos pela pele⁸, com isso, o uso de derivados de produtos naturais tem se tornado crescente e com muita aceitação popular.

O emprego de plantas para usos medicinais, de forma popular, se tornou amplamente disseminado no Brasil. Plantas do gênero *Pterocaulon* são comumente utilizadas na Argentina, Austrália, Brasil, Madagascar e Martinica (Medeiros-Neves, a submeter). Já foram descritos usos etnofarmacológicos como: antifúngico, antipirético, digestivo, antiséptico, emenagogo, doenças hepáticas, picadas de cobras, artrite, pesticida e como plantas aromáticas. A espécie *Pterocaulon polystachyum* DC. possui elevado teor de óleos essenciais e forte odor característico, devido a pubescência glandulosa, única do gênero a apresentar essa característica.¹⁸ Para essa espécie encontram muitos relatos de usos etnofarmacológicos, dentre eles o uso como repelente.^{11,37} Estudos mais recentes, desenvolvidos por Ciccia e col. (2000) demonstraram a atividade larvicida frente a cepas de *Aedes aegypti* a partir de extratos metanólicos. Já, Vera e colaboradores em 2006 descreveu a atividade de extratos com as cumarinas isoladas e em combinações que foram incorporados à dieta de larvas de *Spodoptera frugiperda*.

No entanto, o uso de compostos extraídos diretamente das plantas apresenta diversas dificuldades³⁸ como a aceitação do usuário, evaporação do óleo volátil, baixa solubilização de compostos oleosos, dor ao administrar compostos muito oleosos⁹, dentro outros, por isso o desenvolvimento de compostos nanoestruturados, tais como: lipossomas; nanoemulsões e nanopartículas vêm crescendo. A busca por esses sistemas de incorporação ocorre devido as inúmeras vantagens, como a estabilidade da formulação, menor degradação do óleo ou fármaco, biocompatibilidade, podendo inclusive, ser utilizadas em sondas de alimentação parenteral de três fases, pelo tamanho de partícula ser capaz de ser utilizado no sistema venoso.²

O desenvolvimento de sistemas nanoestruturados tem crescido devido a sua aplicabilidade ser muito ampla, desde os cosméticos até produtos para uso interno, como antifúngicos (ex: anfotericina lipossomal). Tais modificações tornam a formulação mais estável, pois os compostos de baixa solubilidade apresentam, diversas vezes, precipitação ou floculação², esses sistemas podem, inclusive, prolongar o tempo de liberação do fármaco e diminuindo o número de doses administradas ao paciente. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi a obtenção do óleo essencial espécie *P. polystachyum* e incorporação deste numa nanoemulsão para aplicação contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Produtos químicos e Solventes

Para o preparo das formulações foram utilizados triglicerídeos de cadeia média (TCM) da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany); monooleato de sorbitano (Span® 80) da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e polissorbato 80 (Tween® 80) da Synth (São Paulo, Brasil) e água ultrapura a partir do aparato Milli-Q® (Millipore, Billerica, USA). Para os experimentos larvicidas foram utilizadas ração CatChow® (Vevey, Switzerland).

2.2. Material Vegetal

As partes aéreas de *P. polystachyum* foram coletadas no município de Nova Santa Rita, Rio Grande do Sul, Brasil, em janeiro de 2016, sob orientação do botânico Sergio A. L. Bordignon (Universidade La Salle – Canoas, UNILASALLE, Brasil). Um espécime de voucher foi depositado no Herbarium do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Rio Grande do Sul (ICN 157763). As partes aéreas foram mantidas congeladas em freezer à -20°C.

2.3. Manutenção dos Mosquitos

Foram utilizados mosquitos da espécie *A. aegypti* cepa Rockefeller, mantidas no Laboratório de Parasitologia da UFRGS, sob temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12h claro e 12h escuro e umidade relativa do ar 80%. Os mosquitos adultos foram mantidos em gaiolas de 30x30x30 cm, onde foi oferecido como fonte carboidratos uma solução aquosa com mel de abelhas e repasto sanguíneo provindo de ratos.

Para a manutenção constante da criação, a ovoposição ocorreu em substratos de cor escura com a parte interna revestida de papel filtro, sendo este retirado minimamente semanalmente. Os ovos, conseqüentemente foram eclodidos com o auxílio de um equipamento à vácuo, e as larvas mantidas em água filtrada e alimentadas com ração CatChow® triturada e esterilizada em bandejas, no interior de incubadora com demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D), com temperatura e fotoperíodo controladas, nas mesmas condições citadas anteriormente.

2.4. Obtenção do óleo volátil

O óleo essencial foi obtido a partir das partes aéreas, que foram mantidas congeladas até sua utilização. A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação usando um aparelho do tipo Clevenger por 4h, segundo metodologia proposta pela Farmacopeia Brasileira (5ª Ed.). O óleo essencial foi coletado, seco com sulfato de sódio e armazenado em frascos âmbar a 4 ° C até análise.

2.5. Análise do óleo volátil

O óleo foi analisado por cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM), utilizando o cromatógrafo (Shimadzu GC-17A), equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (30 m; 0,25 mm; 0,25 µm, revestida com DB-5). A temperatura foi programada para atingir 300°C, a partir da temperatura de 60°C com o fluxo de 3°C/min. As temperaturas do injetor e do detector foram acertadas em 220°C e 250°C, respectivamente. O cromatógrafo foi equipado com um detector de ionização de chama, enquanto na análise do CG/MS um sistema de espectrofotômetro de massa (MS) quadruplo (QP 5000) operando a 70 eV numa faixa de massa de 40-400 m/z . A composição relativa do óleo foi obtida a partir da integração eletrônica, sem levar em conta fatores de resposta. A identificação de compostos baseou-se numa comparação de índices de retenção¹⁶ (determinada comparados aos tempos de retenção de séries homólogas de n-alcenos), de espectros de massa com os de amostras autênticas e dados da biblioteca NIST GS-MS com a literatura.¹

