



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**GRECE APARECIDA SENHORINI**

**MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PHBV E EMULSÕES CONTENDO  
EXTRATO VEGETAL DE *Carapa guianensis*: DESENVOLVIMENTO,  
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO**

**CURITIBA**

**2010**

GRECE APARECIDA SENHORINI

MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PHBV E EMULSÕES CONTENDO  
EXTRATO VEGETAL DE *Carapa guianensis*: DESENVOLVIMENTO,  
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Orgânica, Departamento de Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Marques.

Co-orientadora: Profa. Dra. Sônia Faria Zawadzki.

CURITIBA  
2010

## TERMO DE APROVAÇÃO

GRECE APARECIDA SENHORINI

MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PHBV E EMULSÕES CONTENDO  
EXTRATO VEGETAL DE *Carapa guianensis* : DESENVOLVIMENTO,  
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Marques  
Departamento de Química, UFPR

Co-orientadora: Profa. Dra. Sônia Faria Zawadzki  
Departamento de Química, UFPR

Profa. Dra. Maria Élide Alves Stefanello  
Departamento de Química, UFPR

Prof. Dr. Maurício Ursi Ventura  
Departamento de Agronomia, UEL

**Curitiba, 23 de abril de 2010**

Aos meus pais Luiz Fernando e Lenita, à  
minha irmã Fernanda e ao meu noivo Eduardo  
pelo apoio e amor incondicional. Vocês foram,  
sem dúvida, meus alicerces e meu incentivo  
nesta árdua caminhada. Obrigada!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, Nossa Senhora Aparecida e Santo Antônio por estarem sempre presentes em minha vida fortalecendo-me.

Aos professores Francisco de Assis Marques e Sônia Faria Zawadzki, pela oportunidade que me foi dada em realizar esse trabalho, pela transferência de seus conhecimentos, pela dedicação e amizade, que foram fundamentais para a concretização dessa dissertação.

Ao professor Paulo Vítor Farago, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), pelos ensinamentos e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Sandra Zanin (UFPR), Maurício Ursi Ventura (UEL), Mário Antônio Navarro da Silva (UFPR) e Eduardo Novaes Ramires (Universidade Tuiuti do Paraná), por contribuírem, com a realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná que contribuíram, de alguma forma, para minha formação acadêmica.

Aos funcionários e técnicos dos laboratórios dos Departamentos de Química e Farmácia da Universidade Federal do Paraná pelo apoio sempre que preciso.

Aos colegas de laboratório e de disciplinas pela amizade, companheirismo e ajuda nos momentos que precisei. Não citarei nomes para não correr o risco de esquecer alguém.

À minha amiga Simone pela ajuda e apoio em todos os momentos desse mestrado e fora dele.

Aos meus pais e minha irmã pelo apoio moral e amor incondicional para continuidade dos meus estudos. Obrigada por sempre acreditarem no meu potencial e se orgulharem de mim.

Ao meu noivo, Eduardo Mayrhofer Sargi, pelo companheirismo, paciência, cumplicidade, amizade e principalmente amor incondicional e carinho nos momentos mais difíceis dessa caminhada. Obrigada por sempre acreditar no meu potencial e se orgulhar de mim.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos membros da Banca pela contribuição ao participarem da defesa desta dissertação.

“ Se você não encontrar o sentido das coisas é porque este não se encontra, se cria.”

(Antoine Saint Exupéry)

## RESUMO

Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV), um poliéster biodegradável e biocompatível e interessante do ponto de vista ambiental e medicinal, foi utilizado na confecção de micropartículas poliméricas e misturas físicas contendo óleo de andiroba e sem o mesmo. Emulsões estáveis, sistemas heterogêneos compostos por dois líquidos imiscíveis que adquirem a estabilidade em presença de um tensoativo ou par de tensoativos, também foram preparadas com o óleo de andiroba e na ausência do mesmo. A técnica usada no processo tecnológico de microencapsulação foi emulsão seguida de evaporação do solvente orgânico. Diversas técnicas de caracterização foram utilizadas: IVTF; DRX; CED; ATG-ATD; MEV e análise granulométrica. A eficiência de encapsulação do óleo de andiroba e os estudos de liberação *in vitro* do mesmo foram avaliados por espectrofotometria na região do ultravioleta e visível (UV-Vis). Estudos de estabilidade física e microscopia ótica das emulsões foram efetuados com a finalidade de determinar o tempo de vida útil (*shelf-life*) destes sistemas. Os resultados confirmaram que o óleo de andiroba foi encapsulado e que foram obtidas micropartículas do tipo microesferas. As emulsões desenvolvidas se mostraram estáveis por um período de três meses. As micropartículas e as emulsões preparadas com o óleo de andiroba foram avaliadas frente à algumas pragas, tendo em vista que o óleo em questão, extraído das sementes da espécie de árvore *Carapa guianensis* Aublet, pertencente à família Meliaceae, é descrito na literatura por possuir propriedades inseticidas, atividade esta atribuída aos limonóides presentes.

**Palavras-chave:** Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV), óleo de andiroba, micropartículas poliméricas, emulsões estáveis, controle de pragas.

## ABSTRACT

Poly(hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate) (PHBV), a biodegradable and biocompatible polyester and interesting of the environmental and medicinal view, was employed for the preparation of polymeric microparticles and physical mixtures containing andiroba oil and without him. Stable emulsions, heterogeneous systems constituted by two imicible liquids that acquire the stability in presence of a surfactant or of pair surfactant also were prepared with andiroba oil and without the same. Unloaded and loaded microparticles containing andiroba oil were prepared using simple emulsion oil-in-water (o/w) followed by solvent evaporation. Several characterization techniques were used: FTIR; XRD; DSC; TGA-DTA; SEM and particle size analysis. The encapsulation efficiency and *in vitro* release studies of the andiroba oil were evaluated by UV-Vis spectroscopy. Physical stability and optical microscopic studies of the emulsions were made with the goal of to determine the shelf-life of these systems. The results confirmed that the andiroba oil was encapsulated and that were obtained microparticles of the type microspheres. The emulsions developed showed stable for a period of three months. Microparticles and the emulsions prepared with the andiroba oil were evaluated against some pests, in view of that the oil in question, extracted of the *Carapa guianensis* Aublet seeds, belonging to Meliaceae family, is described in the literature by to have insecticides properties, activity this assigned to limonoids present.

**Keywords:** Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate) (PHBV), andiroba oil, polymeric microparticles, stable emulsions, pest controls.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA1</b> – ADULTO PERTENCENTE À ESPÉCIE <i>L.intermedia</i> (ARANHA-MARROM).....	5
<b>FIGURA2</b> – LESÃO CUTÂNEA CAUSADA PELO ATAQUE DE ARANHAS-MARROM.....	6
<b>FIGURA3</b> – MOSQUITO DA DENGUE.....	7
<b>FIGURA4</b> – CICLO DE VIDA DO <i>A. aegypti</i> .....	7
<b>FIGURA5</b> –CASOS DE DENGUE NOTIFICADOS NO BRASIL DE 1990 A 2009.....	10
<b>FIGURA6</b> –DISTRIBUIÇÃO DOS ESTADOS POR ÁREAS DE INCIDÊNCIA DE DENGUE NO BRASIL EM 2007 .....	10
<b>FIGURA7</b> –FÓRMULAS ESTRUTURAIS DE ALGUNS LIMONÓIDES: A) GEDUNINA E B) DEACETILGEDUNINA (R: OH).....	14
<b>FIGURA8</b> – FÓRMULA ESTRUTURAL DO ISOPRENO.....	14
<b>FIGURA9</b> –A ESPÉCIE <i>carapa guianensis</i> Aublet.....	15
<b>FIGURA10</b> –SEMENTES DA ANDIROBA.....	15
<b>FIGURA11</b> –ESTRUTURA DE ALGUNS LIMONÓIDES PRESENTES NO ÓLEO DE ANDIROBA: (1) 17 $\beta$ -HIDROXIAZADIRADIONA; (2) GEDUNINA; (3) 6 $\alpha$ - ACETOXIGEDUNINA; (4) 7-DESACETOXI-7-OXOGEDUNINA E (5) XILOCENSINA K.....	18
<b>FIGURA12</b> –TIPOS DE NANO/MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	21
<b>FIGURA13</b> –REAÇÃO DE HIDRÓLISE QUE OCORRE NOS POLIÉSTERES: MECANISMO.....	23
<b>FIGURA 14</b> –FOTOMICROGRAFIA DE BACTÉRIAS CONTENDO PHA’S... 24	24
<b>FIGURA 15</b> –FÓRMULA ESTRUTURAL DO PHBV.....	25
<b>FIGURA 16</b> –MICROSCOPIA ÓTICA DE UMA EMULSÃO.....	26
<b>FIGURA17</b> –FÓRMULAS ESTRUTURAIS DOS COMPONENTES QUE CONSTITUEM O INGREDIENTE ATIVO ABAMECTINA.....	33
<b>FIGURA18</b> –A) FÓRMULA ESTRUTURAL IMIDACLOPRIDO E B) FÓRMULA ESTRUTURAL BETA-CIFLUTRINA.....	33
<b>FIGURA 19</b> –LARVAS DO MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i> .....	41
<b>FIGURA 20</b> –ESQUEMA DE BIOENSAIO LARVICIDA REALIZADO PARA O <i>Aedes aegypti</i> COM MICROPARTÍCULAS CONTENDO ÓLEO DE ANDIROBA: MP2 (30% DE ÓLEO m/m); MP3 (50% DE ÓLEO m/m) E MP4 (70% DE ÓLEO m/m).....	42
<b>FIGURA21</b> –A) FÓRMULA ESTRUTURAL DO TWEEN 80 E B) FÓRMULA ESTRUTURAL DO SPAN 60.....	44
<b>FIGURA22</b> –EMULSÃO ESTÁVEL DE ÓLEO VEGETAL DE <i>C. guianensis</i> .....	45
<b>FIGURA 23</b> –SEPARAÇÃO DE FASES.....	45
<b>FIGURA24</b> –A) FÓRMULA ESTRUTURAL DO NIPAGIN M E B) FÓRMULA ESTRUTURAL DO NIPASOL P.....	46
<b>FIGURA25</b> –ASPECTO DA EMULSÃO OBTIDA SEM ÓLEO (“CONTROLE NEGATIVO”).....	46
<b>FIGURA 26</b> –FOTOGRAFIAS CORRESPONDENTES ÀS EMULSÕES MAIS ESTÁVEIS OBTIDAS.....	51
<b>FIGURA 27</b> –ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO ÓLEO DE ANDIROBA; DO POLÍMERO PHBV PURO; DAS MICROPARTÍCULAS SEM ÓLEO (MP1); DA MISTURA FÍSICA (MF2) (50%) E DAS	

MICROPARTÍCULAS CONTENDO O ÓLEO (MP4) (70%).....	56
<b>FIGURA28</b> –DIFRATOGRAMAS DO PHBV PURO; DAS MICROPARTÍCULAS SEM O ÓLEO (MP1) (GRUPO CONTROLE); DA MISTURA FÍSICA (MF2) (50%); DAS MICROPARTÍCULAS CONTENDO O ÓLEO (MP4) (70%).....	57
<b>FIGURA29</b> –CURVAS DE CED DO POLÍMERO PURO (PHBV); DAS MICROPARTÍCULAS SEM ÓLEO (MP1); DA MISTURA FÍSICA (MF2) (50%); E DAS MICROPARTÍCULAS CONTENDO O ÓLEO EM QUANTIDADES CRESCENTES (MP2, MP3 E MP4) (30%, 50% E 70%), RESPECTIVAMENTE.....	58
<b>FIGURA30</b> –TERMOGRAMAS OBTIDOS POR ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL: A)PHBV PURO; B) ÓLEO DE ANDIROBA; C)MISTURA FÍSICA ENTRE PHBV E ÓLEO (MF2) (50%); D) MICROPARTÍCULAS SEM ÓLEO (MP1) E E) MICROPARTÍCULAS CONTENDO O ÓLEO (MP4) (70%).....	59
<b>FIGURA31</b> –FOTOMICROGRAFIAS DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS: A) SEM ÓLEO (MP1) (AUMENTO 1KX); B)CONTENDO O ÓLEO (MP2) (30%) (AUMENTO 2KX); C) CONTENDO O ÓLEO (MP3) (50%) (AUMENTO 1KX) E D) CONTENDO O ÓLEO (MP4) (70%) (AUMENTO 2KX).....	62
<b>FIGURA 32</b> –FOTOMICROGRAFIAS DAS MISTURAS FÍSICAS: A) FILME PHBV PURO (MF) (AUMENTO 2KX); B)CONTENDO O ÓLEO (MF1) (30%) (AUMENTO 2KX); C) CONTENDO O ÓLEO (MF2) (50%) (AUMENTO 2KX) E D) CONTENDO O ÓLEO (MF3) (70%) (AUMENTO 2KX).....	63
<b>FIGURA33</b> –FÓRMULAS ESTRUTURAIS DOS LIMONÓIDES: A) 6 $\alpha$ -ACETOXIGEDUNINA E B) GEDUNINA.....	66
<b>FIGURA34</b> –CROMATOGRAMA DOS LIMONÓIDES E DO ÓLEO DE ANDIROBA PURO: PICO VERDE) 6 $\alpha$ -ACETOXIGEDUNINA; PICO VERMELHO) GEDUNINA E PICO AZUL) ÓLEO DE ANDIROBA PURO.....	66
<b>FIGURA 35</b> –ESPECTROS DE ABSORÇÃO DAS SOLUÇÕES DE ÓLEO DE ANDIROBA DE CONCENTRAÇÕES CONHECIDAS.....	68
<b>FIGURA36</b> –CURVA ANALÍTICA DO ÓLEO DE ANDIROBA EM HEXANO.....	68
<b>FIGURA37</b> –ESPECTROS DE ABSORÇÃO DAS SOLUÇÕES DE ÓLEO EXTRAÍDO DO INTERIOR DAS MICROPARTÍCULAS COM HEXANO: A) 1ª TENTATIVA E B) 2ª TENTATIVA.....	69
<b>FIGURA 38</b> –ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO ÓLEO DE ANDIROBA, EM SOLUÇÃO AQUOSA DE PVAI 2% (m/V), DE CONCENTRAÇÕES CONHECIDAS.....	71
<b>FIGURA39</b> –CURVA ANALÍTICA DO ÓLEO DE ANDIROBA EM SOLUÇÃO AQUOSA DE PVAL A 2% (m/V).....	71
<b>FIGURA40</b> –ESPECTROS DE ABSORÇÃO DOS SOBRENADANTES PROVENIENTES DAS FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS.....	72
<b>FIGURA41</b> –ESPECTROS DE ABSORÇÃO DE ALÍQUOTAS ANALISADAS PARA DETERMINAÇÃO DE PERFIS DE LIBERAÇÃO DO ÓLEO DE ANDIROBA.....	74
<b>FIGURA42</b> –ARANHA-MARROM COM MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO O ÓLEO, ESPALHADAS PELO CORPO, FOTO 1.....	75

**FIGURA43-ARANHA-MARROM COM MICROPARTÍCULAS  
POLIMÉRICAS CONTENDO O ÓLEO, ESPALHADAS PELO CORPO, 2..... 76**

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS NO ÓLEO DE ANDIROBA.....	19
<b>TABELA 2</b> - PROPORÇÕES DE REAGENTES UTILIZADOS NO PREPARO DAS EMULSÕES DE ÓLEO DE ANDIROBA.....	30
<b>TABELA3</b> -FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PREPARADAS, SEGUNDO O MÉTODO DE EMULSÃO SIMPLES E EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE ORGÂNICO, SEM ÓLEO (MP1) E CONTENDO ÓLEO (MP2, MP3, MP4).....	35
<b>TABELA4</b> -EMULSÕES PREPARADAS COM ÓLEO VEGETAL DE <i>C. guianensis</i> COM SPAN 60 E TWEEN 80 EM PROPORÇÕES DIFERENTES, RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS E EHL DETERMINADOS PARA CADA SISTEMA.....	45
<b>TABELA 5</b> -EMBALAGEM DE VIDRO – ESTUDO DA ESTABILIDADE EM AMBIENTE COM SOL DIRETO, INDIRETO E AMBIENTE ESCURO REALIZADO NA CIDADE DE CURITIBA ENTRE OS MESES DE SETEMBRO A NOVEMBRO.....	48
<b>TABELA6</b> -EMBALAGEM DE VIDRO – AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DAS EMULSÕES SOB ESTRESSE (ESTUFA A 50°C).....	49
<b>TABELA7</b> -EMBALAGEM DE VIDRO – AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DAS EMULSÕES SOB ESTRESSE (GELADEIRA A 10°C). 49	49
<b>TABELA 8</b> -AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DAS EMULSÕES SOB ESTRESSE (CENTRÍFUGA A 3500 RPM).....	50
<b>TABELA9</b> -MORTALIDADE (%) DE INSETOS SUBMETIDOS À APLICAÇÃO DE EMULSÕES DO ÓLEO DE ANDIROBA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	52
<b>TABELA 10</b> - FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS DE PHBV.....	53
<b>TABELA 11</b> - FORMULAÇÕES DE MISTURAS FÍSICAS.....	54
<b>TABELA12</b> -RENDIMENTOS E DESVIOS PADRÃO MÉDIOS DAS FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	55
<b>TABELA 13</b> -VALORES DE T <sub>g</sub> E T <sub>m</sub> OBTIDOS PELAS CURVAS DE CED..	58
<b>TABELA 14</b> -DADOS SOBRE A DISPERSÃO GRANULOMÉTRICA DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PHBV/ ÓLEO DE ANDIROBA.....	64
<b>TABELA 15</b> -QUANTIDADE DE ÓLEO DE ANDIROBA ENCONTRADO NAS MICROPARTÍCULAS: VALORES TEÓRICO E EXPERIMENTAL.....	70
<b>TABELA 16</b> -EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO DE ANDIROBA NAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PHBV PELO MÉTODO INDIRETO.....	72

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

*A. fulica* – *Achatina fulica*

*A. aegypti* – *Aedes aegypti*

A/O – Água em óleo

ATD – Análise térmica diferencial

ATG – Análise termogravimétrica

BHL – Balanço hidrófilo-lipófilo

*C. guianensis* – *Carapa guianensis*

CED – Calorimetria exploratória diferencial

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

DAD – Diode Array Detector

DEET – N, N- dietil – 3 - metilbenzamida

DQUI – Departamento de química UFPR – Universidade Federal do Paraná

DRX – Difração de raios-X

EHL – Equilíbrio hidrófilo-lipófilo

Eud L 100 – Eudragit L 100

Eud S 100 – Eudragit S 100

HPLC – High performance/ pressure liquid chromatography

IVTF – Infravermelho com transformada de Fourier

KBr – Brometo de potássio

Kx – aumento fotomicrografia

LAMIR – Laboratório de Análises de Minerais e Rochas

*L. intermedia* – *Loxosceles intermedia*

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MF – Mistura física PHBV – Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato)

MP – Micropartícula

O/A – Óleo em água

OMS – Organização Mundial da Saúde

P. A. – Padrão analítico

PCL – Poli( $\epsilon$  -caprolactona)

pH – Potencial hidrogeniônico

PHA's – Poli(hidroxi alcanoatos)

PHB – Poli(3-hidroxi-butirato)

PLA – Poli(ácido láctico)

PLGA – Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

PVAI – Poli(álcool vinílico)

PVC – Poli(cloreto de vinila)

R – Rendimento

rpm – rotações por minuto

UV-Vis – Ultravioleta e visível

T<sub>g</sub> – Temperatura de transição vítrea

THF – Tetrahydrofurano

T<sub>m</sub> – Temperatura de fusão cristalina

Tr – Tempo de retenção

UEL – Universidade Estadual de Londrina

μm – micrômetros

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	5
3.1. Acidentes Loxoscélicos em Curitiba e Região Metropolitana.....	5
3.2. A dengue no cenário brasileiro.....	7
3.3. Agricultura e a necessidade do uso de pesticidas.....	10
3.4. Produtos naturais.....	12
3.5. <i>Carapa guianensis</i> Aublet.....	15
3.6. Sistemas de liberação modificada de moléculas bioativas.....	19
3.7. Polímeros como sistemas de liberação de ativos.....	22
3.8. Emulsões e suas aplicações.....	25
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
4.1. Reagentes e solventes.....	29
4.2. Equipamentos.....	29
4.3. Procedimentos experimentais.....	30
4.3.1. Preparo de emulsões contendo óleo de andiroba.....	30
4.3.2. Avaliação organoléptica e testes de estabilidade das emulsões estáveis.....	31
4.3.2.1. Testes de estabilidade normais a longo prazo.....	31
4.3.2.2. Testes de estabilidade acelerados a curto prazo.....	32
4.3.3. Caracterização das emulsões por microscopia ótica.....	32
4.3.4. Aplicação das emulsões.....	32
4.3.5. Preparo de micropartículas poliméricas contendo extrato vegetal de <i>Carapa guianensis</i> (óleo de andiroba), formuladas pelo método de emulsão simples e evaporação do solvente orgânico, a partir do polímero poli(hidroxibutirato- <i>co</i> -hidroxivalerato) (PHBV).....	34
4.3.6. Preparo de misturas físicas entre o PHBV e o óleo de andiroba.....	35
4.3.7. Rendimento das formulações de micropartículas de PHBV.....	36
4.3.8. Caracterização das micropartículas poliméricas de PHBV e das misturas físicas PHBV/óleo.....	36
4.3.8.1. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF).....	36
4.3.8.2. Difração de raios-X (DRX).....	36
4.3.8.3. Calorimetria exploratória diferencial (CED).....	36
4.3.8.4. Análise termogravimétrica (ATG) e análise térmica diferencial (ATD).....	37
4.3.8.5. Estudo morfológico e de superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	37
4.3.8.6. Análise granulométrica.....	37
4.3.9. Controle de qualidade do óleo de andiroba encapsulado.....	38
4.3.10. Determinação da eficiência de encapsulação (%) do óleo de andiroba: método direto e indireto.....	38
4.3.10.1. Método direto.....	38
4.3.10.2. Método indireto.....	39
4.3.11. Estudo de liberação <i>in vitro</i> do óleo de andiroba.....	40
4.3.12. Aplicação das micropartículas poliméricas de PHBV contendo o óleo.....	40
4.3.12.1. Avaliação da toxicidade das micropartículas frente às larvas do mosquito <i>A. aegypti</i> .....	40

4.3.12.2. Avaliação da toxicidade frente a indivíduos adultos da aranha-marrom <i>L. intermedia</i> .....	42
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	43
5.1. Preparo de emulsões contendo óleo de andiroba.....	43
5.2. Avaliação organoléptica e testes de estabilidade das emulsões estáveis: testes normais a longo prazo e acelerados a curto prazo.....	47
5.2.1. Testes de estabilidade normais a longo prazo.....	47
5.2.2. Testes de estabilidade acelerados a curto prazo.....	48
5.3. Caracterização das emulsões por meio de microscopia ótica.....	50
5.4. Aplicação das emulsões.....	51
5.4.1. Toxicidade das emulsões do óleo de andiroba para os ácaros rajados.....	51
5.4.2. Toxicidade das emulsões do óleo de andiroba para os percevejos.....	52
5.5. Desenvolvimento de micropartículas de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV).....	53
5.6. Preparo de misturas físicas entre PHBV e o óleo de andiroba.....	54
5.7. Rendimento das formulações de micropartículas poliméricas de PHBV.....	54
5.8. Caracterização das micropartículas poliméricas de PHBV e das misturas físicas PHBV/Óleo.....	55
5.8.1. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF).....	55
5.8.2. Difração de raios-X (DRX).....	56
5.8.3. Calorimetria exploratória diferencial (CED).....	57
5.8.4. Análise termogravimétrica (ATG) e térmica diferencial (ATD).....	58
5.8.5. Estudo morfológico e de superfície das micropartículas de PHBV e das misturas físicas PHBV/Óleo.....	60
5.8.6. Análise granulométrica.....	64
5.9. Controle de qualidade do óleo de andiroba encapsulado.....	64
5.10. Determinação da eficiência de encapsulação (%) do óleo de andiroba: método direto e indireto.....	67
5.10.1. Método direto.....	67
5.10.2. Método indireto.....	70
5.11. Estudo de liberação <i>in vitro</i> do óleo de andiroba.....	73
5.12. Aplicação das micropartículas poliméricas de PHBV contendo o óleo de andiroba.....	74
5.12.1. Avaliação da toxicidade do óleo de andiroba microencapsulado frente às larvas do mosquito <i>A. aegypti</i> .....	74
5.12.2. Avaliação da toxicidade do óleo de andiroba microencapsulado frente a adultos da aranha-marrom <i>L. intermedia</i> .....	75
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	76
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	78
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	78
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	79

## 1. INTRODUÇÃO

Na atualidade, o crescimento populacional acelerado associado à urbanização, o fluxo intenso de pessoas entre as mais diversas regiões do globo sem alguma forma de controle, o tipo e modo de produção agrícola baseado na monocultura e a falta de sistemas eficazes no controle de populações de pragas, tem feito a humanidade experimentar problemas sérios. Estes podem variar desde a contaminação ambiental, até o aparecimento de doenças transmitidas por pragas urbanas disseminadas.