2.6. Desenvolvimento da nanoemulsão

Foram preparadas duas nanoemulsões, uma contendo os triglicerídeos de cadeia média (TCM) (NE_{TCM}) e outra contendo o óleo essencial da *P. polystachyum* (NE_{óleo}), em ambas as formulações foram utilizados os tensoativos Span® 80 e Tween® 80. A composição das formulações consta descritas na Tabela 1. A fase oleosa da NE_{TCM} composta por Span® 80 e TCM e a fase aquosa composta de água e Tween® 80. Já a NE_{óleo} tem em sua fase oleosa o óleo essencial e o Span® 80 e em sua fase aquosa o Tween® 80 e água. Em ambas as formulações os

compostos da fase oleosa e aquosa foram pesados separadamente e colocados para agitação em agitador magnético por 5 minutos. Após, a fase aquosa foi vertida lentamente à fase oleosa, ainda sob agitação. A emulsão foi mantida sob agitação por 5 minutos. As formulações foram homogeneizadas no homogeneizador de alta velocidade (Ultra-Turrax) ® por 5 minutos a 9500 rpm. Após, ambas foram submetidas ao homogeneizador a alta pressão (HAP) por 10 ciclos a 10000 psi de pressão.³⁰ As nanoemulsões foram preparadas e analisadas em triplicata.

Tabela 1. Composição das nanoemulsões preparadas por homogeneização à alta pressão.

Componente	Composição % (m/v)	
	NE _{TCM}	NE _{óleo}
Óleo essencial PP	-	2,5
TCM	2,5	-
Span 80®	1,0	1,0
Tween 80®	1,0	1,0
Água MiliQ qsp	100	100

2.7. Caracterização das formulações

Tamanho de gotícula, potencial zeta e índice de polidispersão

O tamanho médio das gotículas e índice de polidispersão foram analisados por espectroscopia de correlação de fótons e o potencial zeta determinado por mobilidade eletroforética, usando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instrument, UK) a 25 °C. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

pH

O pH das formulações foi determinado diretamente nas amostras, utilizando o pHgâmetro digital Hanna pH 21 a temperatura ambiente. As análises foram realizadas em triplicatas.

Viscosidade e densidade

A determinação da densidade relativa das formulações foi realizada em picnômetro, de acordo com o preconizado pela Farmacopéia Brasileira (5ed.). A densidade foi calculada através

da diferença entre as formulações e o líquido de referência, a água. A viscosidade das formulações foi aferida com viscosímetro de Ostwald a 23 °C, o qual utiliza como base a lei de Stokes. O tempo do escoamento do líquido de uma marca superior a inferior do tubo capilar foi medido em segundos. Todas as formulações foram analisadas em triplicata e o líquido de referência utilizado foi a água.

Microscopia eletrônica de transmissão

A morfologia das formulações foi conduzida por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As formulações foram depositadas em um grid de cobre revestido de carbono (200 mesh), contrastada com acetato de uranila 2 %, e após seca por 24 h antes da análise. Foi utilizado o equipamento JEM-1200 EXII (JEOL, Tokio, Japan), operando a 80 kV.

Estudos de Estabilidade

A nanoemulsão NE_{óleo} foi monitorada após a preparação e por 15, 30 e 60 dias depois do preparo medindo tamanho de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e viscosidade. As análises foram realizadas em triplicata e as formulações foram vedadas e acondicionadas em geladeira (4 °C) durante todo o experimento.

2.8. Atividade Larvicida

Para a verificação da atividade larvicida do óleo essencial e da nanoemulsão contendo óleo foram testadas 6 concentrações (750 µg/mL até 23,44 µg/mL), diluídas a partir de uma concentração inicial de 7,5 mg/mL, sendo as concentrações selecionadas de acordo com os trabalhos já realizados por Prophiro et al. (2011). O experimento foi realizado por diluição seriada (OMS, 2005). Selecionou-se 25 larvas de *Aedes aegypti* da cepa Rockefeller entre o terceiro e quarto instar de crescimento, por concentração testada, as mesmas foram acondicionadas em câmara climatizada modelo 132FC, ELETROlabor® a 25 °C com umidade relativa de 80% (±10%) durante o tempo de experimento. A mortalidade das larvas foi analisada em 24 e 48h, onde as submersas e incapazes de subir à superfície foram consideradas mortas e as sobrenadantes e com mobilidade foram consideradas vivas. Foram utilizados como controle negativo água e Tween® 80. Os experimentos foram realizados em triplicata em diferentes dias.

2.9. Análise estatística

Para análise estatística dos dados foi aplicado teste *t* de student, em software GraphPad Prism® 6. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise do Óleo essencial de *P. polystachyum*

A análise do óleo essencial de *P. polystachyum* forneceu o cromatograma apresentado na Figura 1, bem como sua composição química na Tabela 2. Ambos os resultados estão em acordo com o relato de Sauter et al. (2011). O rendimento do óleo obtido, a partir de seu peso fresco, foi de 0,17% (w/v). O óleo essencial apresentou um total de 33 compostos, classificados em sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados, sendo o composto majoritário o sesquiterpeno acetato de *E*-sesquilavandulil (35,08 %), seguido por *E*-sesquilavandulol (17,07 %) e beta-cariofileno (13,34 %). As estruturas químicas desses compostos estão apresentadas na Figura 2.

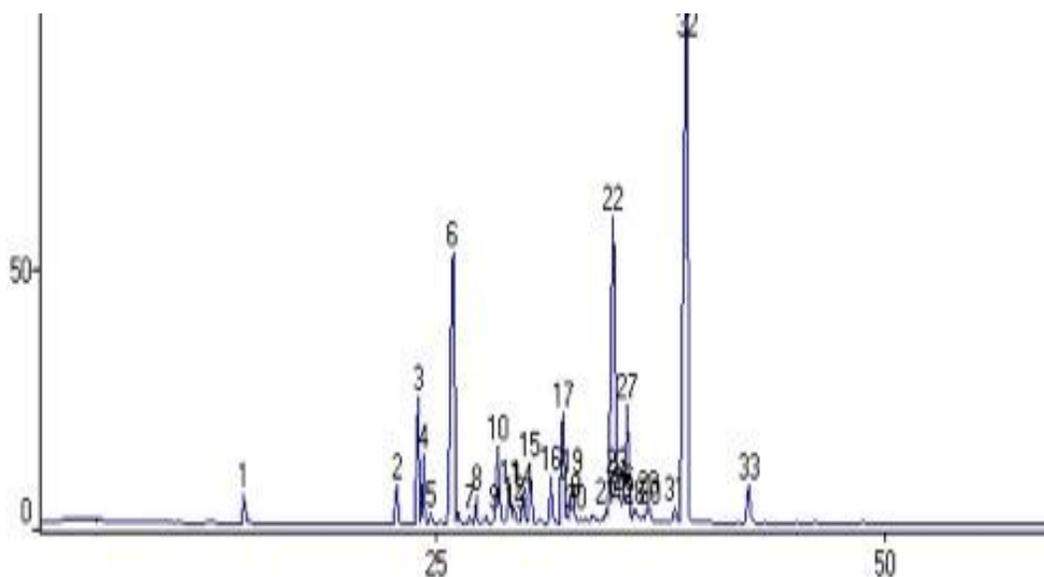


Figura 1. Cromatograma do óleo essencial de *P. polystachyum* por CG-MS.

Tabela 2. Análise percentual dos componentes do óleo de *P. polystchayum* (IR – índice de retenção na coluna DB-5; Ni- não identificado).

Nº	IR	Composto	%
1	1156	Ni	0,81
2	1340	alpha-cubebene	1,03
3	1366	alpha-copaene	3,90
4	1373	beta-bourbonene	2,03
5	1381	beta-elemene	0,22
6	1408	beta-caryophyllene	13,34
7	1429	Aromadendrene	0,21
8	1437	alpha-humulene	0,69
9	1461	gamma-muurolene	0,15
10	1464	germacrene D	2,18
11	1478	Bicyclogermacrene	0,96
12	1483	alpha-muurolene	0,42
13	1486	germacrene A	0,21
14	1494	gamma-cadinene	0,82
15	1505	delta-cadinene	1,84
16	1535	Elemol	1,39
17	1552	E-nerolidol	3,29
18	1565	Spathulenol	0,38
19	1568	caryophyllene oxide	1,05
20	1571	Globulol	0,12
21	1616	1-epi-cubenol	0,34
22	1627	E-sesquilavandulol	17,07
23	1631	tau-cadinol	2,64
24	1635	tau-muurolol	0,48
25	1638	alpha-muurolol	0,47
26	1641	beta-eudesmol	1,00
27	1646	alpha-cadinol	5,17
28	1657	Ni	0,14
29	1675	Khusinol	0,62
30	1679	Ni	0,32
31	1714	Z-sesquilavandulyl acetate	0,47
32	1732	E-sesquilavandulyl acetate	35,18
33	1824	Ni	1,09
Total			100,03

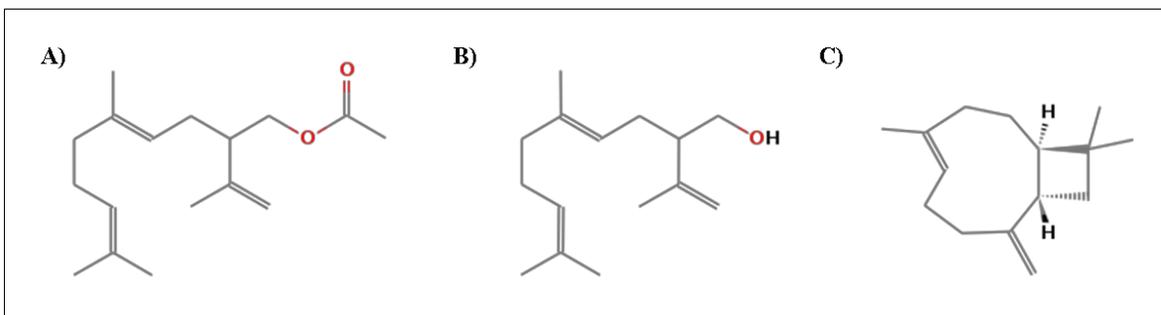


Figura 2. Estrutura química dos compostos majoritários **A)** acetato de *E*-sesquilavandulil; **B)** *E*-sesquilavandulol; **C)** beta-cariofileno. Fonte: NIST (National Institute of Standards and Technology).

3.2. Desenvolvimento das formulações

Pré-Formulação

Inicialmente foi desenvolvido um estudo de pré-formulação, com dois diferentes métodos de produção das nanoemulsões, avaliando as características físico-químicas das mesmas. Foram utilizados os métodos de produção por Ultra-Turrax® e por Homogeneizador a Alta Pressão (HAP). Como apresentado na Figura 3, a formulação obtida por meio de homogeneizador de alta velocidade (Ultra-turrax®) apresentou tamanho de gotícula de 230 nm, superior a formulação do HAP (inferior a 100 nm). Somado a isso, apresentou-se visualmente instável, uma vez que o conteúdo do óleo ficou na fase superior da formulação. De acordo com a Figura 3, após a passagem pelo HAP houve uma diminuição significativa no tamanho de gotícula, indicando que esta técnica produziu gotículas menores, além de um aspecto leitoso. No entanto, o índice de polidispersão ficou abaixo de 0,3 para as duas formulações, demonstrando que ambas as técnicas produziram formulações monodispersas. Outro parâmetro analisado foi o potencial zeta, que apresentou-se negativo para ambas as técnicas utilizadas: -44 mV e -37 mV para homogeneização utilizando ultraturrax e alta pressão, respectivamente. Para dar continuidade aos experimentos foi escolhida a técnica de HAP para a produção das nanoemulsões, por apresentar menor diâmetro de gotícula e índice de polidispersão.