Apesar dos benefícios econômicos que certas ações proporcionam, a falta de sistemas eficazes no controle de pragas urbanas são responsáveis por permitir que a aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*), importante praga, reproduza-se livremente em ambientes urbanos, ocorrendo, desta forma, um aumento na população destes animais. Além disso, a falta de informação da população também tem provocado aumento nas taxas de acidentes com esta praga, principalmente no Estado do Paraná, mais especificamente na cidade de Curitiba e Região Metropolitana.

Outro problema decorrente de ações como o desmatamento, embora em menor proporção nos dias atuais, fluxo intenso de pessoas entre as fronteiras do globo terrestre, além, é claro, da falta de sistemas eficazes no controle e combate de pragas, é a proliferação, nas zonas urbanas, do mosquito *Aedes aegypti*, conhecido popularmente como mosquito da dengue. A fêmea deste mosquito é responsável pela transmissão do vírus causador da dengue, o que se constitui um sério problema de saúde pública no Brasil e países em desenvolvimento.

Além disso, o avanço urbano e o crescente aumento populacional, fez com que o homem buscasse de forma intensiva produzir maiores quantidades de alimentos, em áreas relativamente pequenas e utilizando-se de trabalho humano reduzido. Esta tendência tem levado ao uso indiscriminado de insumos agrícolas, entre eles os pesticidas, no combate às pragas agrícolas que acometem os mais variados tipos de culturas.

Visando promover, portanto, o controle populacional da aranha-marrom no Estado do Paraná, do mosquito *Aedes aegypti* e das mais diversas pragas agrícolas existentes, eis que surgem os produtos naturais, de origem vegetal, como alternativa promissora do ponto de vista ambiental. Isto ocorre porque alguns produtos naturais possuem rápida degradação, baixa toxicidade aos organismos não-alvos, baixa toxicidade ambiental, além de apresentarem eficácia comprovada no controle em que se deseja efetuar.

Entre os principais gêneros arbóreos encontrados no Brasil, que possuem compostos inseticidas de eficácia comprovada, está o gênero *Carapa*, mais especificamente a espécie *Carapa guianensis* Aublet, pertencente à família Meliaceae.

É de se esperar que o uso do extrato vegetal de *C. guianensis* (óleo de andiroba), extraído das sementes desta espécie, na forma de emulsões ou encapsulado possa se apresentar como uma alternativa nova, quando o objetivo consiste na proteção do óleo aos possíveis processos de oxidação ou na liberação modificada dos ativos.

Logo, como descrito por CHAMPAGNE *et al.* (1992) e BRAY *et al.* (1990), a família Meliaceae vem se destacando por possuir compostos que apresentam uma interessante atividade inseticida. Deste modo, espera-se que o óleo vegetal da espécie *Carapa guianensis*, com propriedade inseticida e repelência natural frente ao *Aedes aegypti* comprovada (MENDONÇA *et al.*, 2005; MIOT *et al.*, 2004) possa manifestar esta mesma ação, na forma de micropartículas, diante da aranha-marrom, de larvas do mosquito da dengue e toxicidade frente ao *Euchistus heros* (percevejo-marrom) e ao *Tetranychus urticae* (ácaro-rajado), na forma de emulsões estáveis. A encapsulação do óleo de andiroba pode oferecer um sistema de liberação lenta e controlada do óleo como forma de diminuir a quantidade de ingrediente ativo aplicado no combate de pragas em potencial. Além disso, espera-se diminuir a utilização e, por conseqüência, o impacto ambiental causado com o uso de pesticidas sintéticos altamente tóxicos. O uso de material biodegradável no processo de encapsulação torna-se também necessário para contribuir com a redução do impacto ambiental.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Desenvolver metodologias alternativas visando o controle populacional de pragas urbanas e agrícolas por meio do uso de produtos naturais e óleos vegetais encapsulados e/ou emulsionados.

### 2.2. Objetivos específicos

- Obtenção de emulsões estáveis do extrato vegetal de *Carapa guianensis* que possui propriedades medicinal e inseticida relatadas na literatura.

- Caracterizar as emulsões obtidas por meio de microscopia ótica para avaliação da morfologia e diâmetro dos glóbulos de óleo dispersos (fase descontínua) na fase aquosa (contínua), como forma de avaliar a estabilidade dos sistemas. Avaliar as características organolépticas das emulsões obtidas como forma, também, de avaliar a estabilidade dos sistemas formados.

- Desenvolver metodologia de microencapsulação, utilizando um polímero biodegradável para encapsulação do extrato vegetal de *C. guianensis* (óleo de andiroba), com baixa toxicidade ao ser humano e que apresenta atividade tóxica relatada na literatura frente à larvas do mosquito *A. aegypti*.

- Obter misturas-físicas entre o polímero biodegradável e o óleo vegetal utilizados neste estudo, para comparar com os sistemas microparticulados desenvolvidos.

- Caracterizar as micropartículas poliméricas e as misturas físicas entre polímero e óleo a ser encapsulado por meio de técnicas como espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF), difração de raios-X (DRX), calorimetria exploratória diferencial (CED), análise termogravimétrica (ATG), análise térmica diferencial (ATD), análise granulométrica e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

- Dosar o teor de óleo de andiroba incorporado no interior das micropartículas por método direto e indireto, por meio de espectrofotometria na região do ultravioleta e visível (UV-Vis).

- Determinar o perfil de liberação *in vitro* do óleo de andiroba encapsulado por meio de espectrofotometria na região do ultravioleta e visível (UV-Vis).

- Testar o potencial inseticida do óleo de andiroba encapsulado e emulsionado para redução de populações de pragas agrícolas e urbanas, dentre elas o *Tetranychus urticae*, conhecido como ácaro rajado, o *Euchistus heros* (percevejo-marrom), larvas do mosquito *A. aegypti* e populações de aranhas-marrom.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Acidentes Loxoscélicos em Curitiba e Região Metropolitana

As aranhas do gênero *Loxosceles* são conhecidas popularmente como aranhas-marrom (Figura 1). São de hábito noturno e os indivíduos adultos medem de um a dois centímetros de corpo e três a quatro centímetros de envergadura (levando-se em conta as pernas). Indivíduos adultos podem sobreviver sem água e sem alimento por mais de seis meses (LEVI e SPIELMAN, 1968). Acasalam-se durante todo o ano e constroem as ootecas, ou seja, um “saco” de ovos chegando a conter de 60 a 200 ovos (FISCHER, 1994). Este gênero tem ampla distribuição nas zonas temperadas, subtropicais e tropicais de todo o mundo (GERTSCH, 1958). No Brasil, ocorrem sete espécies, *Loxosceles similis*, *Loxosceles amazonica*, *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles laeta*, *Loxosceles adelaida* e *Loxosceles hirsuta* (EICKSTEDT, 1994), todas de coloração marrom-amarelada à castanha, o que deu origem ao nome popular pelo qual são conhecidas. Diversas espécies são representantes típicos da fauna urbana (EICKSTEDT, 1994), ocupando locais escuros e tranquilos em residências, sendo bastante abundantes em ambientes domiciliares e peridomiciliares. Poucos estudos são encontrados na literatura araneológica envolvendo a biologia, a ecologia ou o comportamento de aranhas do gênero *Loxosceles*, a maior parte destes feitos a partir de observações ocasionais.



Figura 1: Adulto pertencente à espécie *L. intermedia* (aranha-marrom) (Fonte: [www.bemparana.com.br](http://www.bemparana.com.br)).

A aranha marrom é pouco agressiva sendo que os acidentes decorrentes com essa praga urbana acontecem quando o animal é pressionado pela vítima junto ao seu corpo, seja no ato de vestir uma roupa ou mesmo um sapato. Todas as espécies de *Loxosceles sp.* são venenosas

mas nem todas são peçonhentas. A espécie que acomete o Estado do Paraná, mais precisamente Curitiba e Região Metropolitana é peçonhenta, conseguindo assim inocular seu veneno nos seres humanos. Sabe-se que o veneno destas aranhas possui forte ação necrosante, proteolítica e hemolítica. As manifestações clínicas variam de lesões cutâneas (Figura 2), de extensão e profundidade variáveis (loxoscelismo cutâneo), até sérias alterações sistêmicas, como comprometimento da função renal (loxoscelismo cutâneo-visceral), que pode levar ao óbito (CARDOSO, 1990).



Figura 2: Lesão cutânea causada pelo ataque de aranhas-marrom (Fonte: [www.cabuloso.com/aranha\\_marrom](http://www.cabuloso.com/aranha_marrom)).

No Brasil os primeiros registros de acidentes loxoscélicos (causados por aranhas do gênero *Loxosceles*) datam de 1954 (EICKSTEDT, 1994). O loxoscelismo, em nosso País, se concentra na região Sul. No Paraná se dá a forma mais importante de araneísmo, em contraste com São Paulo, onde menos de 10% dos acidentes araneídicos são atribuídos à espécies de *Loxosceles* (ARAÚJO e REZENDE, 1991; ALBUQUERQUE *et al.*, 1990). A notificação de acidentes loxoscélicos cresceu progressivamente no Paraná (RIBEIRO *et al.*, 1993; MANFREDINI *et al.*, 1993). Segundo a Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (Sesa-PR), foram registrados entre os meses de janeiro a outubro de 2009, em todo Estado do Paraná, mais de 3.800 casos de acidentes com aranha-marrom, sendo que 70% destes foram notificados na cidade de Curitiba e Região Metropolitana. Somente na capital foram registrados mais de 1.500 casos, perfazendo 40% do total registrado. A espécie predominante na capital paranaense é *Loxosceles intermedia* (FISCHER, 1994).

Aproximadamente 80% dos acidentes ocorrem em residências sendo a maior incidência entre o sexo feminino - cerca de 65% (RIBEIRO *et al.*, 1993). Os óbitos, embora raros, concentram-se na faixa infantil. Não existe atualmente no mercado tecnologia específica para o controle de populações de aranha-marrom em ambiente urbano. As iniciativas do poder

público para combater o problema tem se concentrado em campanhas de esclarecimento e no atendimento aos acidentados, com a implementação de sistema para notificação de acidentes, estrutura para atendimento médico especializado e a produção de soro antiloxoscélico.

### 3.2. A dengue no cenário brasileiro

Uma outra praga urbana que acomete a população brasileira é o mosquito *Aedes aegypti*, pertencente à família Culicidae, da ordem Diptera, que é composta por mosquitos e pernilongos, conhecidos também como muriçocas e carapanãs (CONSOLI e LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994).

Esta família vem destacando-se por possuir espécies, em sua grande maioria, hematófagas e transmissoras de doenças mortais como a dengue e a febre amarela (MENDONÇA *et al.*, 2005). Dentro do gênero *Aedes*, merece destaque a espécie *Aedes aegypti*, conhecida popularmente como mosquito da dengue. O *A. aegypti* (Figura 3) possui hábitos doméstico e diurno. Apresenta, quando adulto, asas que possibilitam o vôo, enquanto que as fases imaturas (Figura 4), compreendendo ovos, larvas e pupa, são exclusivamente aquáticas, adaptando-se bem aos locais de água parada e limpa onde os ovos estão livres de sofrerem dessecação (CLARO *et al.*, 2004). Esta espécie é originária da África, adaptando-se bem às regiões de climas tropicais e subtropicais. Possui grande incidência no mundo, com exceção da Europa. O crescimento populacional acelerado associado à urbanização, o fluxo intenso e sem controle de pessoas entre países, Estados e cidades e a falta de sistemas eficazes no controle e combate do mosquito vetor da dengue, fez com que o *A. aegypti* proliferasse nas zonas urbanas facilmente, principalmente em locais no qual o acúmulo de água é freqüente (FREIRE *et al.*, 2006; CLARO *et al.*, 2004; CONSOLI e LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994).



Figura 3: Mosquito da Dengue.

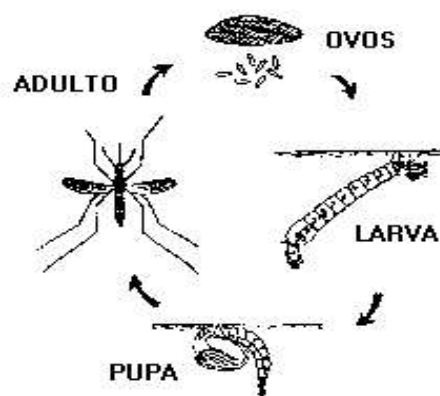


Figura 4: Ciclo de vida do *A. aegypti*.

Atualmente, tem-se conhecimento que a dengue, doença transmitida pela fêmea do *A. aegypti*, acomete dois terços da população mundial. Algumas áreas convivem com a circulação de algum dos sorotipos do vírus enquanto que outras convivem com todos simultaneamente (CLARO *et al.*, 2004). Sabe-se que a fêmea do mosquito *A. aegypti*, por ser hematófaga, é a responsável pela transmissão do arbovírus causador da doença, que se constitui um sério problema de saúde pública (FORATTINI, 2002).

A dengue é uma das mais importantes doenças epidêmicas que acometem os países em desenvolvimento (GLUBER, 2002). É uma doença febril aguda causada por um vírus do gênero Flavivírus, sendo conhecido quatro sorotipos distintos do vírus: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. As manifestações clínicas são variáveis entre uma síndrome viral inespecífica e benigna e um quadro de dengue hemorrágica, este grave e fatal (TAUIL, 2001).

Esta doença surgiu no Brasil em meados de 1920, com os primeiros casos de dengue registrados. Nos anos seguintes, até 1983, a doença foi considerada erradicada já que nenhum novo caso tinha sido notificado até aquele momento; a partir de então ocorreu a reinfestação do vetor, sendo assim registrados vários casos em todo país, a cada ano (CLARO *et al.*, 2004).

Segundo o Ministério da Saúde, na década de 90 (Figura 5), foi registrado a ocorrência de milhares de casos de dengue, embora aqueles não tenham sido anos epidêmicos. Já em 2002 (Figura 5) foram notificados aproximadamente 800.000 casos da doença, principalmente no Rio de Janeiro, devido à introdução de um novo subtipo do vírus da dengue, o sorotipo 3, este considerado um pico epidêmico.

Nos anos seguintes, com o espalhamento do novo subtipo do vírus para os demais Estados, não foi observado o surgimento de surtos e epidemias. Em 2006 foram notificados aproximadamente 350.000 casos, sendo as regiões mais acometidas a Sudeste e a Nordeste (Figura 5) (Ministério da Saúde).

Já em 2007 foram registrados, aproximadamente, 500.000 casos, sendo, em sua grande maioria de dengue clássica e cerca de 926 casos de dengue hemorrágica com a ocorrência de 98 óbitos (Ministério da Saúde). Neste período, a maior incidência foi na região Centro-Oeste, tendo sido observado mais de 300 casos por 100.000 habitantes (Figura 6).

Especificamente com relação à região Sul (Figura 6), é possível notar que os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul foram os de menor incidência de casos, menos que

100 casos por 100.000 habitantes. Já o estado do Paraná apresentou um grande número de transmissões em vários municípios.

Segundo o Ministério da Saúde e Secretaria de Vigilância Sanitária, em 2008 foi registrado um aumento no número de casos de dengue, comparando-se com o mesmo período de 2007, tendo sido observado um aumento em mais de 200.000 casos. O número de casos de dengue hemorrágica saltou de 926 em 2007 para 4.137 no ano seguinte com ocorrência de 223 óbitos, 125 mortes a mais que em 2007.

A região Sul apresentou uma redução significativa (-35%) no número de casos com relação ao mesmo período de 2007. O Estado do Paraná foi o que teve maior incidência de casos registrados, sendo o único da região sul que apresentou transmissão autóctone, ou seja, cuja transmissão se deu dentro do próprio Estado.

Com relação a 2009, o Ministério da Saúde afirmou que os casos de dengue no Brasil caíram 46% com relação ao mesmo período de 2008. Foram registrados aproximadamente 410.000 casos, enquanto que no mesmo período de 2008 foram notificados algo próximo a 760.000 casos.

Dentre os métodos de controle adotados para impedir o avanço da doença no Brasil estão a utilização de inseticidas a ultrabaixo volume, que tem mostrado pouca eficácia em combater o mosquito vetor da dengue (CLARO, *et al.*, 2004). Os laboratórios de pesquisa das universidades brasileiras vêm buscando medidas alternativas para combater o avanço da dengue no país.

O governo tem concentrado suas ações na promoção de campanhas informativas por meio dos meios de comunicação (televisão, folhetos, jornais, rádios, cartazes) afim de conscientizar a população da importância em eliminar os focos de proliferação do mosquito para tentar erradicar ou até mesmo controlar a doença. Estas campanhas, com base nos dados citados anteriormente, fornecidos pelo Ministério da Saúde, têm mostrado eficiência limitada.

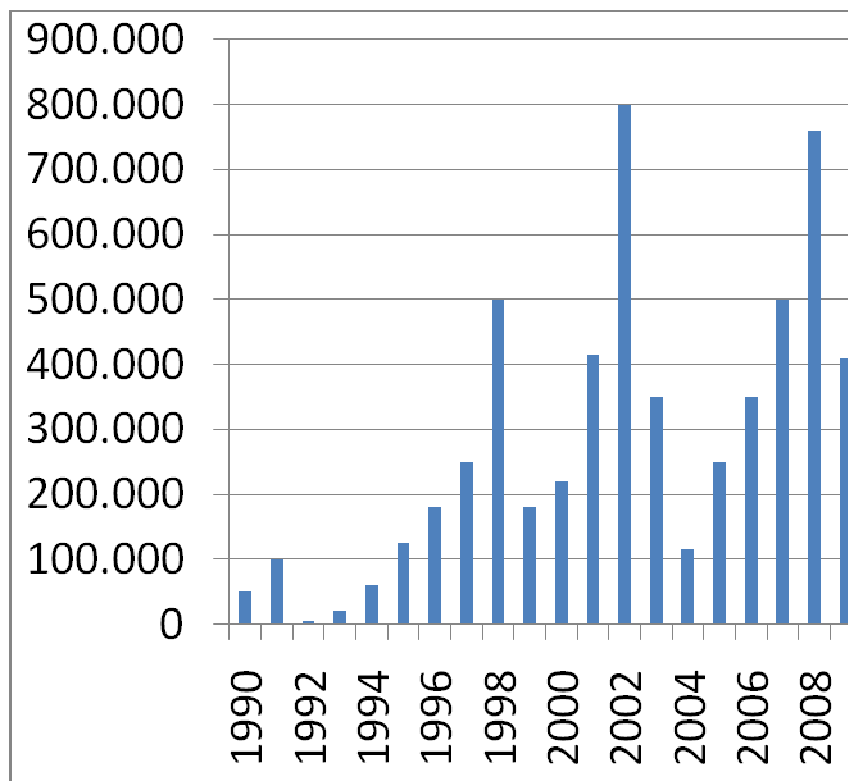


Figura 5: Casos de dengue notificados no Brasil de 1990 a 2009 (Fonte: Ministério da Saúde).