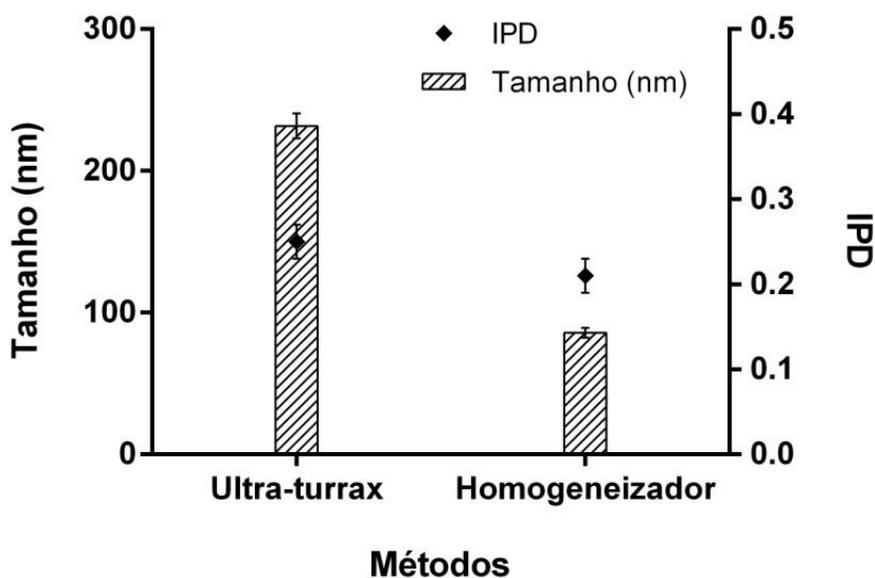


Figura 3. Gráfico do tamanho de gotícula e índice de polidispersão das formulações desenvolvidas por Ultra-turrax® e homogeneização à alta pressão.

Características físico-químicas das nanoemulsões

As nanoemulsões NE_{TCM} e NE_{Óleo} foram preparadas por HAP e as características físico-químicas apresentadas na Tabela 3. O tamanho médio das gotículas de ambas as formulações foi de 85 nm, não apresentando diferença significativa entre elas ($p < 0,05$). Esse resultado demonstra a influência do método de obtenção das nanoemulsões (HAP) e os parâmetros utilizados (pressão, temperatura e números de ciclos) que auxiliam na obtenção de menores gotículas². Esse tamanho de gotícula encontrado pode conferir maior estabilidade à formulação, além de conferir a característica de aspecto leitoso as nanoemulsões.^{15,30,33}

O índice de polidispersão (IPD) foi inferior a 0,3 em ambas as formulações, indicando formulações monodispersas; contudo houve diferença significativa entre as duas ($p > 0,05$). Sendo a NE_{Óleo} com menor IPD que a NE_{TCM}.

Tabela 3. Características físico-químicas das nanoemulsões.

	NE _{TCM}	NE _{óleo}
Tamanho (nm)	84,99 ± 0,33	85,77 ± 1,76
IPD	0,274 ± 0,02 *	0,213 ± 0,02 *
Potencial Zeta (mV)	-25,6 ± 3,76 *	-37,073 ± 2,31 *
Densidade (g/mL)	1,0043 ± 0,03	0,9285 ± 0,08
Viscosidade (mPa.s)	0,9098 ± 0,004 *	0,9569 ± 0,02 *
pH	5,34 ± 0,02 *	5,16 ± 0,07 *

* p < 0,05

O potencial zeta é um parâmetro que pode ser influenciado pelo método de preparo e pelos componentes da formulação, que são relevantes na composição da carga da interface o que é demonstrado pela diferença estatística apresentada entre a formulação contendo TCM e o óleo da *P. polystachyum* (p<0,05). O potencial zeta fortemente negativo pode estar relacionado ao fato do óleo essencial possuir como constituintes os sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados que possuem carga residual negativa, garantindo boa estabilidade à formulação pela maior repulsão causada por essas cargas²⁷. A densidade e viscosidade das formulações apresentaram valores próximos ao da água, em função da composição das nanoemulsões, que é em grande parte composta por água. O pH também não diferiu entre as duas formulações (p>0,05).

A morfologia das gotículas de óleo das nanoemulsões preparadas por HAP foram analisadas em MET e estão apresentadas na Figura 4. As fototomografias revelam gotículas homogêneas e esféricas em ambas as formulações, mostrando que as mesmas apresentam um tamanho médio nanométrico, corroborando com os resultados de tamanho apresentados na Tabela 3.

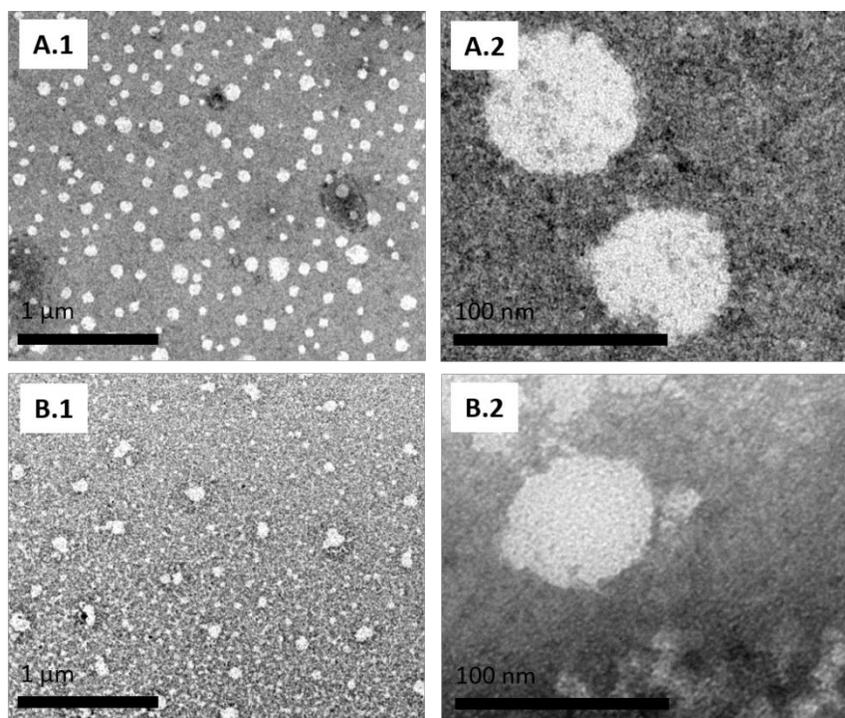


Figura 4. Fotomicrografias das nanoemulsões no MET a 80 kV. **A.1.** NE_{TCM} aumento 20 K, **A.2.** NE_{TCM} aumento 300 K, **B.1.** NE_{PP} aumento 20 K, **B.2.** NE_{PP} aumento 300 K.