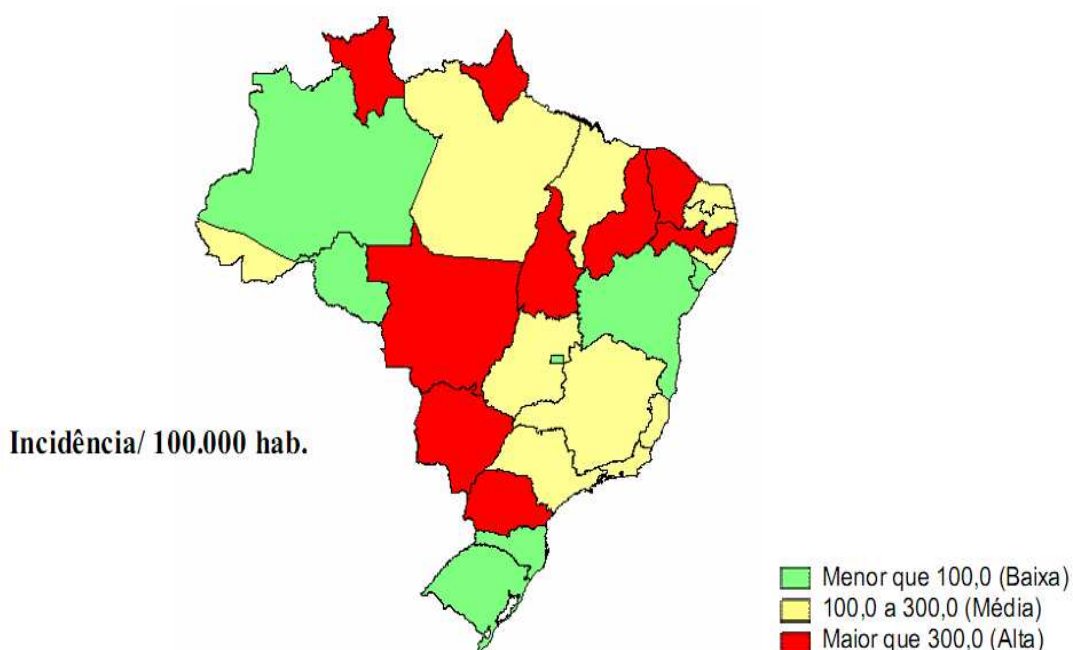


Figura 6: Distribuição dos Estados por áreas de incidência de dengue no Brasil em 2007 (Fonte: Ministério da Saúde).

### 3.3. Agricultura e a necessidade do uso de pesticidas

A expansão da agricultura com o surgimento da produção em grande escala e a diversidade de culturas, tem tornado cada vez mais indispensável o uso de pesticidas no

combate às pragas agrícolas e às ervas daninhas (GALLI *et al.*, 2006; FARIA *et al.*, 2004). Várias culturas necessitam de aplicação de agrotóxicos, promovendo de certa forma, a contaminação do meio ambiente (GRÜTZMACHER *et al.*, 2008). A necessidade do uso de pesticidas, portanto, vem crescendo em decorrência do avanço urbano e conseqüente crescimento populacional, atrelado à utilização de áreas relativamente pequenas no plantio e trabalho humano reduzido (DAMIN, 2005; ROCHA *et al.*, 2002; DORES e FREIRE, 2001).

O uso indiscriminado de insumos agrícolas, entre eles os pesticidas, vem sendo um dos principais responsáveis pela contaminação de seres humanos em todo o mundo, além de ocasionar sérios danos à microflora, microfauna e alterar de forma significativa as propriedades físico-químicas do solo, que possuem papel importante no processo de nutrição vegetal, interferindo de maneira negativa e significativa na capacidade produtiva do ecossistema agrícola utilizado (ROMEIRO, 1994).

Sabe-se que a contaminação de alimentos, de águas superficiais e subterrâneas, acarretada pelos pesticidas, traz sérios problemas à saúde humana e ao meio ambiente. Muitos pesticidas da classe dos organoclorados e organofosforados foram proibidos por favorecerem a formação de tumores cancerígenos, assim como outros problemas relacionados (GALLI *et al.*, 2006). A lixiviação de agrotóxicos no solo, as pulverizações realizadas por via aérea, o descarte incorreto e a lavagem de embalagens utilizadas são responsáveis pela contaminação de rios, lagos e oceanos como também de lençóis freáticos, verdadeiros reservatórios de água potável existentes no mundo (FILIZOLA *et al.*, 2002).

Cada vez mais, tem-se tornado necessário o desenvolvimento de técnicas e programas de monitoramento ambiental e de programas de educação ambiental voltados à população para proteger o meio ambiente da degradação humana (FILIZOLA *et al.*, 2002).

Além disso, com a crescente preocupação ambiental, tem-se feito necessário também, por outro lado, intensificar a busca por moléculas de baixa toxicidade aos organismos não alvos, de rápida degradação e de eficácia comprovada para o controle que se deseja efetuar, visando a substituição dos pesticidas sintéticos altamente tóxicos (PRATA, 2002). Entre as moléculas que apresentam tais características se destacam os produtos naturais, alternativa promissora que, evolutivamente, passaram a ser produzidos pelas plantas como mecanismo de defesa contra insetos fitófagos (FERREIRA *et al.*, 2001).

Vale a pena ressaltar que, alguns produtos naturais podem ser uma alternativa interessante, do ponto de vista ambiental, enquanto que outros não. Existe na natureza substâncias naturais que são tóxicas e persistentes.

### 3.4. Produtos naturais

Os produtos naturais são substâncias orgânicas que podem ser extraídos de plantas, animais e microorganismos e que podem apresentar um grande valor agregado devido às suas mais variadas aplicações na área médica, farmacêutica, cosmética, alimentícia e agrícola (PINTO *et al.*, 2002).

Dentre as fontes de produtos naturais mais estudadas e utilizadas, estão os compostos extraídos do reino vegetal (PINTO *et al.*, 2002). Uma variedade de plantas tem sido estudadas como fonte de produtos naturais em busca de novas substâncias bioativas que poderão permitir o surgimento de novos medicamentos, mais eficazes do que os que já se encontram no mercado, e agroquímicos biodegradáveis e menos tóxicos aos seres humanos, em substituição aos pesticidas sintéticos altamente tóxicos e persistentes, no qual seus produtos de degradação muitas vezes são mais prejudiciais do que as moléculas precursoras (BUENO *et al.*, 2009; PINTO *et al.*, 2002).

A primeira descrição feita sobre o uso de produtos naturais de origem vegetal e animal foi relatada nas sagradas escrituras e no papiro de Ebers. Mais tarde, com a tradução deste papiro, ficou claro que já havia sido notificado um grande número de doenças que acometiam o povo daquele tempo bem como o registro de várias drogas usadas no tratamento, tanto de origem animal como vegetal (PINTO *et al.*, 2002).

Atualmente é possível encontrar várias pesquisas em que o foco principal está em extrair, isolar, identificar e aplicar os produtos naturais obtidos, principalmente de fontes vegetais (BUENO *et al.*, 2009). Levando-se em consideração o foco deste trabalho, muitos estudos têm sido realizados na busca por extratos que apresentem atividade pesticida e repelente comprovada contra as mais diversas pragas, incluindo o *A. aegypti* (SILVA *et al.*, 2008; MAJI *et al.*, 2007; FARIAS *et al.*, 2007; FREIRE *et al.*, 2006; MENDONÇA *et al.*, 2005; MIOT *et al.*, 2004; SIMAS *et al.*, 2004).

A questão ambiental, atualmente, tem sido um dos principais incentivos à busca de novos pesticidas naturais mais seguros que os sintéticos. De uma forma geral, esses pesticidas não são persistentes, ou seja, degradam-se com maior velocidade que os sintéticos, provavelmente não deixando resíduos tóxicos nos alimentos ou no meio

ambiente. Estas tendências têm criado grandes oportunidades para o desenvolvimento de pesticidas e repelentes naturais nos laboratórios de pesquisa de universidades e indústrias em todo o mundo (FERREIRA *et al.*, 2001).

Estes produtos naturais obtidos de matéria-prima vegetal, oferecem uma variedade de moléculas com grande diversidade estrutural e atividade biológica que pode ser manifestada por meio de suas propriedades herbicidas, inseticidas, fungicidas e farmacológicas. Para que sejam comercialmente viáveis, os produtos naturais precisam atender a uma série de critérios, dentre eles: seletividade contra inimigos naturais, baixa toxicidade em organismos não alvos, baixa toxicidade ambiental, biodegradabilidade, ausência de fitotoxicidade, matéria-prima abundante e baixo custo (FERREIRA *et al.*, 2001).

Neste contexto, dentro do reino vegetal, encontra-se uma família de grande importância, Meliaceae, pertencente à ordem Sapindales (MUELLNER *et al.*, 2003) que é composta por mais de 50 gêneros arbóreos que ocorrem em regiões tropicais e subtropicais, tanto no hemisfério norte como no hemisfério sul. Os seis gêneros encontrados no Brasil são *Cedrela*, *Cabralea*, *Swietenia*, *Carapa*, *Guarea* e *Trichilia* (PENNINGTON e STYLES, 1975).

As plantas da família Meliaceae vêm se destacando por possuir tetranortriterpenóides, conhecidos também como limonóides ou meliacinas, substâncias com potencial ação inseticida (Figura 7). (KAUR *et al.*, 2009; FREIRE *et al.*, 2006; CHAMPAGNE *et al.*, 1992; BRAY *et al.*, 1990). Uma das atividades mais relevantes descobertas em plantas desta família, é a atividade fago-inibidora de seus compostos (FERREIRA *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 1991). Sabe-se que essa classe de substâncias foi desenvolvida pelas plantas como mecanismo de defesa contra insetos fitófagos, além de só serem isoladas de plantas pertencentes às famílias Meliaceae, Rutaceae e Cneoraceae (SIMAS *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2001).

Os produtos vegetais encontrados nas espécies pertencentes a esta família são responsáveis por produzir nos insetos muitos efeitos que vão desde a repelência até inibição do crescimento (AMBROZIN, 2000).

Os tetranortriterpenóides, substâncias inseticidas, fazem parte de uma extensa e numerosa família de produtos naturais conhecida como terpenóides, terpenos ou isoprenóides. São derivados dos triterpenos, uma classe de compostos com 30 átomos de

carbono em seu esqueleto que, durante sua biossíntese, perdem 4 átomos de carbono, restando, em suas estruturas, 26 átomos de carbono (Figura 7) (ARAÚJO, 2008 e 2009).

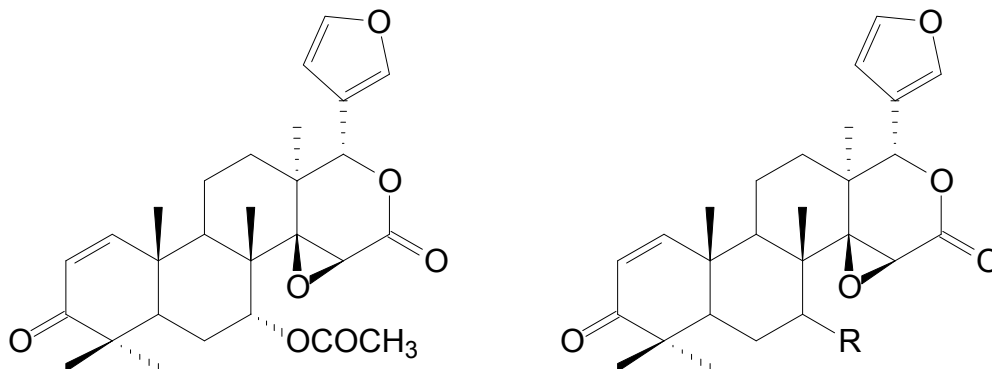


Figura 7: Fórmulas estruturais de alguns limonóides: a) Gedunina e b) Deacetylgedunina (R: OH) e 7-Oxo-7-Deacetylgedunina (R: =O) (Fonte: KAUR *et al.*, 2009).

Entre os nomes citados para designar a família de produtos naturais, o correto a ser utilizado são os termos terpenóides e isoprenóides, já que segundo a literatura, a palavra terpeno somente deve ser usada para aqueles compostos que sejam alquenos. Já o termo isoprenóide, corretamente utilizado, indica que os produtos naturais desta família são derivados da estrutura do isopreno (Figura 8). Sabe-se que, quando esses compostos são submetidos à pirólise decompõem-se na unidade isoprênica, ou seja, no 2-metil-butadieno (Figura 8) (ARAÚJO, 2008 e 2009).

Geralmente os terpenóides seguem a regra do isopreno que consiste em indicar que os membros desta família são constituídos por unidades de cinco átomos de carbono, correspondente à estrutura do isopreno, ligados entre si pela ordem “cabeça” – “cauda” (Figura 8). Esta regra nem sempre se verifica já que a cadeia carbônica de alguns terpenóides não possuem suas unidades isoprênicas ligadas nesta ordem, além de possuírem seus esqueletos constituídos de múltiplos de cinco átomos de carbono (ARAÚJO, 2008 e 2009). Uma das espécies ricas nestes compostos inseticidas é a conhecida como *Carapa guianensis*.

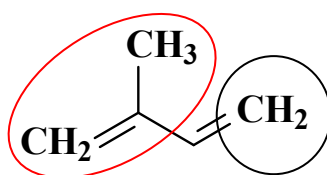


Figura 8: Fórmula estrutural do isopreno (Fonte: ARAÚJO, 2008 e 2009).

### 3.5. *Carapa guianensis* Aublet

A espécie *Carapa guianensis* Aublet (Figura 9), da família Meliaceae, é uma árvore encontrada em vários países da África tropical, do sul da América Central e em países como a Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana Francesa, Peru, Paraguai e Brasil (COSTA-SILVA *et al.*, 2007; FARIAS *et al.*, 2007; BOUFLEUER, 2004). No Brasil é conhecida como Andiroba, nome derivado de termos indígenas “nhandi” (óleo) e “rob” (manteiga) (BOUFLEUER, 2004).

É encontrada na bacia Amazônica em locais de várzeas próximas do leito de rios e faixas alagáveis ao longo dos mais diversos cursos d’água, sendo predominante nestes ambientes mais úmidos. Pelo fato de ser uma espécie bastante versátil, apresenta uma capacidade extraordinária em adaptar-se aos mais diferentes ambientes, inclusive em locais de terra firme, estes em menor número (KLIMAS *et al.*, 2007; BOUFLEUER, 2004). A versatilidade da espécie *C. guianensis* em adaptar-se aos diferentes ambientes, proporciona diferenças morfológicas significantes com relação à coloração do lenho, que pode ser vermelho ou branco, e com relação à coloração e viscosidade do óleo, extraído das sementes da Andiroba (Figura 10) que pode ser escuro e de rápido escoamento, quando extraído de espécies que ocorrem em terra firme, ou claro e viscoso, quando extraído de espécies que ocorrem em locais de várzeas (BOUFLEUER, 2004; LEITE, 1997).



Figura 9: A espécie *Carapa guianensis* Aublet (Fonte: BOUFLEUER,2004).



Figura 10: Sementes de Andiroba (Fonte: BOUFLEUER,2004).

O extrato vegetal de *C. guianensis*, extraído das sementes produzidas por esta espécie, tem sido amplamente utilizado pelos povos indígenas, ribeirinhos e extrativistas como repelente natural contra insetos que acometem a região, assim como no tratamento de enfermidades: artrites, infecções de ouvido, câncer de útero, diarreia, diabetes entre outras (COSTA-SILVA *et al.*, 2008 e 2007). A Fundação Oswaldo Cruz desenvolveu e pôs no mercado velas produzidas com óleo de andiroba para combater mosquitos que transmitem febre amarela e dengue (FREIRE *et al.*, 2006).

Vários estudos tem mostrado a eficácia do extrato vegetal de *C. guianensis* no controle de pragas (FARIAS *et al.*, 2007; FREIRE *et al.*, 2006; MENDONÇA *et al.*, 2005; MIOT *et al.*, 2004).

FARIAS *et al.* (2007), fazendo o uso de teste carrapaticida, por meio de imersão de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (carrapato do boi) em soluções do óleo de andiroba, observou morte das fêmeas ingurgitadas e redução da postura de ovos, demonstrando uma eficácia de 100% em todas as amostras testadas.

FREIRE *et al.* (2006), usando um ensaio para monitorar postura de ovos de fêmeas de forídeos (praga que acomete abelhas) em diferentes substratos, inclusive substratos contendo óleo de andiroba, observou que ocorreu uma diminuição considerável, até nenhuma postura de ovos em presença do óleo.

MENDONÇA *et al.* (2005), por meio de bioensaio larvicida, observou que diversos óleos, inclusive o óleo de andiroba, mostrou alta atividade inseticida com um valor de concentração letal 50 (CL<sub>50</sub>) de 57 µg/L.

MIOT *et al.* (2004) observou, em seu estudo com voluntários que tiveram seus antebraços recobertos com óleo de andiroba puro, que o mesmo apresentou efeito de repelência contra fêmeas saudáveis do mosquito *A. aegypti*. Apesar de sua eficácia constatada neste estudo, os efeitos do óleo foram mais discretos comparando-se com o grande potencial repelente do N, N-dietil-3-metilbenzamida (DEET) que, ainda hoje, é o repelente mais efetivo encontrado no mercado.

Embora existam muitos estudos que mostram a eficácia do extrato vegetal de *C. guianensis*, estudos ainda incipientes, por outro lado, tentam comprovar a falta de toxicidade deste óleo (COSTA-SILVA *et al.*, 2008 e 2007). Estes estudos são de fundamental importância pois podem mostrar que o óleo de andiroba além de ser relativamente barato e abundante, também apresenta outras características desejáveis como baixa toxicidade para organismos não alvos e seletividade para organismos alvos.

COSTA-SILVA *et al.* (2008), em estudo no qual ratos saudáveis foram tratados oralmente com doses de óleo de andiroba variando de 0,375 a 5,0 g por massa corporal (g/Kg), observaram após 30 dias que o extrato administrado não causou efeitos tóxicos agudos ou moderados em fêmeas de ratos. No entanto, por meio da análise de parâmetros bioquímicos, foi possível observar que ocorreu um aumento nos níveis de uma enzima encontrada no fígado, sugerindo a existência de possíveis danos ao órgão, sugerindo, portanto, uma toxicidade hepática. Apesar disso, estudos mais aprofundados, estão sendo realizados para confirmação da suposição.

COSTA-SILVA *et al.* (2007), administrou oralmente óleo de andiroba em doses variando de 0,375 a 3,0 g/Kg, à ratas grávidas, durante sete dias, do sétimo ao décimo quarto dia de gestação (período organogênico) observaram, após sacrifício e laparotomia das ratas estudadas, que o óleo não apresentou efeito tóxico nas fêmeas grávidas. Este efeito foi constatado pois não houve nenhuma alteração significativa do feto e de seus órgãos reprodutores.

Por meio da caracterização do óleo de andiroba foi possível se ter conhecimento de sua composição e das suas mais diversas propriedades físico-químicas (Tabela 1). Este óleo, extraído das sementes da espécie *C. guianensis*, é composto por diversos ácidos graxos, sendo o ácido oléico, este insaturado, encontrado em maior porcentagem (Tabela 1) (COSTA-SILVA *et al.*, 2008 e 2007). Possui um grande potencial medicinal, repelente e pesticida relatado na literatura devido aos limonóides (Figura 11) anteriormente citados, que perfazem de 2 a 5 % de sua composição total (KLIMAS, *et al.*, 2007; BOUFLEUER, 2004).

SARRIA *et al.* (2007), fazendo uso de um ensaio biológico com lagarta-do-cartucho-do-milho e formiga cortadeira, com a utilização dos limonóides 7-desacetoxi-7-oxogedunina, 6- $\alpha$ -acetoxigedunina e o angolensato de metila, que foram isolados do óleo de andiroba, observaram que a substância 7-desacetoxi-7-oxogedunina, apresentou atividade inseticida nas larvas da praga do milho enquanto que o composto angolensato de metila mostrou atividade inseticida frente à operárias da formiga cortadeira. A mortalidade registrada foi de 88% frente à dieta controle. Logo, estas substâncias realmente apresentam potencial promissor no controle de pragas em geral.

Portanto, o óleo de andiroba tem sido empregado, em sua forma pura ou na forma de emulsão, para as aplicações requeridas (COSTA-SILVA *et al.*, 2008 e 2007; FERRARI, *et al.*, 2007; MIOT *et al.*, 2004). O uso deste óleo na forma encapsulada como um sistema de

liberação modificada de seus ativos pode se apresentar como uma alternativa nova, quando o objetivo consiste na proteção do mesmo aos possíveis processos de oxidação ou na liberação gradual dos princípios ativos.

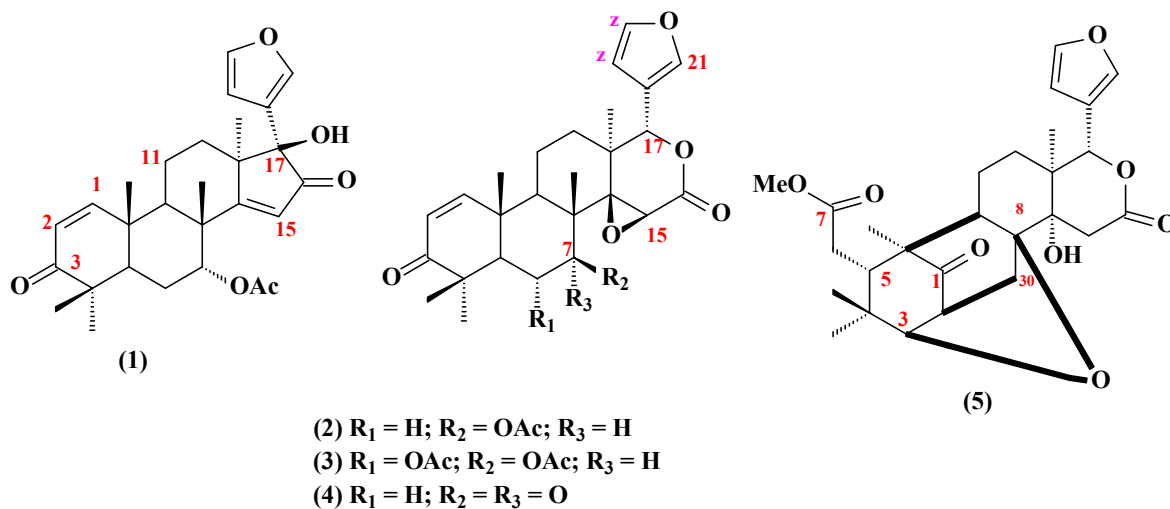


Figura 11: Estrutura de alguns limonóides presentes no óleo de andiroba: (1) 17β- hidroxiazadiradiona; (2) gedunina; (3) 6α-acetoxigedunina; (4) 7-desacetoxi-7-oxogedunina e (5) xilocensina k.

TABELA 1  
Características físico-químicas e composição de ácidos graxos no óleo de andiroba

Características	Valores
Densidade a 15°C (g/cm <sup>3</sup> )	0,923 – 0,934
Densidade a 25°C (g/cm <sup>3</sup> )	0,930 – 0,941
Ponto de Fusão inicial (°C)	22
Ponto de Fusão completo (°C)	43
Ponto de Solidificação inicial (°C)	19
Ponto de Solidificação completo (°C)	5
Índice de Iodo	58 – 76
Índice de Acidez	10 – 20
Ácidos Voláteis (%)	0,8
Ácido Mirístico (%)	17,9 – 18,1
Ácido Palmítico (%)	9,3 – 12,4
Ácido Oléico (%)	56,4 – 59
Ácido Linoléico (%)	4,9 – 9,2

Fonte: Boufleuer (2004)

### 3.6. Sistemas de liberação modificada de moléculas bioativas

Nos últimos anos, tem sido intensa a busca por sistemas de liberação modificada de moléculas bioativas em geral (A e B-POLETTO *et al.*, 2008; PÉREZ *et al.*, 2000; ALLÉMANN *et al.*, 1998). Sabe-se que a liberação modificada compreende três tipos: a sustentada, vetorizada ou controlada dos ativos.