3.2.1. Estabilidade da NE_{óleo}

O acompanhamento da formulação foi realizado por 60 dias, considerando os parâmetros de potencial zeta, índice de polidispersão, tamanho de gotícula e viscosidade. Durante esse período, foi avaliado no dia 0, sendo esse o dia da preparação da mesma, 15, 30 e 60 dias^{3,5}. Os resultados apresentados nos gráficos da Figura 5.

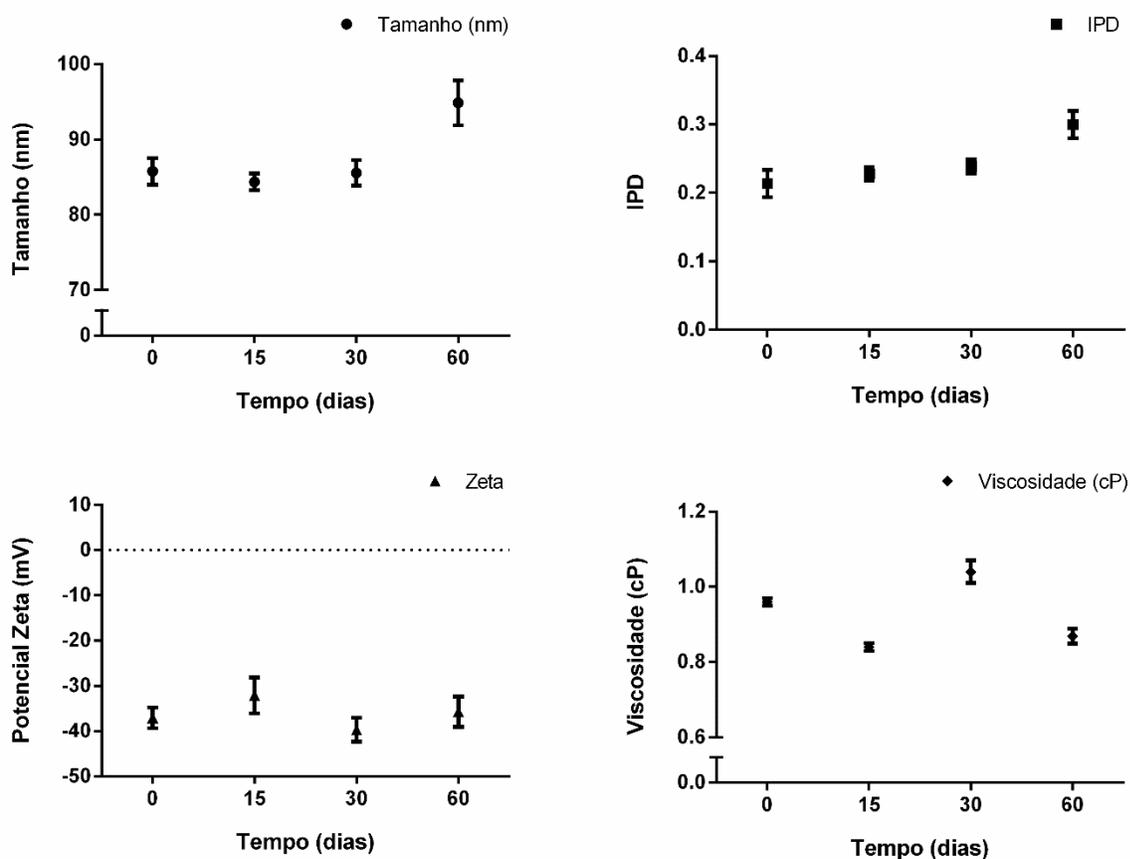


Figura 5. Gráficos de estabilidade da formulação em 0, 15, 30 e 60 dias nos parâmetros tamanho de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e viscosidade.

Conforme dos gráficos apresentados na Figura 5, observou-se que as formulações apresentaram boa estabilidade em relação aos parâmetros físico-químicos, demonstrando pouca variação nas análises inter-dias. A formulação apresentou-se estável durante 60 dias, onde o potencial zeta, índice de polidispersão e viscosidade não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) em comparação ao tempo zero. No entanto, após os 30 dias de acondicionamento, o tamanho de gotícula demonstrou um pequeno aumento. Entretanto, essa mudança é comum de ocorrer em nanoemulsões em decorrência do movimento browniano.^{19,31} Visualmente também, a formulação apresentou estabilidade mantendo seu aspecto e odor característico pelo conteúdo do óleo durante o tempo de análise.

3.3. Atividade Larvicida do Óleo essencial

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2005), para um produto ser considerado ativo frente a cepas de *A. aegypti* em 24h ele deve apresentar mais de 50 % de mortalidade e em 48h mais de 90 %. De acordo com a Figura 6, nas primeiras 24 horas, o óleo essencial de *P. polystachyum* apresentou mortalidade superior a 50 % nas concentrações de 750 e 375 $\mu\text{g/mL}$, onde a mobilidade das larvas foi notoriamente maior conforme o decréscimo das concentrações. Após 48 horas, o perfil foi mantido, observando-se uma tendência dose-resposta e tempo-resposta do óleo, chegando a valores em torno de 85 % para a maior concentração. Assim, esses resultados demonstram o potencial larvicida do óleo considerando-se que uma mortalidade próxima a 90 % foi observada.