A intensa busca por estes sistemas é devido ao desenvolvimento de formulações, as quais podem ser utilizadas nas indústrias agrícola, alimentícia, farmacêutica ou cosmética, que permitam a liberação modificada de princípios ativos. Este tipo de formulação pode ser usada para atingir sítios específicos, com a finalidade de reduzir efeitos colaterais como

toxicidade de certos medicamentos, ou para aumentar a eficácia do tratamento terapêutico. Podem, ainda, ser aplicadas para o mascaramento de sabores ou odores ou ainda para a redução na concentração de ativos utilizados (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003 e 2002; SILVA *et al.*, 2003).

Os processos micro/nanotecnológicos vêm sendo aplicados, principalmente, na indústria farmacêutica e cosmética porque tornam mais eficiente a veiculação de moléculas bioativas no organismo, bem como facilita a penetração desses compostos nas camadas mais profundas da pele, potencializando o efeito dos produtos. Para os fármacos já existem muitos estudos publicados. Por outro lado, já no campo dos cosméticos as informações são mais restritas, o que pode ser explicado por este uso mais recente (NEVES, 2008; SCHMALTZ *et al.*, 2005). A aplicação da nanotecnologia no controle de pragas urbanas é muito incipiente, constituindo-se em um vasto campo a ser explorado.

Sabe-se que esses tipos de liberação, descritos anteriormente, só são possíveis por meio de vetores que permitam este controle. Dentre os vetores que apresentam esta função, destacam-se as micropartículas e os sistemas coloidais, compreendendo as nanopartículas e as lipossomas (ABDELWAHED *et al.*, 2006; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O processo tecnológico responsável pela produção de micro/nanopartículas é conhecido como micro/nanoencapsulação. Este consiste em envolver, com um fino filme de uma matriz qualquer, pequenas gotículas de uma certa substância ativa, sendo esta chamada de núcleo (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Segundo GIUNCHEDI e CONTE (1995), o processo de nano/microencapsulação, para ser considerado ideal, tem que apresentar como características: simplicidade, reprodutibilidade, rapidez, facilidade em transpor à escala industrial, além de ser pouco dependente das características de solubilidade do princípio ativo e da matriz encapsulante em questão.

As micro/nanopartículas formadas por meio deste processo podem ser de dois tipos: micro/nanocápsulas e micro/nanoesferas (Figura 12). Nas micro/nanocápsulas o núcleo, composto pela substância ativa, apresenta ao seu redor um invólucro da matriz utilizada na encapsulação. Por outro lado, nas micro/nanoesferas o princípio ativo encontra-se disperso, seja por retenção ou adsorção à matriz (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003). Além dessa classificação, as micro/nanopartículas podem, ainda, ser classificadas em cápsulas mono ou polinucleares e esferas hetero ou homogêneas. Nas mononucleares o princípio ativo está na forma de um único núcleo envolto pela matriz utilizada no processo, enquanto que, nas polinucleares, o ativo está subdividido em vários núcleos cercados pela

matriz. Nas esferas heterogêneas o material de núcleo encontra-se suspenso de forma não homogênea na matriz enquanto que, nas esferas homogêneas, a substância ativa está dissolvida em seu estado molecular na matriz utilizada. Existem outros dois sistemas que são incluídos na classificação de micropartículas, apesar de não satisfazerem a definição verdadeira das mesmas. Estes são as lipossomas (semi-sólido) e as emulsões lipídicas (líquido) (SILVA *et al.*, 2003).

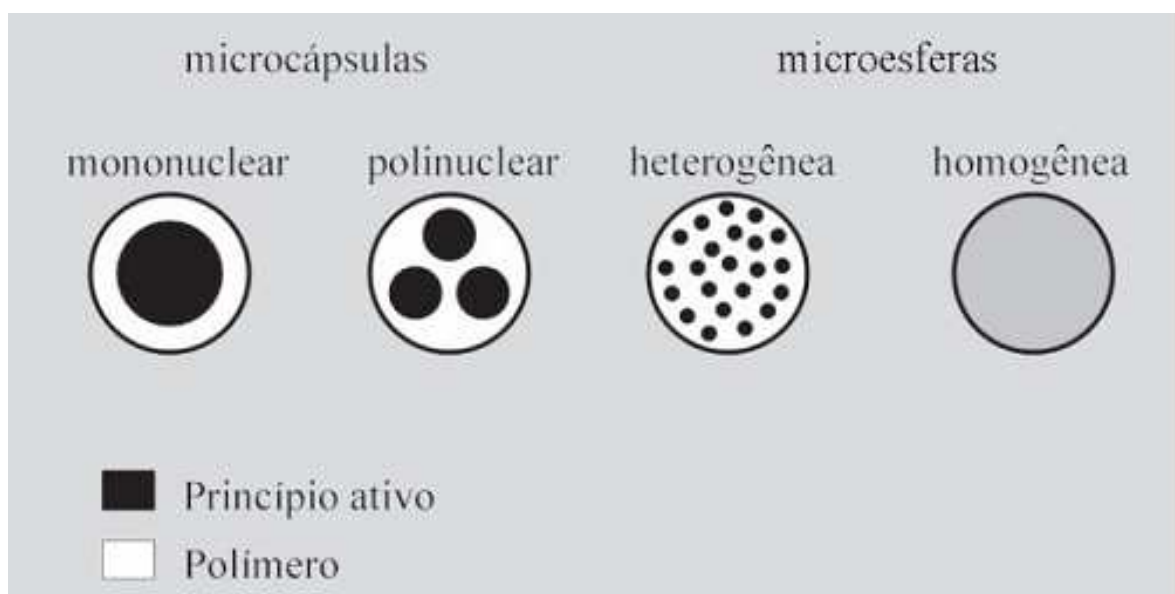


Figura 12: Tipos de nano/micropartículas poliméricas (Fonte: SILVA *et al.*, 2003).

Segundo a literatura, a definição válida para vetores microparticulados é a de que são pequenas partículas sólidas e de morfologia esférica, com tamanhos variando entre 1 e 1000  $\mu\text{m}$ . Por outro lado, as nanopartículas apresentam diâmetro que varia entre 10 e 1000 nm, além de serem sólidas e esféricas (SILVA *et al.*, 2003; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003 e 2002; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

O desenvolvimento de vetores nano/microparticulados poliméricos como carreadores de moléculas bioativas tem sido foco de estudo dos pesquisadores em todo mundo (A e B-POLLETO *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2007; SCHAFFAZICK *et al.*, 2002; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Os sistemas poliméricos de liberação modificada de fármacos e de outros compostos ativos têm despertado o interesse no meio científico devido à duas características de extrema importância que os polímeros utilizados na obtenção destes sistemas devem

apresentar: biocompatibilidade e biodegradabilidade (HUANG *et al.*, 2009; A e B-POLETTO *et al.*, 2008; A e B-PICH *et al.*, 2006; SENDIL *et al.*, 1999).

Graças à essas propriedades peculiares, é possível desenvolver micro/nanopartículas poliméricas contendo fármacos que, quando inseridas no corpo humano, como forma terapêutica, não causam toxicidade às células, tecidos e órgãos, além de degradar-se em produtos atóxicos que são facilmente metabolizados e eliminados pelo nosso organismo (HUANG *et al.*, 2009; SOPPIMATH *et al.*, 2001). O desenvolvimento de vetores micro/nanoparticulados poliméricos, como sistemas de liberação modificada de produtos naturais (óleos vegetais com atividade inseticida comprovada, por exemplo) é uma alternativa promissora e incipiente para promover o controle de população de pragas em geral, sem causar contaminação ambiental e toxicidade aos organismos não-alvos.

No entanto, a encapsulação polimérica de óleos, em geral, é bastante utilizada na indústria alimentícia como forma de prevenir a oxidação de seus constituintes, a perda de compostos voláteis presentes em sua composição, além de poder controlar a liberação de aromas que alguns desses óleos apresentam, os óleos essenciais (AHN *et al.*, 2008; TEIXEIRA e DURAN, 2007; SUAVE *et al.*, 2006; HEINZELMANN e FRANKE, 1999; ABURTO *et al.*, 1998). Além disso, a encapsulação também é muito usada na área farmacêutica como sistemas de liberação modificada de fármacos lipofílicos com a finalidade de dissolver ou suspender os mesmos (POHLMANN *et al.*, 2008; MÜLLER *et al.*, 2004; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MANDAL *et al.*, 2001; GUTERRES *et al.*, 1995). Até o momento são poucos os estudos que visam encapsular óleos para fins de controle de pragas e de repelência natural (MAJI *et al.*, 2007).

### **3.7. Polímeros como sistemas de liberação de ativos**

Os polímeros utilizados na confecção de sistemas de liberação modificada de moléculas bioativas podem ser de duas origens: natural ou sintética. Dentre os naturais usados, podem ser citados os polissacarídeos, tais como a quitosana, a gelatina e o amido e, dentre os sintéticos, podem ser citados os poliésteres e os acrílicos (MANO e MENDES, 2004).

Nos últimos anos tem aumentado o interesse nos polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, como sistemas de liberação controlada de ativos, por várias razões, como a preocupação ambiental e o maior potencial terapêutico associado a estes polímeros, sem causar efeitos colaterais em nosso organismo (A e B-PICH *et al.*, 2006). No entanto, o alto

custo dos polímeros biodegradáveis em comparação aos polímeros convencionais de base petroquímica, atualmente constitui um problema a ser resolvido (LEMES, 2005; ROSA *et al.*, 2002 e 2001). Vários polímeros vêm sendo amplamente utilizados na obtenção de vetores micro/nanoparticulados como carreadores de drogas. Dentre os usados, destacam-se os poliésteres: poli(3-hidroxiбутирато-*co*-3-hidroxiуalerato)(PHBV), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), poli(ácido láctico) (PLA) e seu copolímero com ácido glicólico, o poli(ácido láctico-*co*-ácido glicólico) (PLGA) (A e B-POLETTO *et al.*, 2008; MAINARDES *et al.*, 2006; A e B-PICH *et al.*, 2006; PEREZ *et al.*, 2000). Alguns polímeros não biodegradáveis e biocompatíveis podem também ser utilizados, embora com menor frequência. Os poli(acrilatos) (Eud L 100, S 100) são exemplos (ROSA *et al.*, 2001).

Os poliésteres, neste contexto, vêm sendo amplamente estudados pois são facilmente degradados, por meio de simples reação de hidrólise que pode ocorrer nas ligações ésteres de suas cadeias poliméricas (Figura 13). Isto significa que eles podem ser degradados em presença de fluidos corporais e os produtos resultantes da degradação podem ser reabsorvidos pelo nosso organismo ou até mesmo metabolizados e eliminados (LUCCHESI, 2006; MAINARDES *et al.*, 2006). No meio ambiente, suas cadeias poliméricas são facilmente hidrolisadas pela ação de fungos e bactérias (SQUIO e ARAGÃO, 2004; ROSA e PANTANO, 2003).

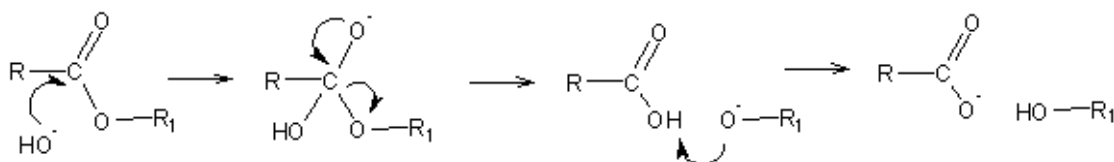


Figura 13: Reação de hidrólise que ocorre nos poliésteres: mecanismo.

Dos poliésteres mencionados os poli(hidroxiálcanoatos) (PHA's) são polímeros alifáticos, lineares e hidrofóbicos, da classe dos poliésteres dos poli(hidroxiácidos), que vêm sendo bastante usados na área médica e farmacêutica. Eles têm sido muito utilizados como sistemas de liberação controlada de fármacos, em suturas cirúrgicas, em peles artificiais, além de substrato para crescimento de tecidos (engenharia de tecidos) (LUCCHESI, 2006; MAINARDES *et al.*, 2006; NODA *et al.*, 2005; HOROWITZ e SANDERS, 1994). São polímeros de origem natural, produzidos por cepas bacterianas puras e utilizados por elas como reserva de carbono e energia, depósito este encontrado no

meio intracelular (MISRA *et al.*, 2006; A e B-PICH *et al.*, 2006; SALEHIZADEH e VAN LOOSDRECHT, 2004; HOROWITZ e SANDERS, 1994). Estes polímeros acumulam-se no meio intracelular, na forma de grânulos (Figura 14), de bactérias das seguintes espécies: *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans* e culturas bacterianas puras recombinantes de *Alcaligenes eutrophus* e *Escherichia coli* (SALEHIZADEH e VAN LOOSDRECHT, 2004). O tipo de poliéster produzido depende da cepa bacteriana e do substrato utilizado (A e B-PICH *et al.*, 2006; SALEHIZADEH e VAN LOOSDRECHT, 2004). A velocidade de degradação dos PHA's varia de acordo com suas propriedades (WANG *et al.*, 2004).

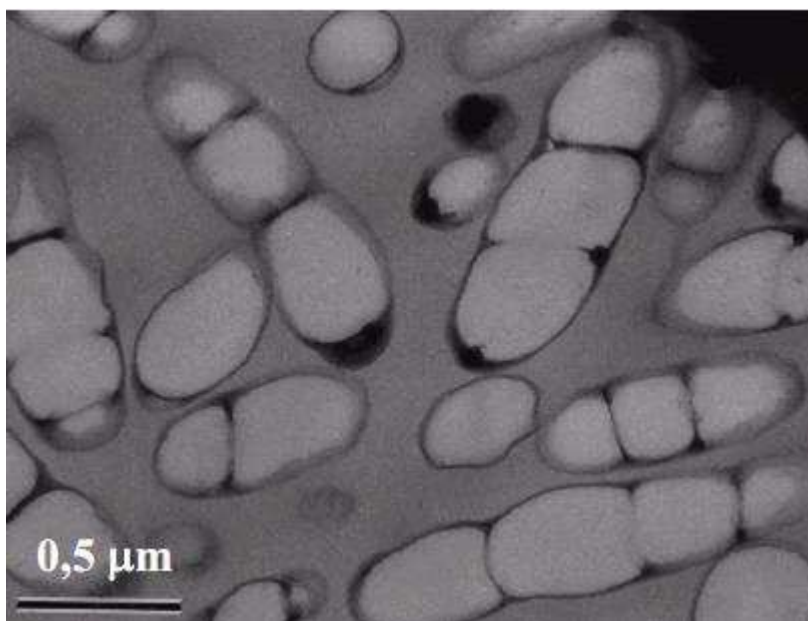


Figura 14: Fotomicrografia de bactérias contendo PHA's (Fonte: LUCCHESI,2006).

O primeiro PHA descoberto foi o poli(3-hidroxiбутирато) (PHB), um homopolímero derivado do ácido 3-hidroxiбутírico (LEMES, 2005; HOROWITZ e SANDERS, 1994). Mais tarde, foi isolado e identificado de cepas bacterianas puras um segundo polímero com propriedades físico-químicas semelhantes ao PHB. Um copolímero derivado de dois hidroxiácidos diferentes, que ficou conhecido como poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiуалерато) (PHBV) (LEMES, 2005).

Apesar de apresentar características físico-químicas parecidas com o PHB, o PHBV tem atraído maior interesse pelo fato de suas melhores propriedades mecânicas e físicas quando comparadas com as propriedades do homopolímero (LEMES, 2005; SQUIO e ARAGÃO, 2004).

O PHBV (Figura 15) é um copolímero termoplástico, biodegradável, biocompatível e semicristalino de cadeia linear, apresentando, em maior proporção, unidades de hidroxibutirato, possui ponto de fusão menor, maior flexibilidade, menor grau de cristalinidade e maior resistência à ruptura que o homopolímero PHB. Sabe-se que o aumento na porção de hidroxivalerato em suas cadeias proporciona a melhoria em suas propriedades mecânicas e físicas quando comparadas com o PHB, proporcionando um melhor processamento térmico do PHBV, o que o torna mais atrativo industrialmente (LEMES, 2005; SQUIO e ARAGÃO, 2004; ROSA *et al.*, 2002).

Portanto, pelo fato de ser um polímero biodegradável e biocompatível, o PHBV tem sido amplamente utilizado em sistemas de liberação modificada de moléculas bioativas, em procedimentos cirúrgicos, na engenharia de tecidos e implantes (KE *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2009; FARAGO *et al.*, 2008; KÖSE *et al.*, 2005; GÜRSEL *et al.*, 2001; SENDIL *et al.*, 1999). A sua baixa velocidade de degradação, comparada com a dos demais polímeros biodegradáveis existentes torna seu uso apropriado na engenharia de tecidos e implantes (LUCCHESI, 2006; MAINARDES *et al.*, 2006; LEMES, 2005; HOROWITZ e SANDERS, 1994).

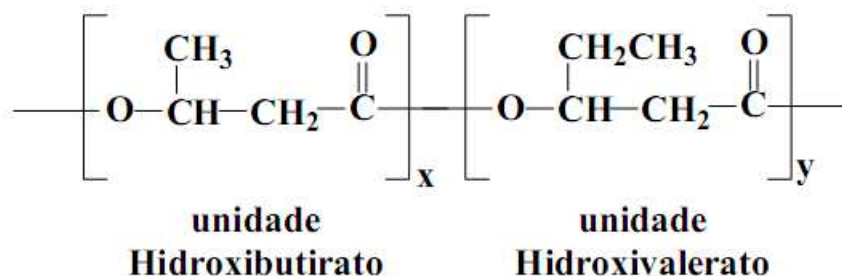


Figura 15: Fórmula estrutural do PHBV (Fonte: LEMES, 2005).

### 3.8. Emulsões e suas aplicações

Como forma de testar as propriedades inseticidas, relatadas anteriormente, do extrato vegetal de *C. guianensis*, em pragas agrícolas, surge o interesse pelas emulsões.

As emulsões (Figura 16) são sistemas compostos por duas fases líquidas e imiscíveis, nas quais um dos líquidos está disperso de maneira uniforme no outro. Esta uniformidade consiste em dizer que as gotículas do líquido disperso no outro apresentam diâmetros iguais, em sua grande maioria. O líquido que está disperso em pequenas gotas é conhecido como fase dispersa, interna ou descontínua, enquanto que o segundo líquido é chamado de

fase de dispersão, externa ou contínua (PRISTA *et al.*, 2003; ZANIN *et al.*, 2002 e 2001; GENNARO, 2004; VOIGT, 1982).

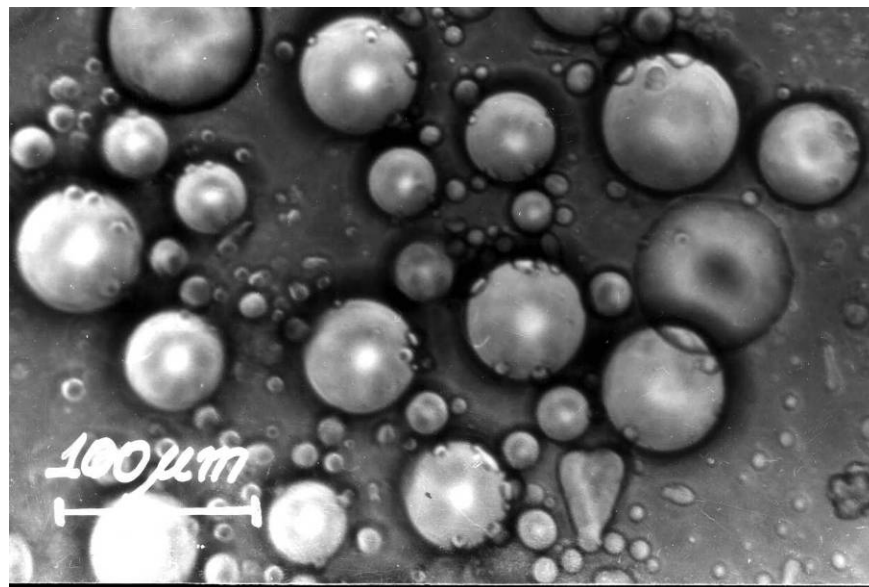


Figura 16: Microscopia ótica de uma emulsão (Fonte: ZANIN *et al.*, 2002).

Sabe-se que esses sistemas são termodinamicamente instáveis devido à sua grande energia superficial que é resultante da combinação de tensão na interface, da grande área de superfície da fase dispersa e da diferença de densidade entre os dois líquidos que constituem as fases.

Desta forma, para conseguir confeccionar emulsões estáveis é necessário adicionar excipientes conhecidos como agentes emulsificadores ou tensoativos. Uma emulsão estável é definida como um sistema que consegue manter, de maneira homogênea, suas gotículas ou glóbulos na fase contínua. O tensoativo, neste caso, é responsável por manter um filme entre as fases (entre as gotículas e a fase externa), exercendo assim uma barreira física que impede a coalescência que pode ser definida como a junção, a união de duas ou mais gotículas. Caso este filme possua cargas, é considerado que o agente emulsificador exerce, portanto, uma barreira química.

Os agentes emulsificadores podem ser divididos em três classes: agentes emulsificadores naturais, sólidos finamente divididos e agentes emulsificadores sintéticos. Dentre as classes, a mais efetiva a ser utilizada no preparo de emulsões é a última citada pois as suas moléculas possuem propriedades tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas, conhecidas como moléculas anfífilas. Estes tensoativos sintéticos possuem propriedade

anfílica descrita pelo valor do balanço hidrofílico-lipofílico (BHL) ou também conhecido como equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) (GENNARO, 2004).

O EHL ou BHL representa um sistema de classificação dos tensoativos, tendo como base os parâmetros de solubilidade desses compostos em solventes polares e/ou apolares. Quanto maiores os valores de EHL do tensoativo, mais hidrofílica é a molécula. Os agentes emulsificantes podem ser usados isoladamente, mas o são preferencialmente utilizados aos pares, combinados. Emulsificadores com valores de EHL ou BHL que variam de 8 a 16 tendem a formar uma emulsão do tipo óleo em água (O/A), enquanto que tensoativos com valores na faixa de 3 a 8 tendem a formar uma emulsão água em óleo (A/O) (ZANIN *et al.*, 2002)

Um outro excipiente que geralmente é adicionado às emulsões, como forma de manter a estabilidade, são os conservantes, que podem ser acrescentados tanto na fase aquosa como na oleosa. Segundo a literatura, a porção aquosa é a principal responsável em favorecer o crescimento de microorganismos, embora isto ocorra na porção oleosa, com menor frequência. A escolha do conservante sempre deve levar em consideração a aplicação da preparação e as possíveis incompatibilidades entre o conservante e constituintes das emulsões.

É sabido, também, que a preparação de emulsões envolve uma certa necessidade em aplicar ao sistema que se quer obter, uma certa quantidade de energia com a finalidade de formar a interface entre as duas porções. Um trabalho adicional tem que ser realizado, por meio de agitação manual ou mecânica para promover movimentação do sistema e superar a resistência ao fluxo. Além disso, aquecimento (calor) é algumas vezes fornecido para fundir sólidos serosos e, também, reduzir a viscosidade da porção oleosa. Logo, as preparações em grande escala necessitam de grandes quantidades de energia, tanto para solubilização como para a mistura, o que eleva o custo do método de preparo.

Há dois tipos de emulsões: as simples e as múltiplas. Dentre as emulsões simples tem-se a óleo em água (O/A) e a água em óleo (A/O). Por outro lado, entre as múltiplas, existem as O/A/O e as A/O/A. Na O/A/O a fase aquosa fica entre duas fases oleosas, enquanto que nas A/O/A as fases aquosa interna e externa são separadas por uma fase oleosa. Esta é uma recente inovação no preparo de emulsões pois a fase dispersa contém gotículas ainda menores do que as que são miscíveis na fase contínua.

O tipo de emulsão formada entre as simples, vai depender, em grande parte, da razão fase-volume. Quer dizer que quanto maior o volume da fase aquosa, por exemplo, com

relação à fase oleosa, maior será a chance de obter uma emulsão do tipo óleo em água (O/A), em que a porção aquosa será externa ou contínua.

O grande interesse neste tipo de formulação na área farmacêutica consiste em tornar alguns óleos minerais e vegetais, com propriedades terapêuticas e nutritivas, mais palatáveis, aumentando, de maneira considerável a aceitação do paciente à formulação. É possível, por meio de emulsões, administrar simultaneamente substâncias imiscíveis por via oral, tópica ou, até mesmo, parenteral (GENNARO, 2004).

Os óleos, quando estão na forma de pequenas gotículas, possuem uma absorção aumentada como também a absorção de alguns fármacos é aumentada, quando são preparados na forma de uma emulsão O/A (GENNARO, 2004). Portanto, as emulsões oleosas são amplamente utilizadas na área farmacêutica e cosmética mas, até o momento, não há muitos estudos que empregam este tipo de tecnologia no combate às pragas agrícolas que acometem as diversas culturas existentes.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram os inseticidas sintéticos contendo os ativos Abamectina (Vertimec)(acaricida sintético), Imidacloprido e Beta-Ciflutrina (Connect)(inseticida sintético), metilparabeno (Nipagin M) (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil), poli(álcool vinílico) (PVAI) ( $M_n$  130.000 g.mol<sup>-1</sup>, 86,7-88,7 mol% de hidrólise, Sigma-Aldrich), poli(hidroxibutirato-*co*-valerato) (PHBV) ( $M_n$  = 130.000 g/mol, Biocycle<sup>®</sup> L 110, PHB INDUSTRIAL, Serrana, Brasil), o propilparabeno (Nipazol P) (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil), Span 60 (Henrifarma produtos químicos e farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brasil), Tween 80 (Henrifarma produtos químicos e farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brasil). O óleo vegetal proveniente da espécie de árvore conhecida como *Carapa guianensis* Aublet foi fornecido pela Buriti Comercial Ltda, São Paulo, Brasil. Os padrões dos limonóides 6 $\alpha$ -acetoxigedunina e gedunina foram gentilmente fornecidos pela Profa Dra Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva (UFScar). O brometo de potássio (KBr) foi de grau espectroscópico (ALDRICH Co., St. Louis, Estados Unidos). Os solventes usados foram clorofórmio P.A. (SYNTH, Diadema, Brasil), hexano destilado, acetonitrila e tetrahidrofurano (THF) grau cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

### 4.2. Equipamentos

Agitador mecânico (FISATOM equipamentos científicos, modelo 713), balança analítica de prato único, balança termogravimétrica (NETZSCH Instruments, modelo TG 209 F1 Iris<sup>®</sup>), banho maria (QUIMIS, aparelhos científicos Ltda), centrífuga para tubos (JOUAN industries, modelo BR 4i), cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector UV-Vis (WATERS), difratômetro de raio-X (SHIMADZU Co., modelo XRD-6000), espectrofotômetro de feixe duplo ultravioleta e visível (UV-Vis) (SHIMADZU), espectrofotômetro na região do infravermelho com transformada de Fourier (BIO-RAD Laboratories, modelo Excalibur series FTS 3500GX), microscópio eletrônico de varredura, placa de agitação e aquecimento (CORNING, modelo PC-320), sistema de calorimetria exploratória diferencial (NETZSCH Instruments, modelo Netzsch DSC 203 F1), sistema de medição da dispersão granulométrica (Granulômetro a laser CILAS 1064, do LAMIR-UFPR).

### 4.3. Procedimentos experimentais

#### 4.3.1. Preparo de emulsões contendo óleo de andiroba

Previamente ao preparo das emulsões com óleo de andiroba foi realizada a determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) do óleo de andiroba como ponto de partida (Tabela 2), para descoberta da proporção variável do par de tensoativos utilizados no processo, que proporciona uma maior estabilidade para as emulsões de óleo de andiroba preparadas. O EHL das emulsões foi calculado de acordo com a literatura (ZANIN *et al.*, 2002), em que é realizada uma média ponderada dos valores de EHL individual dos tensoativos utilizados e suas respectivas concentrações. Emulsões com o óleo de andiroba foram preparadas mantendo-se constante a quantidade de óleo adicionada e misturando-se, em proporções variáveis, o par de tensoativos Span 60 e Tween 80 (Tabela 2).

TABELA 2  
Proporções de reagentes utilizados no preparo das emulsões de óleo de andiroba

Emulsão	Span (g)	Tween (g)	Óleo (g)	Água (g)
1	4,0	1,0	10	85
2	3,5	1,5	10	85
3	3,0	2,0	10	85
4	0,0	5,0	10	85

O método utilizado no preparo destas emulsões, neste estudo, foi o de misturar ambas as fases (aquosa e oleosa) após aquecer cada uma. Este consiste em adicionar, na fase oleosa, os agentes emulgentes e os compostos solúveis em óleo e adicionar, na fase aquosa, os componentes hidrossolúveis. Em ambas as fases, um conservante foi adicionado: o Nipagin foi sempre usado na concentração 0,2% (m/m) enquanto que o Nipasol foi utilizado na concentração 0,05% (m/m). Portanto, para o preparo de uma emulsão a 10% (m/m) de óleo, por exemplo, foi adicionado, em um béquer, o óleo vegetal de *Carapa guianensis* (10,0g), o tensoativo monoestearato de sorbitano (Span 60) (3,0g) e o Nipasol (0,05 g) . Em outro béquer, foi adicionado água destilada (85,0g), o monooleato de sorbitano (Tween 80) (2,0g) e Nipagin (0,2g). As fases aquosa e oleosa foram aquecidas, simultaneamente, a uma temperatura de 75°C, com auxílio de banho-maria para

completa solubilização de todos os seus constituintes. Após solubilização dos componentes, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa e a mistura foi agitada manualmente com auxílio de bastão de vidro por cerca de 10 minutos ainda sob aquecimento em banho-maria. Após ser removida do banho-maria, a mistura ainda foi agitada manualmente até atingir a temperatura ambiente, com a finalidade de promover a estabilidade (PRISTA *et al.*, 2003; ZANIN *et al.*, 2001; GENNARO, 2004; VOIGT, 1982).

Emulsões a 1% (m/m), 2% (m/m) e 5% (m/m), para posteriores testes em laboratório com pragas agrícolas, previamente selecionadas, foram preparadas por meio de diluições realizadas da emulsão a 10% (m/m) de óleo de andiroba na descrita anteriormente, considerada a mais estável dentre todas as preparadas.

#### **4.3.2. Avaliação organoléptica e testes de estabilidade das emulsões estáveis**

As emulsões estáveis, sem separação de fases, foram avaliadas por meio de suas características organolépticas (estabilidade física), levando-se em consideração parâmetros físicos como aspecto ou aparência das emulsões. Este estudo tem por objetivo observar o comportamento do produto final no período, pelo menos de um ano, para determinar o prazo de vida útil (*shelf-life*) do mesmo (ZANIN *et al.*, 2001). As emulsões estáveis desenvolvidas neste trabalho foram avaliadas por três meses. Dentre as características avaliadas foram consideradas: homogeneidade (sem separação de fases), brilho, macio (sem aspecto fibroso), fino (fluida, não grossa) e opacidade.

Foram realizados testes de estabilidade normais a longo prazo e acelerados de curto prazo. Tanto para os testes de estabilidade normais quanto para os acelerados, a embalagem final adotada foi a de vidro a fim de evitar processos oxidativos nas emulsões. Todos os testes foram feitos em triplicata e após 24 horas do preparo de todas as formulações, período este necessário para que o sistema seja considerado estável (sem separação de fases).

##### **4.3.2.1. Testes de estabilidade normais a longo prazo**

Nos testes de estabilidade normais, 3 frascos de vidro foram postos em ambiente sob a direta ação solar, 3 frascos em ambiente com sol indireto e 3 em ambiente escuro. O teste para ambiente com sol indireto foi realizado no interior do laboratório de pesquisa, ou seja, ambiente interno em que a luminosidade, natural ou artificial, atinja o ambiente escolhido de forma indireta. Por outro lado, o teste em ambiente escuro utilizado foi realizado em

uma caixa escura sem luminosidade. Todo dia, durante três meses, os frascos foram observados, com exceção dos que permaneceram em ambiente escuro, e as características desejáveis, citadas acima, foram observadas.

#### **4.3.2.2. Testes de estabilidade acelerados a curto prazo**

Nos testes de estabilidade acelerados, 3 frascos de vidro foram postos em estufa a 50°C por 24 horas, 3 frascos de vidro, contendo pequenas quantidades de emulsões do óleo de andiroba foram colocados em geladeira a 10°C durante 24 horas e 3 frascos foram submetidos à centrifugação durante 50 minutos a 3500 rpm. Decorrido o tempo requerido, as características escolhidas para serem avaliadas, foram observadas.

#### **4.3.3. Caracterização das emulsões por microscopia ótica**

A avaliação da estabilidade das emulsões estáveis, após seu preparo, de extrato vegetal de *C. guianensis* foi realizada por meio de microscopia ótica (ZANIN *et al.*, 2002). As emulsões do óleo de andiroba foram espalhadas sobre uma lâmina de vidro e, em seguida, uma lamínula foi posta sobre o material. Para visualização das amostras foi utilizado um microscópio ótico Olympus, com lente objetiva de 40x. O registro das imagens ocorreu pela utilização de uma câmera fotográfica Sony. As emulsões foram analisadas por microscopia ótica logo após transcorridas 24 horas do seu preparo e após o terceiro mês.

#### **4.3.4. Aplicação das emulsões**

As populações de pragas agrícolas que foram utilizadas nos bioensaios com as emulsões diluídas do óleo de andiroba, foram as de ácaros-rajados (*Tetranychus urticae*) e percevejos-marrom (*Euchistus heros*). Os ácaros-rajados foram coletados em infestações naturais em hortaliças e demais culturas que este tipo de praga acomete, enquanto que os percevejos foram coletados em infestações naturais em plantações de soja, cultivadas em campo, no Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), em Londrina, PR.

Foram colocados seis insetos de cada população de pragas, em placa de Petri, e em seguida, as emulsões diluídas e demais soluções foram aplicadas com pulverizador constituído de um aplicador (caneta para pintura) acoplado a um compressor de ar para laboratório (0,2 mL de cada solução). As emulsões do óleo de andiroba (óleo comercial)

foram avaliadas em diferentes concentrações (1,0; 2,0 e 5,0% (m/m)). Vertimec 0,3 % (V/V), cujo ingrediente ativo Abamectina (Figura 17), foi o controle positivo para os bioensaios com ácaros-rajados, enquanto que o Connect 0,2% (V/V), cujos ingredientes ativos Imidacloprido (Figura 18a) e Beta-Ciflutrina (Figura 18b), foi o controle positivo para os percevejos-marrom da soja. O controle negativo das emulsões e a água destilada foram utilizados como testemunha negativa.

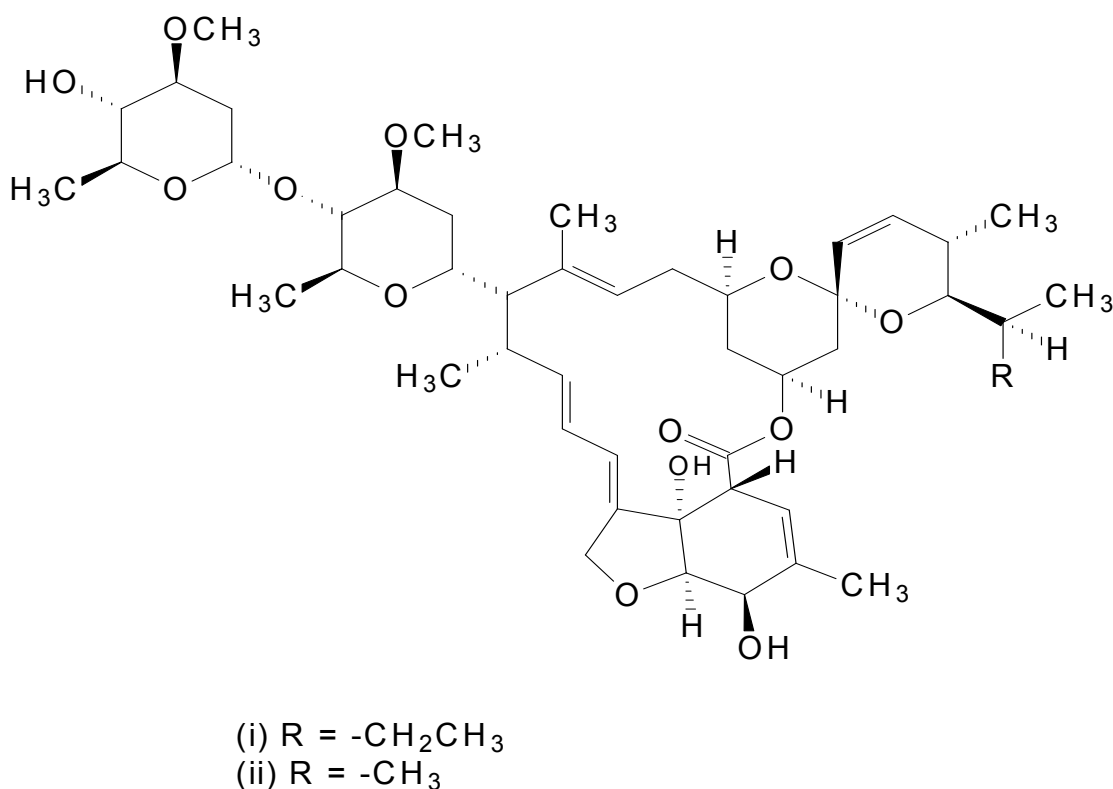


Figura 17: Fórmulas estruturais dos componentes que constituem o ingrediente ativo abamectina (Fonte: ANVISA).

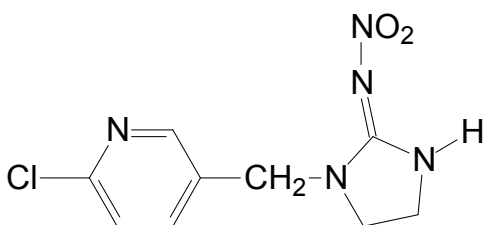


Figura 18a: Fórmula estrutural Imidacloprido (Fonte: ANVISA).

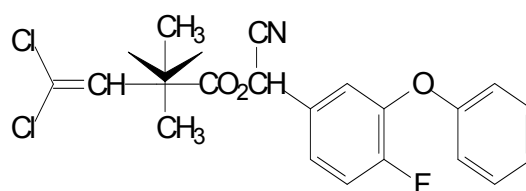


Figura 18b: Fórmula estrutural Beta-Ciflutrina (Fonte: ANVISA).

Após as pulverizações, as placas de Petri contendo os insetos - alvos foram fechadas com filme plástico de PVC laminado, perfurado com alfinete para permitir a aeração, e

mantidas em laboratório à temperatura de 25°C, com umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  durante 24 horas.

Foram utilizados, nos bioensaios, oito tratamentos em duplicata, com cada ensaio constituído de seis insetos, para cada praga agrícola.

As avaliações de mortalidade das pragas foram realizadas por 24 horas, após a pulverização, ocasião em que também foi registrado e retirado o número de insetos mortos oriundos de adultos tratados. Os resultados foram submetidos à análise pelo teste estatístico Friedman pois os dados não tinham uma distribuição normal dos erros, utilizando, desta forma, a estatística não-paramétrica no programa Biostat.

#### **4.3.5. Preparo de micropartículas poliméricas contendo extrato vegetal de *Carapa guianensis* (óleo de andiroba), formuladas pelo método de emulsão simples e evaporação do solvente orgânico, a partir do polímero poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV)**

Uma solução de PHBV em clorofórmio 5% (m/V) (correspondendo, em massa, a 2g) (40mL) foi previamente preparada e o óleo vegetal de *Carapa guianensis* (0,600g) foi adicionado, para posterior adição, sobre uma solução aquosa de PVAI a 2% (m/V) (correspondendo, em massa, a 4g) (200mL), sob agitação mecânica de 3000 rpm por 5 minutos, a uma temperatura de 35°C.

Com a formação de uma emulsão estável (ausência de separação de fases), o solvente orgânico (clorofórmio) foi evaporado totalmente em capela sob agitação de 800 rpm de 4 a 7 horas. A suspensão de micropartículas poliméricas formada foi centrifugada em 3500 rpm por 15 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi armazenado em frascos separados e as micropartículas poliméricas foram lavadas duas vezes com água destilada para retirada do resíduo de PVAI. Após cada lavagem, as amostras foram sendo centrifugadas a 3500 rpm durante 10 minutos, com posterior eliminação da água residual. As micropartículas foram secas em placas de Petri sob temperatura ambiente, para a posterior caracterização e cálculo de rendimento. Segundo este mesmo procedimento foram preparadas micropartículas poliméricas contendo 30%, 50% e 70% de óleo em relação à massa de PHBV (2g) (Tabela 3).

TABELA 3

Formulações de micropartículas poliméricas preparadas, segundo o método de emulsão simples e evaporação do solvente orgânico, sem óleo (MP1) e contendo óleo (MP2, MP3, MP4).

Formulações preparadas	Óleo (%) (m/m)
MP1(controle)	0
MP2	30
MP3	50
MP4	70

#### 4.3.6. Preparo de misturas físicas entre o PHBV e o óleo de andiroba

As misturas físicas (MF) foram confeccionadas nas seguintes proporções: 10mL de solução de PHBV em clorofórmio a 5% (m/V) (referente à massa de 0,5g de polímero) e 0,15g (MF1), 0,25g (MF2) e 0,35g (MF3) de óleo de andiroba. As proporções foram feitas com base nas formulações das micropartículas poliméricas preparadas anteriormente. O preparo das misturas físicas consistiu em adicionar a três béqueres 10mL de solução de PHBV em clorofórmio a 5% (m/V) e, a cada béquer, adicionar quantidades crescentes de óleo de andiroba (compreendendo 0,15g, 0,25g e 0,35g). A quantidade de óleo adicionado, no preparo das misturas físicas, portanto, foi de 30%, 50% e 70% (m/m) em relação à massa de polímero PHBV presente em cada formulação. As misturas foram vazadas em moldes e deixadas ao ar, para perda do solvente por evaporação. As misturas físicas foram designadas por MF1, MF2 e MF3 e todas foram caracterizadas pelas seguintes técnicas: IVTF, DRX, CED, ATG-ATD e MEV.

Segundo este mesmo procedimento misturas físicas foram preparadas utilizando-se PHBV puro (0,5g) (não estando em solução) e as respectivas massas de óleo citadas acima (0,15g, 0,25g e 0,35g). Assim como MF1, MF2 e MF3, as novas misturas físicas designadas como MF4 (polímero puro), MF5 (30%), MF6 (50%) e MF7 (70%) de óleo em relação à massa de PHBV (0,5g), foram caracterizadas pelas técnicas aqui já relatadas.

#### 4.3.7. Rendimento das formulações de micropartículas de PHBV

O rendimento das formulações de micropartículas MP1 (grupo controle), MP2, MP3 e MP4 foi determinado de acordo com a Equação 1.

$$R = \frac{\text{massa micropartículas}}{\text{massa (PHBV + óleo)}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

#### 4.3.8. Caracterização das micropartículas poliméricas de PHBV e das misturas físicas PHBV/óleo

##### 4.3.8.1. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

As micropartículas poliméricas de PHBV carregadas com óleo de andiroba, não carregadas, o polímero PHBV puro e as misturas físicas entre óleo e polímero foram avaliados por espectroscopia na região do infravermelho entre  $4000 \text{ cm}^{-1}$  e  $400 \text{ cm}^{-1}$ , em pastilha de KBr, em equipamento Excalibur Series FTS 3500GX, Bio-Rad Laboratories, 32 scans/min, resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , no Departamento de Química (DQUI) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). O óleo de andiroba puro foi avaliado nas mesmas condições e equipamento, em placa de KBr de alta pureza.

##### 4.3.8.2. Difração de raios – X (DRX)

As micropartículas poliméricas contendo óleo de andiroba e sem o mesmo, bem como o polímero PHBV puro e as misturas físicas óleo/polímero foram examinados em difratômetro de raios-X Shimadzu XRD-6000, scan de  $2^\circ/\text{min}$  e  $2\theta$  de  $5^\circ$  a  $50^\circ$ , radiação  $K\alpha$  do cobre ( $\lambda=1.5418\text{Å}$ ), corrente de 40 mA e voltagem 40 KV, para a observação de picos indicativos de cristalinidade e de regiões amorfas além de alterações na cristalinidade do polímero PHBV puro (CANEVAROLO JR., 2004; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Estas análises foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

##### 4.3.8.3. Calorimetria exploratória diferencial (CED)

As análises das amostras de micropartículas contendo óleo, sem o óleo, das misturas físicas entre PHBV e óleo e do PHBV puro, por calorimetria exploratória

diferencial, foram feitas no Departamento de Química (DQUI) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em equipamento Netzsch DSC 203 F1 MAIA, a uma faixa de temperatura de  $-40$  a  $200$  °C, com taxas de aquecimento e de resfriamento de  $10$  °C.min<sup>-1</sup>, sob fluxo de nitrogênio de  $50$  mL.min<sup>-1</sup>. A programação de temperatura foi correspondente, primeiramente a uma rampa de aquecimento, partindo da temperatura ambiente até  $200$  °C; resfriamento de  $200$  °C a  $-40$  °C e, novamente, rampa de aquecimento de  $-40$  até  $200$  °C. Para construção das curvas e avaliação dos resultados, foi utilizada a segunda rampa de aquecimento.