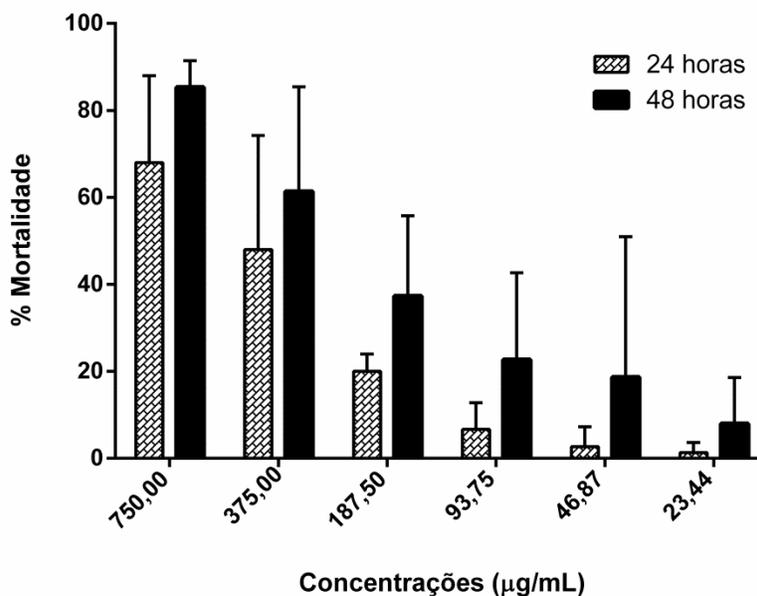


Figura 6. Atividade larvicida do óleo essencial de *P. polystachyum* em função da concentração no período de 24 e 48 horas.

Recentemente, Sauter e colaboradores (2011) já haviam demonstrado o potencial deste óleo contra amebas do gênero *Acanthamoeba* spp., assim como Ródio e col. que em 2008 também testaram essa mesma espécie contra cepas de *Acanthamoeba castellanii*. De acordo com dados da literatura, os sesquiterpenos são compostos promissores, com diversas atividades demonstradas, como: antiparasitárias²¹, antifúngica¹³, gastroprotetora¹⁷, antibacteriana²².

O sesquiterpeno majoritário deste óleo, o acetato de *E*-sesquilavandulil aparece, geralmente, em baixas quantidades em óleos essenciais, embora já tenha sido observado em maiores quantidades por Siminionatto e col. (2007) na espécie *Pluchea quitoc*. Para os outros compostos majoritários do óleo existem trabalhos evidenciando atividade inseticida, como em 2015, que Polatoğlu e col. atribuíram ao *E*-sesquilavandulol a atividade contra *Sitophilus granarius* (caruncho-do-trigo). Mais recentemente, um trabalho publicado por Rodrigues et al. (2014) descreveu a atividade larvicida do beta-cariofileno contra cepas de *A. aegypti*.

3.4. Atividade Larvicida da Nanoemulsão

Os mesmos critérios foram considerados para avaliação da atividade larvicida da nanoemulsão. A NE_{óleo} foi diluída de forma que a mesma faixa de concentrações fosse atingida.

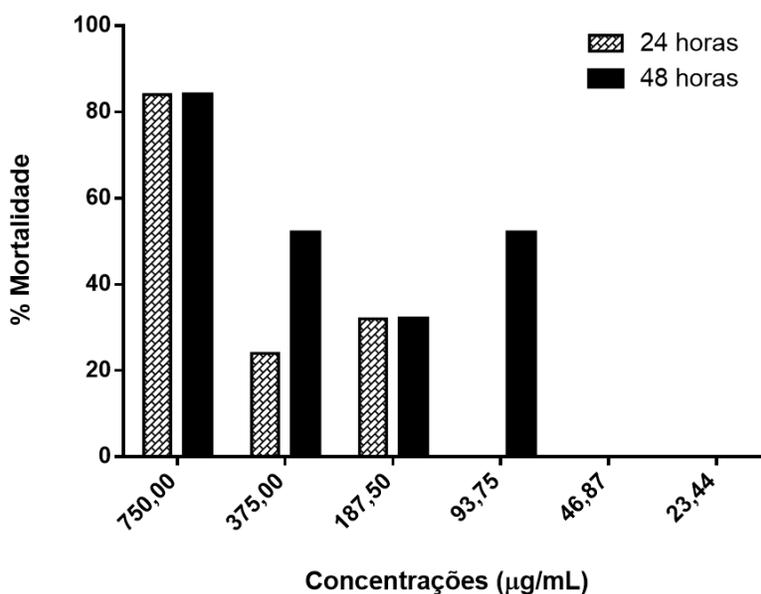


Figura 7. Atividade larvicida da NE_{óleo} em função da concentração no período de 24 e 48 horas.

Durante o teste realizado com a nanoemulsão, a maior concentração testada (750 µg/mL) apresentou mortalidade próxima dos 80 % nas primeiras 24 horas, não ultrapassando essa marca em 48 horas. Também foi observado que, em menores concentrações houve desenvolvimento larval, onde, em algumas concentrações em 48h as larvas evoluíram para o estágio de pupa.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos se observou que o perfil de compostos do óleo essencial de *P. polystachyum* se manteve de acordo com a literatura, tendo como composto majoritário o acetato de *E*-sesquilandulil. O método de produção da nanoemulsão por HAP mostrou-se satisfatório, dando origem a nanoemulsão com tamanho de gotículas esféricas em torno de 85 nm, monodispersas com potencial zeta de aproximadamente -37 V. A formulação manteve-se estável durante o período de 60 dias. O óleo essencial apresentou potencial atividade larvicida em torno de 85 %. A nanoemulsão em teste prévio apresentou atividade de pouco mais de 80 %. Para a confirmação do perfil da atividade da nanoemulsão mais testes serão realizados.

5. REFERÊNCIAS

1. Adams, Robert P. Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4. ed. Gruver: Allured Pub Corp, 2007. 804 p.
2. Almeida, M. E.; Teixeira, H. F.; Koester, L.S.; *Lat. Am. J Pharm.* **2008**, 5, 27, p.780-88.
3. Anuchapreeda, S. J. *Nanotchnol.* **2012**, 9, p.1-9.
4. ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira, volume 1.** 5a Ed. Brasília, 2010b.
5. Balasubramani, S. *Environ Sci Pollut Res*, **2017**, 17, p. 15125-15133
6. Bhatt, S.; Gething, P. W.; Brady, O. J.; *Nature* **2013**, 7446, n. 496, p.504-507.
7. Boletim Epidemiológico Monitoramento Dengue, Chikungunya e Febre pelo Zika vírus. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ano V, n. 48, 1ª à 19a semanas epidemiológicas, jan. / mai. 2017.
8. Braga, I.A.; Valle, D.; *Epidemiologia e Serviços de Saúde* **2007**, 4, 16, p.279-93.
9. Bruxel, F et al.; *Quim. Nov.* **2012**, 35, n. 9, p.1827-1840
10. Ciccía, G.; Coussiob, J.; Mongellib, E.; *J. Ethnopharmacol.* **2000**, 1-2, 72, p.185-89.
11. Debenedetti et al., *Fitoterapia*, **1994**, 65, p. 188-189.
12. Duarte, J.L. et al.; *Rev. Bra. Farmacog.* **2015**, 25, p. 189-192.
13. Duraipandiyar, V. et al; *Bmc Complement. Altern. Med.* **2012**, 12, n. 1, p.1-6.
14. ESTADOS UNIDOS. Center For Disease Control and Prevention. **Dengue: Epidemiology.** 2014. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/>>. Acesso em: 17 jan. 2017.
15. Gupta, A. et al. *Soft matter* **2016**, 12, p.2826-2841.
16. Kovats, E. *Helv. Chim. Acta.* **1958**, 41, p.1915-1932.
17. Lemos, M. et al.; *Rev. Bra. Farmacog.* **2015**, 25, 3, p.238-45.
18. Lima, L.F.P.; Matzenbacher, N.I.; *Iheringia: Série Botânica* **2008**, 63, 2, p.213-229.
19. Mason, T.G., *J. Phys.: Condens. Matter* **2006**, 18, P.635-666.

20. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005.
21. Oliveira, R. N. et al.; *Biomed. Pharmacother.* **2017**, 90, p.813-20.
22. P., Patil S.; T., Kumbhar S. *Biochem. Biophys. Rep.* **2017**, 10, p.76-81.
23. Polatoğlu, K. et al.; *Ind. Crops Prod.* **2015**, 71, p.7-14.
24. Prophiro, J. S. et al.; *Parasitol. Res.* **2011**, 110, 2, p.713-19.
25. Rodio. C. et al. *Parasitol Res.* **2008**. 104. P.191-194
26. Rodrigues, E. C. et al.; *Rev. Bra. Farmacog.* **2014**, 24, 6, p.699-705.
27. Salvia-Trujillo, L. et al.; *Food Hydrocoll.* **2015**, 43, p.547-56.
28. Santos, G. K. N. et al.; *Ind. Crops Prod.* **2012**, 40, p.254-60.
29. Sauter, I. P. et al.; *Parasitol. Res.* **2011**, 109, 5, p.1367-1371.
30. Schuh, R. S.; Bruxel, F.; Teixeira, H. F.; *Quim. Nov.* **2014**, p.1193-1198.
31. Setya, S. et al., *World J. Pharm. and Pharmaceutical Sciences*, **2013**, 3, p. 2214-2228.
32. Simionatto, E. et al., *J. Essen. Oil Res.* **2007**, 19, 494-97.
33. Teixeira, M.C. et al.; *Saudi Pharm. J.* **2017**, 25, 2, p.231-35.
34. Vera, N., B. A., Catalan C.A., Gedris T.E. and Herz W.; *Planta Med.* **2001** 67, 674-77.
35. World Health Organization. **Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides**. 13 ed. Genebra, 2005.
36. World Health Organization. **Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control**. WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1 (World Health Organization, 2009)
37. Zardini, E.M., *Lat. Am. J. Pharm.* **1984** 3, 77-99.
38. Zorzi, G. K. et al.; *Rev. Bra. Farmacog.* **2015**, 25, 4, p.426-36.

ANEXOS

Graphical Abstract

Insira aqui a imagem do Graphical Abstract (textos dentro da imagem devem ser em inglês)

Insira aqui o texto descritivo do Graphical Abstract (de 2 a 3 linhas, em inglês)

A REAÇÃO DE METÁTESE DE OLEFINAS: REORGANIZAÇÃO E CICLIZAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS título: todas as letras maiúsculas

José A. Benício^a, Maria C. Cavalcante^b e João D. de Almeida^{a*} marcar com asterisco o autor que submeteu o artigo

^aAqui vai o endereço. Lembre-se de que a menor unidade usada deve ser o departamento (não citar laboratório, grupo, programa de pós-graduação etc), depois instituto (se houver), depois universidade. Sempre tudo por extenso. Exemplo: Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

^bCaso haja autores de outro instituto, separar os autores por endereço, como foi feito aqui. Nesse caso, aqui entra o endereço de Maria C. Cavalcante

-----*marque uma alternativa, não apague o texto em azul*-----

() Manuscrito com material suplementar

() Manuscrito sem material suplementar

*e-mail: insira aqui o email do autor que submeteu o artigo

THE OLEFIN METATHESIS REACTION: REORGANIZATION AND CICLIZATION OF ORGANIC COMPOUNDS título em inglês do seu manuscrito, com todas as letras maiúsculas e sem negrito

Aqui deve ser escrito o abstract do seu artigo, não se esqueça de que ele deve apresentar no máximo 200 palavras.