#### **4.3.8.4. Análise termogravimétrica (ATG) e análise térmica diferencial (ATD)**

As análises termogravimétrica e a térmica diferencial das micropartículas de PHBV contendo óleo, sem o óleo, das misturas físicas entre o PHBV e o óleo, do óleo vegetal de *C. guianensis* e do PHBV puro foram realizadas no Laboratório de Análise de Minerais e Rochas (LAMIR) – UFPR. As análises foram feitas em atmosfera oxidativa em equipamento Netzsch TG 209, em uma faixa de temperatura de  $30$  °C a  $1000$  °C ou entre  $30$  °C e  $800$  °C.

#### **4.3.8.5. Estudo morfológico e de superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

O estudo morfológico e de superfície das micropartículas de poli(hidroxibutirato-co-valerato) (PHBV) carregadas com o extrato vegetal de *Carapa guianensis* e sem o mesmo (grupo controle) e de todas as misturas físicas preparadas, foi realizado por microscopia eletrônica de varredura (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As micropartículas de PHBV e as misturas físicas foram secas em estufa a vácuo a  $40$  °C e fixadas em suporte metálico. Em seguida, foram submetidas à metalização com cobre no equipamento Balzers Sputtering SCD-030. Para visualização das amostras foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6360 LV, com voltagens de aceleração de  $15$  kV.

#### **4.3.8.6. Análise granulométrica**

A distribuição de tamanho (granulométrica) das micropartículas contendo óleo de andiroba e sem o mesmo (grupo controle) foi realizada no Laboratório de Análise de Minerais e Rochas (LAMIR) – UFPR. As análises foram feitas em granulômetro a laser sendo que, para proceder as análises, foi necessário preparar dispersões estáveis (turvas) das micropartículas em água deionizada, realizadas no próprio equipamento, com ajuda de

ultrassom ativo durante 60 segundos. Para calibrar o aparelho foi adicionada água deionizada (branco). O equipamento opera sob uma faixa de detecção entre 0,04 e 500  $\mu\text{m}$ . Para determinar a uniformidade de tamanho das formulações (Span) foram usados os dados obtidos nestas análises e a Equação 2 abaixo.

$$\text{Span} = d(v,90\%) - d(v,10\%) / d(v,50\%) \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo que: d = diâmetro das micropartículas e v = volume analisado.

#### **4.3.9. Controle de qualidade do óleo de andiroba encapsulado**

Com a finalidade de confirmar a presença dos limonóides, substâncias com provável ação inseticida, na composição do óleo de andiroba utilizado foi realizado um estudo cromatográfico do óleo de andiroba puro e de alguns padrões de limonóides fornecidos pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Foram preparadas soluções em tetrahidrofurano (THF) grau CLAE dos seguintes tetranortriterpenóides: gedunina e 6 $\alpha$ -acetoxigedunina na concentração de 1,0 mg. mL<sup>-1</sup>. Uma solução do óleo de andiroba puro em THF foi preparada na mesma concentração. Todas as amostras foram filtradas em membrana 0,45 $\mu\text{m}$ . A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada em cromatógrafo da marca Waters com detector de fotodiodo (DAD). A coluna usada foi a X-Terra C-18 de fase reversa, com 5 $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula, comprimento de 250 mm e 4,6 mm de diâmetro. A fase móvel foi composta de acetonitrila:água na proporção de 70:30 (V/V), e esta foi previamente filtrada por meio de membrana de 0,45 $\mu\text{m}$  e desgaseificada em ultrassom. O fluxo mantido foi de 0,8 mL. min<sup>-1</sup>, em modo isocrático, volume e injeção de 10 $\mu\text{L}$  a uma temperatura de 30°C. O detector foi utilizado em uma faixa de 400 a 210 nm, na qual a aquisição dos picos foram em exatamente 214 nm.

#### **4.3.10. Determinação da eficiência de encapsulação (%) do óleo de andiroba: método direto e indireto**

##### **4.3.10.1. Método direto**

A eficiência de encapsulação (%) do óleo de andiroba no interior das micropartículas MP2, MP3 e MP4, foi determinada, por método direto, por meio de espectrofotometria na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) por medida do comprimento de onda máximo em

245 nm da quantidade de óleo encapsulado depois de realizada a extração do óleo das micropartículas poliméricas (PÉREZ *et al.*, 2000).

100 mg das micropartículas contendo óleo foram submetidas à extração com hexano destilado (10 mL) em sistema de refluxo por meio de agitação magnética branda durante 24 horas. Decorridas as 24 horas, a suspensão de micropartículas em hexano foi filtrada por meio de filtro Millipore de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ . A solução hexânica resultante foi analisada por espectrofotometria na região do ultravioleta - visível (UV-Vis), na faixa de 600 a 190 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico. Para quantificação do óleo foi necessário construir uma curva analítica utilizando seis soluções do óleo em uma faixa de 1,0 – 8,0  $\text{mg. mL}^{-1}$ , em hexano destilado. Com os valores de absorvância em 245 nm, obtido com as respectivas concentrações, foi construída a curva analítica. A concentração de óleo presente nas soluções resultantes da extração foi obtida conhecendo os valores de absorvância das mesmas. As concentrações das soluções na construção da curva analítica foram determinadas de acordo com a quantidade teórica de óleo de andiroba presente em 100 mg de micropartículas poliméricas de PHBV. Por meio da análise das soluções, após a extração, foi possível determinar a quantidade experimental de óleo de andiroba encontrada em 100 mg de micropartículas. A partir destes valores obtidos, foi determinada a porcentagem de encapsulação.

Estes resultados foram comparados com os obtidos pelo método indireto descrito a seguir, no qual a eficiência de encapsulação foi determinada pela quantidade de óleo não encapsulado determinado na fase aquosa externa (solução aquosa de PVAI a 2% (m/V)).

#### **4.3.10.2. Método indireto**

A eficiência de encapsulação (%) do óleo de andiroba (Equação 3) foi obtida para as formulações MP2, MP3 e MP4 por método indireto, por meio da quantificação de óleo presente nos sobrenadantes armazenados (solução aquosa de PVAI), provenientes de cada formulação. A determinação foi feita por espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), em espectrofotômetro (Shimadzu), na faixa de absorção de 600 a 190 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico. Para a quantificação do óleo foi elaborada uma curva analítica utilizando cinco soluções do mesmo em uma faixa de 0,016 – 0,13  $\text{g. L}^{-1}$ , em solução aquosa de poli(álcool vinílico) (PVAI) a 2% (m/V), adotando os valores de absorvância em 217 nm. A concentração do óleo presente nos

sobrenadantes foi obtida conhecendo os valores de absorvância dos mesmos. Por outro lado, a massa de óleo no interior das micropartículas poliméricas foi obtida determinando a massa de óleo presente em 200 mL de fase aquosa externa (sobrenadante) armazenada e subtraindo a da massa conhecida de óleo adicionada no preparo das formulações.

$$\text{Eficiência de encapsulação (\%)} = \frac{\text{massa do óleo nas micropartículas}}{\text{massa inicial do óleo}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

#### 4.3.11. Estudo de liberação *in vitro* do óleo de andiroba

As micropartículas poliméricas carregadas com óleo de andiroba (100 mg) foram colocadas em solução tampão fosfato (100 mL) de pH 5,6 contendo o tensoativo conhecido como Tween 80 a uma concentração de 0,3% (m/V). A mistura contendo as micropartículas com óleo foi mantida sob agitação magnética constante a uma temperatura de aproximadamente 35°C. Aliquotas (10 mL) foram retiradas em intervalos de 24 horas durante 5 dias, as quais foram filtradas em filtro Millipore 0,45µm de Nylon para reter as micropartículas poliméricas presentes e a solução resultante foi analisada por espectrofotometria na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) na faixa de 600 a 190 nm, com cubeta de quartzo de 1cm de caminho ótico para determinação da quantidade de óleo liberado a cada 24 horas. As determinações foram feitas em duplicata para cada formulação de micropartículas MP2, MP3 e MP4, contendo 30%, 50% e 70% de óleo de andiroba (m/m), respectivamente. Com a finalidade de manter constante o volume da mistura de liberação, uma solução tampão fosfato (10 mL) pH 5,6 mais Tween 80 0,3% (m/V) foi recolocada no recipiente utilizado neste estudo. Uma curva analítica foi elaborada na faixa de 0,005 a 0,1 g de óleo por 100 mL de tampão fosfato pH 5,6 mais 0,3% (m/V) de Tween 80 (MAJI *et al.*, 2007).

#### 4.3.12. Aplicação das micropartículas poliméricas de PHBV contendo o óleo

##### 4.3.12.1. Avaliação da toxicidade das micropartículas frente às larvas do mosquito *A. aegypti*

Larvas do mosquito *A. aegypti* (20 larvas) (Figura 19) foram expostas a uma concentração de 2,0 mg. mL<sup>-1</sup> em meio aquoso de micropartículas contendo óleo de andiroba em 4 réplicas (contendo 20 larvas), além do controle. As micropartículas contendo o óleo, designadas como MP2(30% de óleo m/m), MP3(50% de óleo m/m) e

MP4(70% de óleo m/m), foram colocadas em recipientes plásticos de capacidade de 300 mL contendo água mineral, num volume final de 100mL. Para o tratamento controle, realizado também em 4 réplicas, uma parcela das larvas foi exposta apenas à água mineral (Figura 20). Estes foram acondicionados a 25°C, umidade relativa 80%, em câmara climatizada. A mortalidade das larvas foi verificada após 24 horas de exposição ao produto aplicado, seguindo-se os procedimentos recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (1992) na interpretação dos padrões de suscetibilidade para a população estudada, verificação da resposta com a repetição do experimento e população resistente. Estes bioensaios seguiram o modelo para analisar resistência de populações de *A. aegypti* ao larvicida organofosforado Temefós (BESERRA *et al.*, 2007).

Os bioensaios larvicidas de laboratório foram conduzidos no Departamento de Zoologia, no laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da Universidade Federal do Paraná (UFPR).



Figura 19: Larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

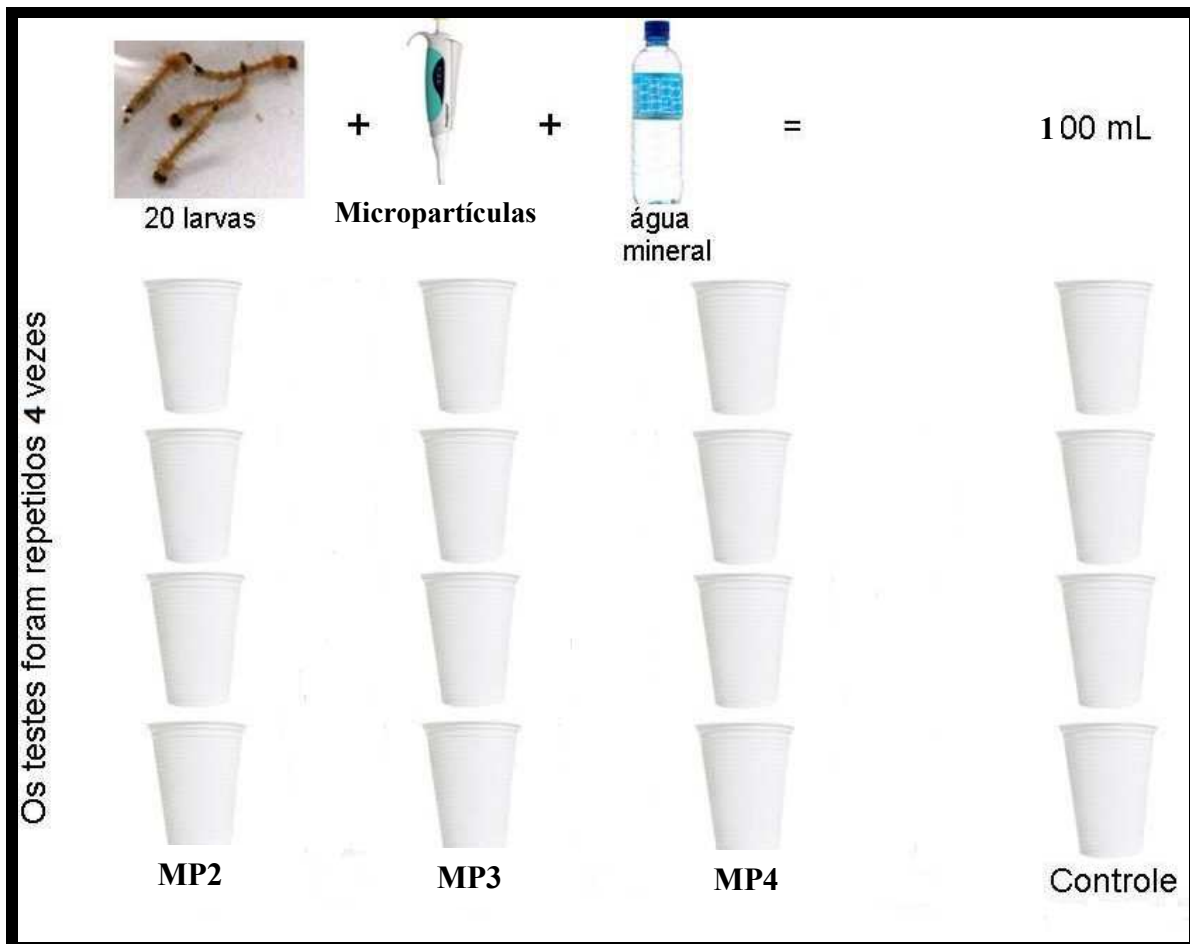


Figura 20: Esquema de bioensaio larvicida realizado para o *Aedes aegypti* com micropartículas contendo óleo de andiroba: MP2 (30% de óleo m/m); MP3 (50% de óleo m/m) e MP4 (70% de óleo m/m).

#### 4.3.12.2. Avaliação da toxicidade frente a indivíduos adultos da aranha-marrom *L. intermedia*

Para os testes de susceptibilidade e de avaliação preliminar da toxicidade do óleo de andiroba encapsulado frente às aranhas-marrom foram utilizadas as micropartículas poliméricas contendo o óleo, suspensas em água destilada, sem uma concentração previamente determinada. As micropartículas usadas nos procedimentos foram designadas como MP2 (30% de óleo m/m); MP3 (50% de óleo m/m) e MP4 (70% de óleo m/m). Os experimentos seguiram os modelos recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para monitoramento da resistência aos pesticidas (WHO, 1981; WHO, 1992).

Para os ensaios realizados, foi utilizado papel filtro qualitativo marca “Qualy” com 12,5 cm de diâmetro, gramatura 80 g/m<sup>2</sup>, espessura 205 µm e 0,5 % de cinza como substrato de aplicação das micropartículas contendo o óleo (DELAY, 2007). Sobre uma

bancada foram colocados quatro papéis filtro, sobre os quais foi adicionado, em vários pontos deslocalizados, um volume de 2 mL de cada suspensão de micropartículas. O solvente utilizado em todos os testes, inclusive no controle, foi água destilada. Após a aplicação, o material aderido ao filtro foi secado ao ar durante 24 horas individualmente e, sequencialmente, utilizado nos testes com as aranhas-marrom.

Para cada formulação de micropartículas contendo o óleo foram realizados os experimentos com quatro repetições cada e um indivíduo adulto para cada um, inclusive o controle. Devido ao canibalismo, foi necessário individualizar os tratamentos, sendo utilizado, para cada aranha, um recipiente descartável transparente de 12 cm de diâmetro com aproximadamente 11cm de altura. Os recipientes plásticos apresentaram uma abertura ao fundo para permitir a entrada de ar. Estes recipientes foram virados de boca para abaixo, ficando a boca do recipiente tampada e prensada ao papel impregnado pelas micropartículas, garantindo assim o contato da aranha com os produtos formulados. Decorridas 24 horas para cada experimento, foi registrado e anotado se ocorreu ou não mortalidade e alteração de comportamento dos animais estudados. Este estudo foi realizado na Universidade Tuiuti do Paraná sob a supervisão do Prof. Dr. Eduardo Novaes Ramires.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Preparo de emulsões contendo óleo de andiroba**

Emulsões foram preparadas com o extrato vegetal de *C. guianensis*, mantendo constante a quantidade de óleo vegetal e variando as proporções dos tensoativos Span 60 e Tween 80 (Tabela 4) com a finalidade de obter uma emulsão mais estável termodinamicamente, já que as mesmas são consideradas como instáveis. Sabe-se que o tensoativo Span 60 (Figura 21b), ou monoestearato de sorbitano, é um surfactante não iônico, utilizado na “solubilização” de óleos na água. O seu EHL é da ordem de 4,7, sendo considerado baixo e, portanto, pouco solúvel em água já que o número de mols de óxidos de etileno presentes em sua estrutura é pequeno. É um pó branco de fórmula molecular  $C_{24}H_{46}O_6$  (American Pharmaceutical Association, 2006). Assim como o Span 60, o Tween 80 (Figura 21a), ou polissorbato 80, é também um surfactante não iônico. Possui um valor de EHL da ordem de 15, sendo considerado alto e, por esse motivo, é bastante solúvel em água. É um líquido viscoso, de cor amarelada cuja fórmula molecular é  $C_{64}H_{124}O_{26}$

(American Pharmaceutical Association, 2006). Ambos são bastante usados como estabilizantes em produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos com grande possibilidade, portanto, de causarem pouca influência nos testes de toxicidade frente aos animais estudados.

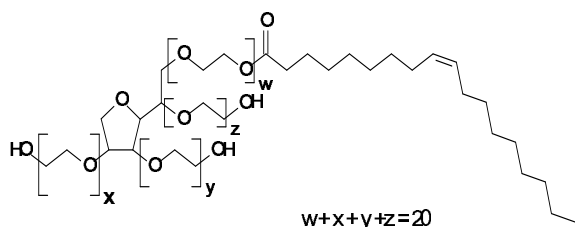


Figura 21a: Fórmula estrutural do Tween 80.

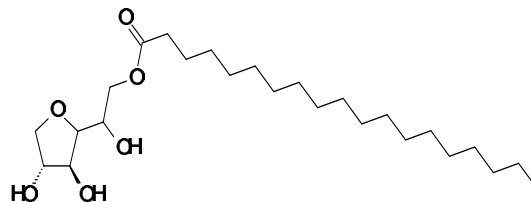


Figura 21b: Fórmula estrutural do Span 60.

A quantidade de óleo vegetal adicionada no preparo de emulsões com os pares de tensoativos Span 60 e Tween 80, foi de 10 g. As emulsões 1, 2 e 3 (Tabela 4) ficaram estáveis após 24 horas em repouso, ou seja, não ocorreu separação de fases (Figura 22), tendo apresentado aparência leitosa e cremosa. A de número 4 (Tabela 4) apresentou separação de fases como pode ser observado na Figura 23. As emulsões 1 e 2 apresentaram relativa homogeneidade, com a presença de poucos grumos (aspecto de coalhada), sendo este considerado um resultado bom, com valores de EHL determinados de 6,76 e 7,79 respectivamente (Tabela 4). A emulsão mais estável foi a 3, na qual apresentou-se homogênea, ausente de grumos, considerado este um resultado excelente, com valor de EHL determinado de 8,82 (Tabela 4). Por ser a mais estável, foi realizada a diluição da emulsão 3 para 5,0 % (m/m), 2,0 % (m/m) e 1,0 % (m/m) para realizar os testes em laboratório com os insetos selecionados. Por outro lado, a emulsão 4 mostrou separação de fases aquosa e oleosa, resultado este considerado ruim, com um valor de EHL de 15, compatível com o EHL do tensoativo Tween 80 (Tabela 4).

TABELA 4  
Emulsões preparadas com óleo vegetal de *C. guianensis* com Span 60 e Tween 80 em proporções diferentes, resultados observados nos ensaios e valores de EHL determinados para cada sistema

Emulsão	Span 60 (g)	Tween (g)	Observação após 24 horas	Aspecto	Resultado	EHL
1	4,0	1,0	Estável	Relativamente homogêneo	Bom	6,76
2	3,5	1,5	Estável	Relativamente homogêneo	Bom	7,79
<b>3</b>	<b>3,0</b>	<b>2,0</b>	<b>Estável</b>	<b>Homogêneo</b>	<b>Excelente</b>	<b>8,82</b>
4	0,0	5,0	Instável	Separação	Ruim	15



Figura 22: Emulsão estável de óleo vegetal de *C. guianensis*.



Figura 23: Separação de fases.

Com a finalidade de estender a durabilidade das emulsões preparadas, foi adicionado 0,20 % (m/m) e 0,05 % (m/m) dos conservantes Nipagin M e Nipasol P, respectivamente, em cada emulsão preparada.

O Nipagin M (Figura 24a) cujo nome químico é 4-hidroxibenzoato de metila (metilparabeno), é um conservante hidrossolúvel largamente utilizado como antimicrobiano em cosméticos, produtos alimentícios e farmacêuticos; assim como o Nipasol P, um conservante lipossolúvel (Figura 24b) cujo nome químico é 4-hidroxibenzoato de propila (propilparabeno) (American Pharmaceutical Association, 2006).

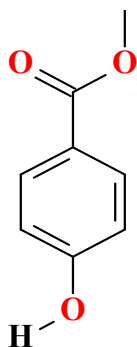


Figura 24a: Fórmula estrutural do Nipagin M.

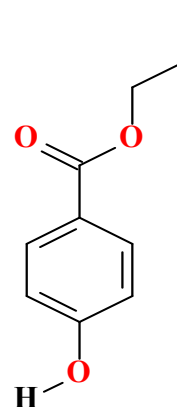


Figura 24b: Fórmula estrutural do Nipasol P.