Keywords: keyword1; keyword2; keyword3. insira entre 3 e 5 keywords

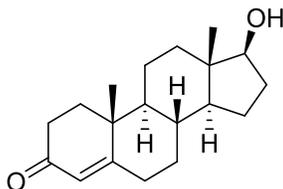
INTRODUÇÃO

Os títulos da seção são escritos com todas as letras maiúsculas e em negrito. Deve haver espaçamento antes e depois do título da seção.

Subtítulo1 **subtítulo**– **Apenas a 1ª letra maiúscula, em negrito. Deve haver espaçamento antes e depois do subtítulo**

Aqui entra o seu texto. Caso haja alguma citação a ser feita, ela deve seguir este padrão.¹ Caso queira citar um intervalo de três ou mais referências em sequência, use dessa forma.²⁻⁴ Quando forem apenas duas ou não estiverem em sequência, usar a vírgula.^{1,3,5} Repare que todas elas aparecem logo após a pontuação e não apresentam espaços. A Química Nova não publica notas de rodapé. Quaisquer notas do autor devem ser incluídas na lista de referências e, no texto, devem seguir o mesmo padrão das citações, mantendo inclusive a sequência numérica. Esta é uma nota do autor, que estará na posição 6 da lista de referências e não no rodapé da página.⁶

Como pode perceber, os parágrafos não apresentam tabulações. Favor manter esse padrão durante todo o texto. Caso queira inserir uma figura, seguir o padrão como na Figura 1.



Testosterona (C₁₉H₂₈O₂)

Figura 1. A descrição da figura deve ter esse formato. Em itálico e sem ponto final

Todas as figuras devem ser incluídas no texto, logo após serem citadas pela primeira vez. No caso de estruturas químicas, utilize o estilo ACS, disponível para diversos editores de moléculas e descrito em detalhes aqui: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-2006-STYG.ch017>

Tabelas também são indicadas como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Siga esse padrão. O título em negrito e a descrição do título sem negrito ou itálico.

Não colocar ponto final

Ao final do rodapé das tabelas: deve ter ponto final.

Deve haver espaço entre número e unidade (por exemplo, 1 h) e as unidades devem ser abreviadas.

Termos ou expressões em inglês ou em latim – em itálico

Subtítulo2

Sub-subtítulo *Sub-subtítulo de seção só a 1ª em maiúscula e em itálico. Deve haver espaçamento apenas antes do sub-subtítulo, não depois.*

As figuras (incluindo gráficos, esquemas, etc) deverão ser em número máximo de 7 figuras e ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). Para número maior, utilizar o Material Suplementar. A resolução mínima é de 300 dpi. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente, além de boa qualidade gráfica

Outro subtítulo do trabalho

Outro sub-subtítulo do trabalho

PARTE EXPERIMENTAL

Primeiro subtítulo da parte experimental

Primeiro sub-subtítulo da parte experimental

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiro subtítulo dos resultados e discussão

Primeiro sub-subtítulo dos resultados e discussão

CONCLUSÃO

MATERIAL SUPLEMENTAR

Quando houver material suplementar, ele deve ser indicado aqui, com a descrição do material, similar a: Algumas imagens dos sistemas utilizados neste trabalho estão disponíveis em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos vão aqui. Caso queira agradecer a uma pessoa, apenas o último sobrenome deve ser por extenso, por exemplo A. B. Cardoso.

REFERÊNCIAS

Artigo:

1. Tavares, L. C.; *Quim. Nova* **2004**, 27, 631.

Artigo de uma revista de difícil acesso – deve-se citar o número de Chemical Abstract

2. Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, 19, 708. (CA 85:78051s).

Artigo com número de DOI, mas sem a referência completa:

3. Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

Patentes - na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses:

4. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho 79 73,771 1979*. (CA 91:P193174v)

5. Kadin, S.B.; *US pat. 4,730,004 1988*. (CA 110:P23729y)

6. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T. *Br PI 9.604.468-3, 1999*.

Livro com editor(es):

7. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

Livro sem editor(es):

8. Cotton, F. A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (*Softwares*):

9. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses e dissertações:

10. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Material apresentado em Congressos:

11. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas de Internet:

12. <http://www.s bq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo.

Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

P.S.: os títulos dos periódicos devem ser abreviados. Antes da submissão do trabalho, por favor, confira se as abreviaturas estão corretas no website: <http://cassi.cas.org>. Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada com a ferramenta CASSI, deve-se citar o título completo.

Se a referência for livro, lembre-se de que é necessário indicar editora, cidade e ano de publicação.

MATERIAL SUPLEMENTAR

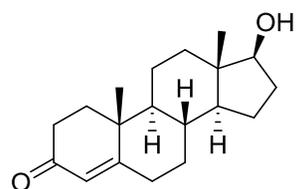
Caso seu manuscrito contenha material suplementar, escreva aqui, após as referências, o texto e também insira as figuras, tabelas e esquemas. Não esqueça que as legendas das figuras e títulos das tabelas se diferenciam das do texto principal por conter a letra S. Por exemplo:

Tabela 1S. Siga esse padrão. O título em negrito e a descrição do título sem negrito ou itálico.

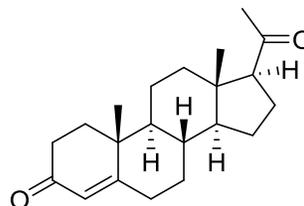
Não colocar ponto final

Ao final do rodapé das tabelas: deve ter ponto final.

Exemplo de figura:



Testosterona (C₁₉H₂₈O₂)



Progesterona (C₂₁H₃₀O₂)

Figura 1S. A descrição da figura deve ter esse formato. Em itálico e sem ponto final

Atenção: As figuras e tabelas devem ser inseridas no texto, como indicado neste template, mas também devem ser inseridos os arquivos originais separadamente na plataforma ScholarOne. Todas as figuras devem ter alta resolução. Figuras em baixa resolução causam atrasos na publicação de seu trabalho. Para mais detalhes, consultar as “Instruções para Autores” em nosso website.