Após a realização das diluições da emulsão 3, as emulsões diluídas foram mantidas sob repouso por 24 horas e, após esse tempo, as mesmas apresentaram-se estáveis. Essas emulsões foram aspergidas em folhas de uma planta, não identificada, localizada próxima ao Departamento de Farmácia – UFPR tendo sido observado, por trinta dias, uma boa aderência das emulsões às folhas e a não coalescência (separação de fases óleo/ água) nas superfícies das folhas. Esse teste simples foi importante para assegurar que as propriedades de aderência e estabilidade das emulsões são preservadas após o contato com as folhas, o que é de fundamental importância para uma possível aplicação destas emulsões no controle de alguma praga agrícola de interesse. É importante ressaltar, também, que nenhuma alteração foi observada na planta, mostrando que o extrato vegetal de *C. guianensis* não apresentou toxicidade ao substrato aplicado. Emulsões contendo os mesmos constituintes, exceto o óleo de andiroba (controle negativo) também foram preparadas (Figura 25) e apresentaram-se translúcidas com uma coloração esbranquiçada.



Figura 25: Aspecto da emulsão obtida sem o óleo (“Controle negativo”).

As emulsões diluídas e os respectivos controles negativos foram enviados para o Departamento de Agronomia da UEL onde foram testados frente às diversas pragas agrícolas, entre elas o *Tetranychus urticae*, ácaro rajado e o percevejo-marrom (*Euchistus heros*). Além disso, avaliações organolépticas (homogeneidade, brilho, opacidade entre outros) foram feitas para as emulsões preparadas com a finalidade de determinar o tempo de vida útil das mesmas (*shelf-life*), as quais serão abordadas a seguir.

## **5.2. Avaliação organoléptica e testes de estabilidade das emulsões estáveis: testes normais a longo prazo e acelerados a curto prazo**

A emulsão mais estável obtida entre todas as preparadas (Tabela 4), a número 3, foi utilizada nos testes de estabilidade normais a longo prazo e nos testes de estabilidade acelerados a curto prazo para avaliação de suas características organolépticas.

### **5.2.1. Testes de estabilidade normais a longo prazo**

Com relação à estabilidade física das emulsões, em termos de aparência e de aspecto, as mesmas, tanto expostas em ambientes com sol direto, com sol indireto ou escuro apresentaram a mesma estabilidade durante os três meses estudados, quanto à não separação de fases aquosa e oleosa. Porém, com o abaixamento da temperatura ambiente, elas apresentaram uma tendência em “solidificar”, ou seja, ocorreu um aumento na viscosidade. O pH medido durante todo este período (3 meses) foi mantido constante e igual a 5,0 na temperatura ambiente para todas as emulsões estudadas. De acordo com a literatura, valores baixos de pH, em torno de 5,0 e 6,0, são características que ajudam a inibir o crescimento microbiano nas emulsões e, por consequência, a estabilidade é mantida (GENNARO, 2004).

Como relatado na literatura, para avaliação do aspecto ou aparência do produto final, é preciso definir primeiramente as características que se deseja (ZANIN *et al.*, 2001). Portanto, dentre estas características organolépticas, foi desejado que as emulsões apresentassem, como qualidades aceitáveis, homogeneidade, brilho, macio (sem aspecto fibroso), fino (não grosso, menos viscoso) e opacidade. Dentro destas qualidades o produto final que se apresentar heterogêneo, opaco, fibroso, grosso e opalescente são considerados defeitos sérios encontrados nas emulsões formuladas. Por outro lado, homogêneo, brilhante, macio, fino e translúcido ou perolado constitui-se em características desejáveis para este tipo de produto (ZANIN *et al.*, 2001).

Na avaliação do aspecto das emulsões expostas em ambiente com sol direto durante três meses (Tabela 5), foi possível observar que estas se mantiveram homogêneas, sem a ocorrência de separação da fase aquosa da oleosa nem tampouco foi observado a presença de grumos. As mesmas se apresentaram brilhantes, macio sem aspecto fibroso, fino ou fluida sem se apresentar grossa e por fim opacas, este um defeito considerado sério mas aceitável para a aplicação que se deseja efetuar.

Para as emulsões avaliadas em ambiente com sol indireto (Tabela 5) e em ambiente escuro (Tabela 5) foi observado que elas mantiveram seu aspecto físico homogêneo, brilhante, macio, fino e opaco conforme relatado anteriormente para as estudadas em ambiente com sol direto.

TABELA 5  
Embalagem de vidro – estudo da estabilidade em ambiente com sol direto, indireto e em ambiente escuro realizado na cidade de Curitiba entre os meses de setembro a novembro

<b>Características avaliadas</b>	<b>Três meses de avaliação</b>
Homogeneidade	Homogênea
Brilho	Brilhante
Macio	Macio
Fino	Fino
Opacidade	Opaco

### 5.2.2. Testes de estabilidade acelerados a curto prazo

Os testes de estabilidade acelerados a curto prazo, mostraram que a estabilidade física das emulsões estudadas, em termos de aparência e de aspecto foi alterada quando foram expostas a ciclos de estresse relacionados a um aumento drástico na temperatura dos sistemas (Tabela 6) ou à submissão destas a rotações por minuto elevadas por determinado tempo (Tabela 8). Essas emulsões apresentaram separação de fases aquosa e oleosa com presença significativa de grumos. Estas alterações sofridas quanto às suas características avaliadas (Tabela 6 e 8) são consideradas como defeitos considerados sérios e não aceitáveis como já relatado nos testes de estabilidade normais a longo prazo. As emulsões submetidas à temperaturas mais baixas não tiveram suas estabilidades físicas alteradas

(Tabela 7) com relação às características organolépticas observadas as quais foram consideradas aceitáveis.

As emulsões colocadas em estufa a 50°C e em centrífuga a 3500 rpm por 50 minutos tiveram seus pHs medidos antes (5,0) e depois (7,0) da realização dos testes de estabilidade acelerados a curto prazo. Esta mudança nos valores de pH sugerem uma alteração da estabilidade após o preparo de todas as formulações, permitindo, de certa forma, a proliferação de microorganismos, por exemplo.

Por outro lado, as emulsões colocadas em geladeira a 10°C não apresentaram alteração nos valores de pH os quais mantiveram-se constante e igual a 5,0. Este é um indicativo de estabilidade do sistema, de acordo com a literatura (GENNARO, 2004).

TABELA 6

Embalagem de vidro – avaliação das propriedades organolépticas das emulsões sob estresse (estufa a 50°C)

<b>Características avaliadas</b>	<b>Período de 24 horas</b>
Homogeneidade	Heterogêneo
Brilho	Opaco
Macio	Fibroso
Fino	Grosso
Opacidade	Opalescente

TABELA 7

Embalagem de vidro – avaliação das propriedades organolépticas das emulsões sob estresse (geladeira a 10°C)

<b>Características avaliadas</b>	<b>Período de 24 horas</b>
Homogeneidade	Homogênea
Brilho	Brilhante
Macio	Macio
Fino	Fino
Opacidade	Opaco

TABELA 8  
Avaliação das propriedades organolépticas das emulsões sob estresse (centrífuga a 3500 rpm)

<b>Características avaliadas</b>	<b>50 minutos</b>
Homogeneidade	Heterogênea
Brilho	Opaco
Macio	Fibroso
Fino	Grosso
Opacidade	Opalescente

### 5.3. Caracterização das emulsões por meio de microscopia ótica

As emulsões mais estáveis e, por consequência, a mais homogênea entre todas as preparadas, as de número 3 (Tabela 4), foram avaliadas por meio da microscopia ótica para observação e confirmação da estabilidade das emulsões após a preparação e após três meses de preparo. As emulsões foram fotografadas e os resultados são mostrados nas Figuras 26a, 26b, 26c, 26d. As imagens revelaram o mesmo perfil após a preparação e após três meses de preparo das emulsões, com glóbulos de óleo de andiroba bem formados e definidos, em geral mais homogêneos, apesar da presença de glóbulos menores, em menor proporção. A presença nítida destes glóbulos menores em meio aos maiores torna possível a ocorrência de agregação dos menores com os maiores desestabilizando o sistema de maneira mais rápida. Mas como a existência desses glóbulos menores é insignificante em comparação com os maiores, a distribuição de tamanho é considerada como mais homogênea, portanto, a agregação é menor e a distribuição mais uniforme conferindo maior estabilidade ao sistema emulsionado. A presença de glóbulos mais homogêneos em diâmetro, agregação e distribuição são sinais visíveis de estabilidade das emulsões.

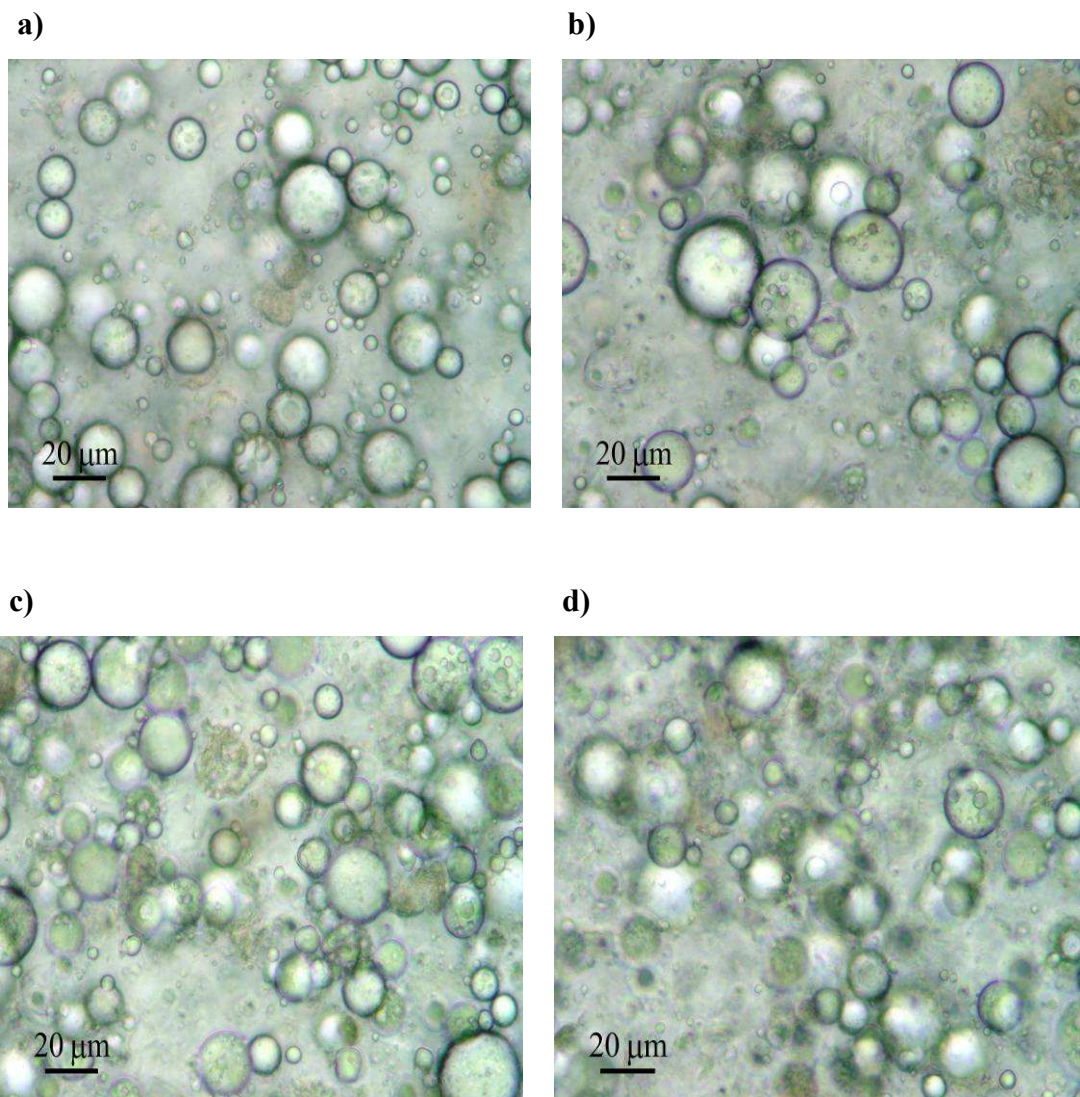


Figura 26: Fotografias correspondentes às emulsões mais estáveis obtidas (Fonte: Laboratório fotográfico Prof. Márcio Chimelli – UFPR).

## 5.4. Aplicação das emulsões

### 5.4.1. Toxicidade das emulsões do óleo de andiroba para os ácaros rajados

Com relação aos bioensaios realizados com os ácaros rajados, foi verificado que, conforme as concentrações do óleo de andiroba foi aumentada na forma de emulsões (1, 2 e 5% m/m) bem como o tempo após as aplicações das mesmas (24 horas), ocorreu um acréscimo na mortalidade para esta praga agrícola (Tabela 9).

Decorridas 24 horas após a aplicação das emulsões e do inseticida comercial Vertimec, a emulsão contendo 5% do óleo de andiroba ocasionou mortalidade em porcentagem semelhante ao controle positivo (Vertimec), levando-se em consideração os desvios padrão calculados para ambas. Todas as emulsões do óleo de andiroba mostraram

mortalidade frente à praga utilizada, com média variando de 3,50 a 6,06%. A emulsão do óleo a 5% provocou alta mortalidade, comparando-se com a mortalidade causada pela solução de Vertimec 0,3%. (Tabela 9).

O Vertimec é um inseticida comercial utilizado no controle do ácaro rajado (*Tetranychus urticae*), o qual acomete diversas hortaliças e culturas como da uva, do morango e do mamão (Ministério da Agricultura e Abastecimento, 2003).

TABELA 9  
Mortalidade (%) de insetos submetidos à aplicação de emulsões do óleo de andiroba em diferentes concentrações

Tratamento	24 horas após pulverização <sup>a</sup>
1 – Emulsão do óleo a 1% (m/m)	3,50 ± 1,24a
2 – Emulsão do óleo a 2% (m/m)	4,93 ± 2,96ab
3 – Emulsão do óleo a 5% (m/m)	6,06 ± 3,20ab
4 – Solução Vertimec 0,3 % (V/V)	7,75 ± 1,07b

<sup>a</sup>média em % ± desvio padrão. As % seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Friedman.

#### 5.4.2. Toxicidade das emulsões do óleo de andiroba para os percevejos

Foi verificado que, independente das concentrações do óleo de andiroba testadas (1, 2 e 5%, m/m), não foi registrada mortalidade dos percevejos (10 adultos) durante realização deste bioensaio. O tratamento controle (negativo), composto de emulsões de mesma composição das contendo óleo, mas sem o mesmo, também não mostrou mortalidade frente aos percevejos estudados.

A avaliação do efeito de emulsões de outros óleos de origem vegetal, preparados de forma semelhante ao descrito nesta dissertação, frente à outras pragas agrícolas que causam grande impacto econômico e em diversas culturas está em andamento em colaboração com o grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Maurício Ursi Ventura do Departamento de Agronomia da Universidade estadual de Londrina. Resultados promissores estão sendo obtidos e podem levar ao desenvolvimento de metodologias alternativas de controle de importantes pragas agrícolas.

### 5.5. Desenvolvimento de micropartículas de poli(hidroxibutirato-co-valerato) (PHBV)

As suspensões de micropartículas poliméricas sem o óleo de andiroba (grupo controle) (MP1) e aquelas contendo o óleo em quantidades crescentes (MP2, MP3 e MP4) (Tabela 10) foram obtidas com sucesso pelo método de emulsão simples seguida de evaporação do solvente orgânico, de acordo com a literatura (FARAGO *et al.*, 2008). Elas foram obtidas como um líquido branco, com aspecto leitoso. As concentrações de PHBV e de poli(álcool vinílico) (PVAI) utilizadas no preparo das formulações foram obtidas com base em trabalhos anteriores desenvolvidos pelo grupo de pesquisa (FARAGO *et al.*, 2008) e as quantidades de óleo foram estabelecidas previamente na expectativa de incorporar o maior teor de óleo possível.

Não foi observado excesso de óleo de andiroba na superfície das suspensões formuladas e, após centrifugação e descarte do sobrenadante aquoso para eliminação do estabilizante PVAI, também não foi observada presença do óleo. Esta observação, apesar de sugerir encapsulação total do óleo, não é conclusiva já que é possível que uma parte do mesmo esteja emulsionado em meio à solução aquosa de poli(álcool vinílico) (PVAI). Todas as formulações (Tabela 10) foram caracterizadas por meio de técnicas convencionais como espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF), difração de raios – X (DRX), calorimetria exploratória diferencial (CED), análise termogravimétrica (ATG) e análise térmica diferencial (ATD), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise granulométrica.

TABELA 10  
Formulações de micropartículas de PHBV

Suspensão de micropartículas	PHBV (m/V) em Clorofórmio (%)	PVAI (m/V) Água (%)	Óleo de andiroba (g)	óleo em relação massa de PHBV, % (m/m)
MP1 (Controle)	5,0	2,0	0,00	0
MP2	5,0	2,0	0,60	30
MP3	5,0	2,0	1,00	50
MP4	5,0	2,0	1,40	70

### 5.6. Preparo de misturas físicas entre o PHBV e o óleo de andiroba

As misturas físicas preparadas entre o PHBV e o óleo de andiroba (Tabela 11), designadas como MF1, MF2 e MF3, contendo 30%, 50% e 70% (m/m) de óleo com relação à massa de polímero adicionado, foram obtidas como um filme plástico resistente de coloração branca. Paralelamente, um filme contendo PHBV puro (MF) (Tabela 11) foi preparado com solução do polímero a 5% (m/V) em clorofórmio (10 mL) para efeito comparativo. O filme de polímero puro apresentou-se quebradiço com menor resistência quando comparado aos filmes que contém óleo em sua formulação, com um aspecto quase transparente. Todos estes filmes desenvolvidos foram caracterizados por meio de técnicas como espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF), difração de raios-X (DRX), calorimetria exploratória diferencial (CED), análise termogravimétrica (ATG) e análise térmica diferencial (ATD) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), com a finalidade de comparar estes sistemas com as micropartículas poliméricas contendo óleo de andiroba.

TABELA 11  
Formulações de misturas físicas

Misturas físicas	Solução de PHBV <sup>a</sup> (mL)	Óleo de andiroba (g)	Quantidade de óleo, % (m/m) <sup>b</sup>
MF	10 (0,5g)	0,00	0
MF1	10 (0,5g)	0,15	30
MF2	10 (0,5g)	0,25	50
MF3	10 (0,5g)	0,35	70

<sup>a</sup> solução a 5% (m/V)

<sup>b</sup> com relação a massa de PHBV

### 5.7. Rendimento das formulações de micropartículas poliméricas de PHBV

Com base na Equação 1 (pág. 36) foi possível calcular os rendimentos médios de cada formulação de micropartículas poliméricas e seus respectivos desvios padrão (Tabela 12). Foi observado que, conforme a quantidade de óleo de andiroba foi aumentada, o rendimento, de maneira geral, aumentou com relação ao rendimento obtido para MP1 que

não continha o mesmo. Esta constatação é um indicativo de que o óleo de andiroba adicionado em cada formulação foi encapsulado, já que a quantidade de polímero no preparo de cada formulação se manteve constante e a quantidade de óleo foi aumentada. Além disso, foi observado que ocorreu um aumento significativo no rendimento médio, comparando-se o do grupo controle (MP1) com os das demais formulações.

TABELA 12  
Rendimentos e desvios padrão médios das formulações de micropartículas poliméricas

Formulações de micropartículas	PHBV (g)	Óleo de andiroba (g)	Rendimento (%)	Desvio padrão (%)
MP1	2,00	0,00	66,30	1,80
MP2	2,00	0,60	89,04	0,60
MP3	2,00	1,00	86,33	1,00
MP4	2,00	1,40	87,64	1,50

média (n=2) ± desvio padrão

## 5.8. Caracterização das micropartículas poliméricas de PHBV e das misturas físicas PHBV/Óleo

### 5.8.1. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

A análise por IVTF do óleo vegetal puro de *C. guianensis* (Figura 27) mostrou algumas bandas principais características, referentes aos grupos funcionais presentes no extrato vegetal, como a deformação axial simétrica em que as ligações de  $-CH_3$  se estendem e contraem em fase em  $2927\text{ cm}^{-1}$ , a deformação axial simétrica de  $-CH_2$  em  $2856\text{ cm}^{-1}$ , a deformação axial de  $-C=O$  de ésteres alifáticos saturados em  $1749\text{ cm}^{-1}$ , a deformação angular assimétrica de  $-C-H$  em  $1451\text{ cm}^{-1}$ , a deformação correspondente aos  $-C-O-C-$  de ésteres saturados entre  $1210\text{ cm}^{-1}$  e  $1160\text{ cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

As micropartículas de PHBV sem o óleo, assim como o espectro do polímero PHBV puro (Figura 27) mostraram bandas características como a deformação axial de  $-C-H$  em  $2987\text{ cm}^{-1}$ , deformação axial de ésteres alifáticos saturados em  $1732\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular assimétrica de  $-C-H$  em  $1454\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular de  $-C-H$  referente aos grupos metila  $-CH_3$  em  $1389\text{ cm}^{-1}$ , a deformação correspondente aos  $-C-O-$

C- de ésteres saturados entre  $1200\text{ cm}^{-1}$  e  $1100\text{ cm}^{-1}$ , deformação angular no plano de  $\text{-C-H}$  em  $1059\text{ cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

As micropartículas de PHBV contendo o óleo vegetal assim como a mistura física PHBV e óleo (Figura 27) apresentaram bandas resultantes da superposição das encontradas nos espectros de infravermelho do polímero PHBV e do óleo vegetal puro, o que sugere que ocorreu apenas uma interação física entre o óleo e o polímero. Os resultados de infravermelho sugerem a encapsulação do óleo.

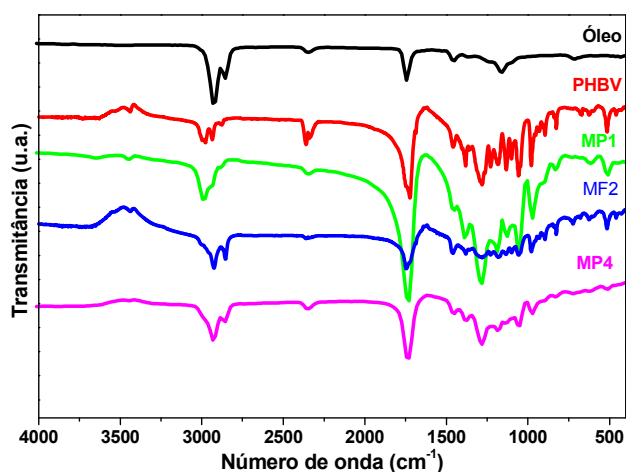


Figura 27: Espectros na região do infravermelho do óleo de andiroba; do polímero puro (PHBV); das micropartículas sem óleo (MP1); da mistura física (MF2) (50%) e das micropartículas contendo o óleo (MP4) (70%).

### 5.8.2. Difração de raios – X (DRX)

Mediante a inspeção dos difratogramas mostrados na Figura 28, foi possível observar os picos estreitos de cristalinidade do polímero PHBV, referente às suas regiões cristalinas e alguns mais alargados, indicativos da presença de regiões amorfas. O perfil do difratograma das micropartículas sem óleo (MP1), grupo controle, mudou de forma significativa, comparado com o PHBV puro sugerindo que o processo usado para a encapsulação influenciou na cristalinidade do polímero puro. O mesmo perfil de cristalinidade foi mantido nas demais formulações de micropartículas de PHBV contendo o óleo vegetal de *C. guianensis* e nas misturas físicas entre PHBV e o óleo de andiroba, não ocorrendo variação no valor de  $2\theta$  apesar da mudança na intensidade dos picos cristalinos e na região correspondente à fase amorfa. Porém, com o aumento na quantidade do óleo, foi observado um alargamento no pico em aproximadamente  $21\theta$ , comportamento este também observado para a mistura física. Essa mudança na cristalinidade está associada

com uma interação física favorável entre o polímero e o óleo. Como o alargamento ocorreu na região amorfa do PHBV, pode-se sugerir que a interação polímero/óleo está ocorrendo nas regiões amorfas do polímero, além de ocorrer igualmente nas regiões cristalinas devido a uma diminuição na intensidade dos picos estreitos indicativos de cristalinidade. Diante destes resultados, pode-se indicar que o óleo foi encapsulado e que ocorreu a formação de micropartículas poliméricas do tipo microesferas.

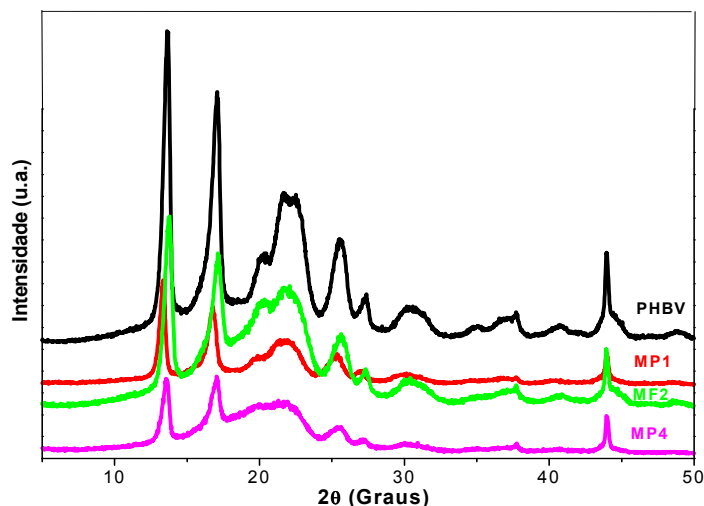


Figura 28: Difratogramas do PHBV puro; das micropartículas sem óleo (MP1) (grupo controle); da mistura física (MF2) (50%); das micropartículas contendo o óleo (MP4) (70%).

### 5.8.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (CED)

Na Figura 29 e na Tabela 13 são mostrados os resultados obtidos da avaliação do comportamento térmico dos materiais por calorimetria exploratória diferencial (CED). As curvas de CED (Figura 29) sugerem que o óleo foi encapsulado já que, com base nos valores obtidos para as temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ) e para as temperaturas de fusão cristalina ( $T_m$ ) (Tabela 13), o óleo de andiroba, material amorfo, interagiu com as regiões amorfas do polímero e com as regiões cristalinas. Esta constatação foi feita com relação às variações observadas nos valores de  $T_g$  e  $T_m$  para as formulações de micropartículas e para a mistura física entre PHBV e o óleo de andiroba, quando comparado com a  $T_g$  e a  $T_m$  do polímero puro.

Estes resultados estão em concordância com os obtidos por difração de raios-X, uma vez que ocorreu uma alteração da fração cristalina com o aumento da fração amorfa, sem que tenham sido observadas novas estruturas cristalinas.

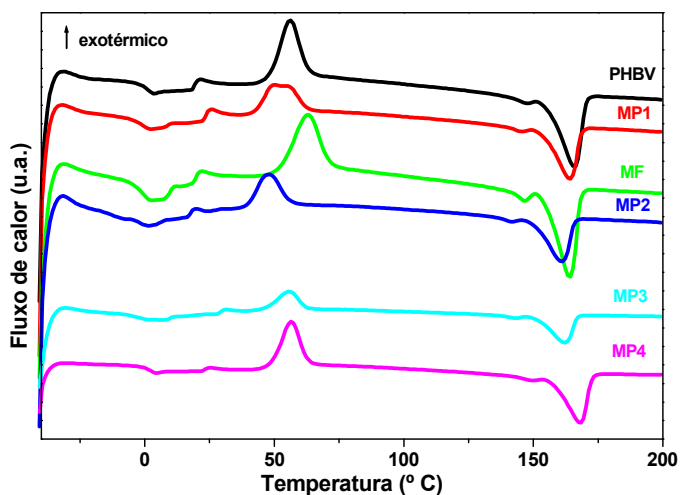


Figura 29: Curvas de CED do polímero puro (PHBV); das micropartículas sem óleo (MP1); da mistura física (MF2) (50%); e das micropartículas contendo o óleo em quantidades crescentes (MP2, MP3 e MP4) (30%, 50% e 70%), respectivamente.

TABELA 13  
Valores de T<sub>g</sub> e T<sub>m</sub> obtidos pelas curvas de CED

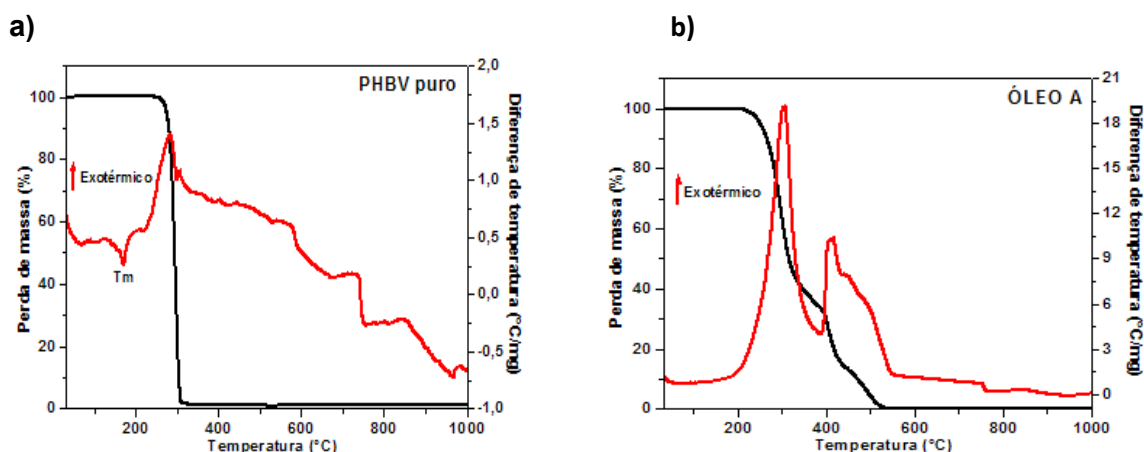
Amostra	T <sub>g</sub> (° C)	T <sub>m</sub> (° C)
PHBV	2,2	167
MP1 (Grupo controle)	1,3	165
MF2 (50%)	-1,8	164
MP2 (30%)	-1,2	164
MP3 (50%)	-1,8	164
MP4 (70%)	-2,0	161

#### 5.8.4. Análise termogravimétrica (ATG) e térmica diferencial (ATD)

As curvas obtidas da análise termogravimétrica e de térmica diferencial (Figuras 30a,30b,30c,30d,30e) foram avaliadas para a confirmação dos dados que foram obtidos por calorimetria exploratória diferencial (CED). As micropartículas poliméricas contendo o óleo vegetal, assim como a mistura física entre PHBV e o óleo de andiroba, apresentaram estabilidade térmica em uma temperatura inferior (200°C) do que as micropartículas de PHBV sem o óleo e somente o PHBV puro (300°C). As

micropartículas carregadas com o óleo e a mistura física entre polímero e óleo perderam massa em duas etapas distintas (  $320^{\circ}\text{C} - 79,07\%$  e  $523^{\circ}\text{C} - 19,31\%$  ), que está associada com eventos exotérmicos entre  $290^{\circ}\text{C}$  e  $560^{\circ}\text{C}$ , mostrando que ocorre uma certa influência da presença do óleo na matriz do polímero, independente da forma como as misturas foram feitas (mistura física ou micropartícula). O óleo vegetal de *C. guianensis* perdeu massa em três etapas distintas (  $306^{\circ}\text{C} - 39,05\%$  ;  $394^{\circ}\text{C} - 29,71\%$  e  $429^{\circ}\text{C} - 15,48\%$  ). Essa perda de massa está associada também com eventos exotérmicos entre  $200^{\circ}\text{C}$  e  $548^{\circ}\text{C}$ . As curvas de análise térmica diferencial do PHBV puro e das micropartículas de PHBV sem o óleo (Figuras 30a e 30d) apresentaram um perfil idêntico, sugerindo que o processo de solubilização do PHBV e de preparação das micropartículas não interferiu na resistência térmica do polímero puro. Foi possível constatar o aparecimento de um evento endotérmico em aproximadamente  $170^{\circ}\text{C}$ , relacionado com o ponto de fusão do polímero, não ocorrendo perda de massa e um evento exotérmico em aproximadamente  $300^{\circ}\text{C}$ , relativo à decomposição térmica do mesmo, havendo assim perda de massa. Estes eventos sugerem que não ocorreram alterações significativas nas propriedades térmicas do polímero quando este foi submetido ao processo para obtenção das micropartículas.

Além disso, por meio da análise das micropartículas contendo óleo (Figura 30e) foi verificada uma mistura de picos exotérmicos característicos do PHBV puro e do óleo vegetal. Estas observações, juntamente com os dados de calorimetria exploratória diferencial anteriormente mostrados, reforçam a hipótese de que o óleo foi encapsulado.



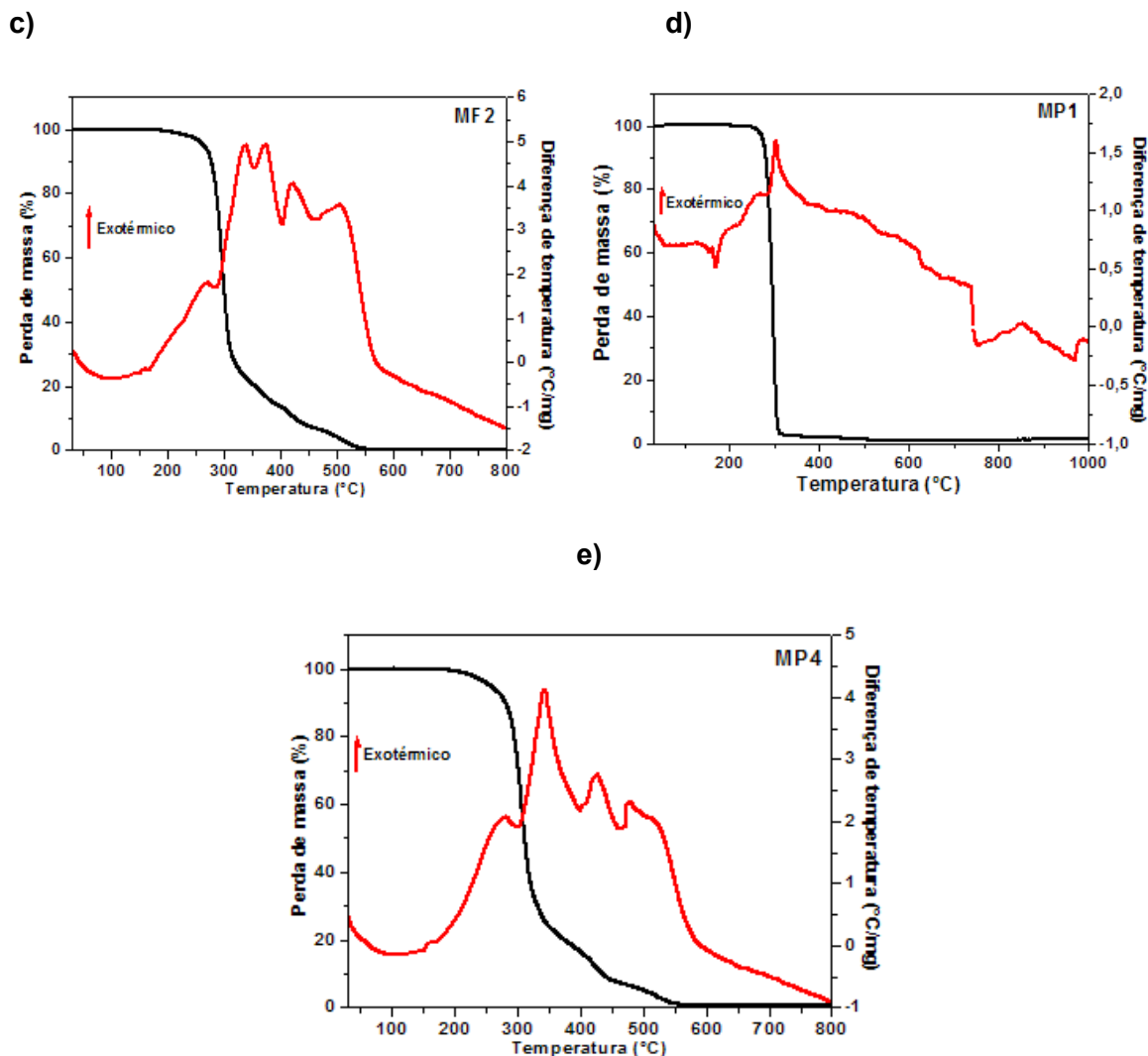


Figura 30: Termogramas obtidos por análise termogravimétrica e análise térmica diferencial: a) PHBV puro; b) óleo de andiroba puro; c) mistura física entre PHBV e óleo (MF2) (50%) d) micropartículas sem óleo (MP1) e e) micropartículas contendo o óleo (MP4) (70%).

### 5.8.5. Estudo morfológico e de superfície das micropartículas de PHBV e das misturas físicas PHBV/Óleo

As micropartículas poliméricas (Figuras 31a, 31b, 31c, 31d) revelaram morfologia esférica, com superfície rugosa e porosa.

Os poros evidenciados são atribuídos à rapidez com que ocorreu a evaporação do solvente orgânico, de acordo com a literatura (FARAGO *et al.*, 2008). Já a rugosidade, característica do polímero PHBV puro pode favorecer a degradação do mesmo pois ela proporciona um aumento na área superficial do polímero (MAIA, *et al.*, 2004). Este fato pode ser importante para uma etapa posterior, que consiste na degradação da matriz polimérica para a liberação do óleo.

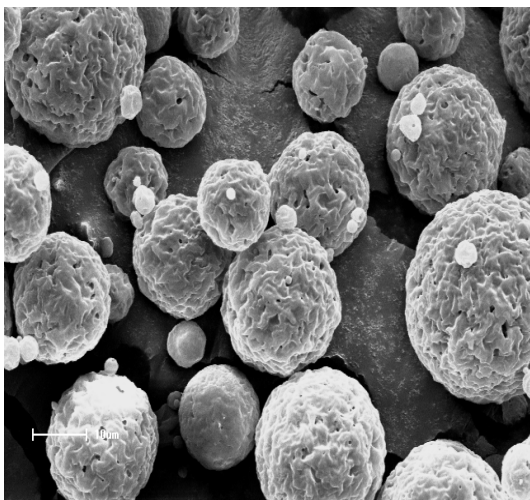
Pode ser verificado, pelas fotomicrografias (Figuras 31a, 31b, 31c, 31d), que ocorreu variações no tamanho das mesmas para todas as amostras formuladas. Estes resultados, juntamente com os anteriores, confirmam a formação das micropartículas poliméricas de PHBV e indicam a encapsulação do óleo de andiroba.

Pelas fotomicrografias das misturas físicas (filmes) (Figuras 32a, 32b, 32c, 32d) obtidas tanto para o filme de PHBV puro (MF) e os filmes contendo em suas composições óleo de andiroba, designados como MF1 (30%), MF2 (50%) e MF3 (70%), foi possível observar o mesmo comportamento de superfície comparando-se com as micropartículas poliméricas sem o óleo (MP1) e demais micropartículas contendo óleo, ou seja, MP2 (30%), MP3 (50%) e MP4 (70%). As misturas físicas apresentaram superfícies rugosas e porosas (Figuras 32a, 32b, 32c, 32d). O filme de PHBV puro (Figura 29a) apresentou uma superfície bastante rugosa, característica intrínseca ao mesmo, enquanto que os demais filmes mostraram-se rugosos e bastantes porosos (Figuras 32b, 32c, 32d), os quais foram atribuídos, assim como nas micropartículas, à velocidade de evaporação do solvente orgânico presente no processo.

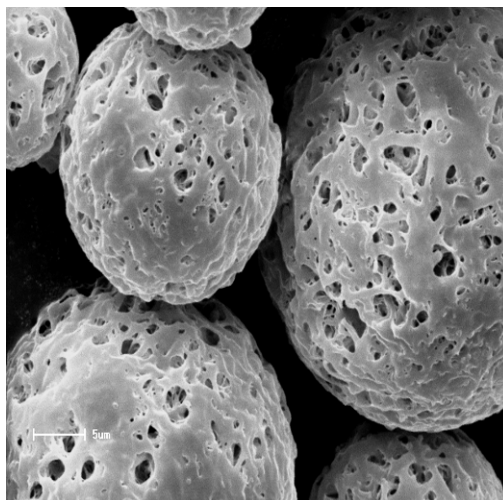
Por outro lado, comparando-se as misturas físicas contendo óleo entre si, é possível verificar que, quanto maior a quantidade de óleo de andiroba no meio (Figura 32d), encontrada na amostra MF3 com 70% (m/m) de óleo com relação à massa de polímero, maior o número de poros na superfície do filme. Esta grande quantidade de poros não é evidenciada na mistura física MF1 (30%) (Figura 32b) com menor quantidade de óleo.

Estes resultados sugerem que a concentração de óleo de andiroba encontrada no meio, de certa forma, pode estar influenciando juntamente com a velocidade de evaporação do solvente orgânico, no desenvolvimento de poros nas superfícies dos sistemas. Além disso, nas cavidades evidenciadas como poros nas misturas físicas (Figuras 32b, 32c, 32d), é possível que estes sejam os locais de depósito do óleo nestes sistemas, incluindo as micropartículas poliméricas contendo o mesmo.

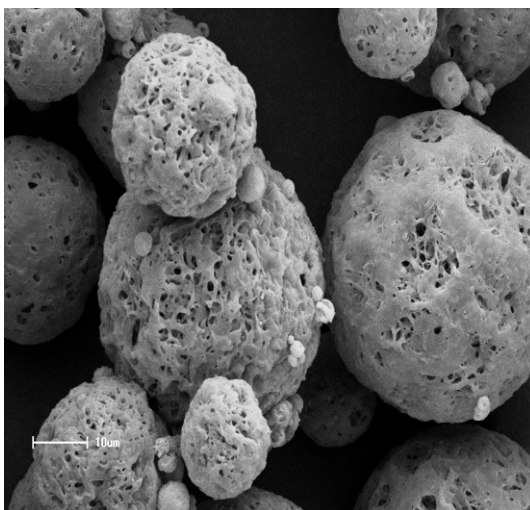
a)



b)



c)



d)

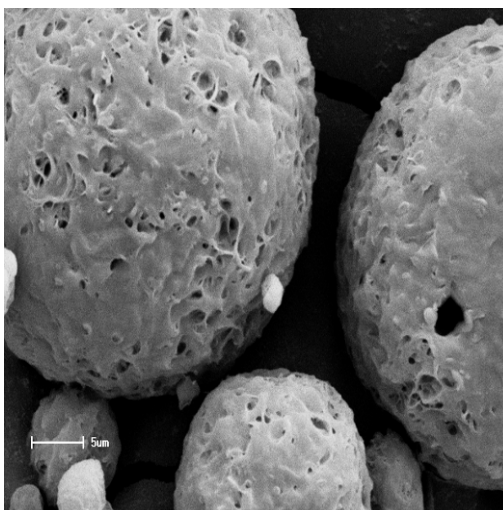
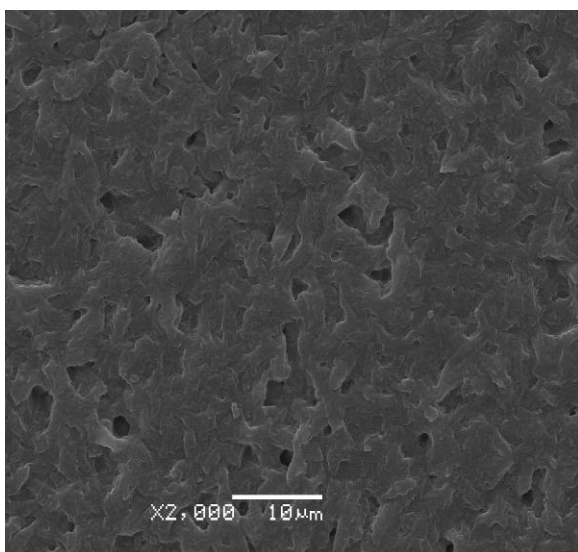
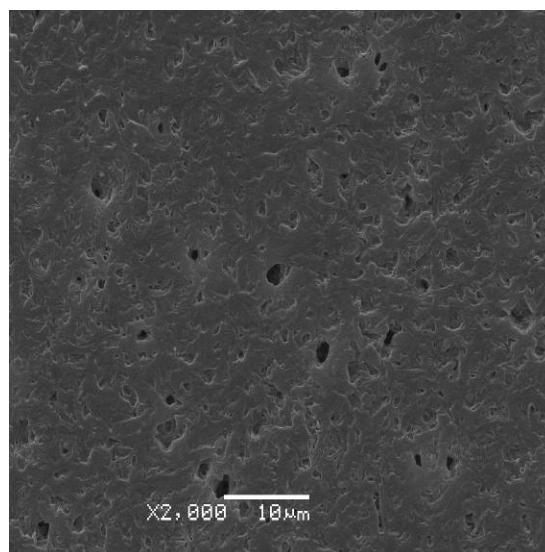


Figura 31: Fotomicrografias das micropartículas poliméricas: a) sem óleo (MP1) (aumento 1kx), b) contendo o óleo (MP2) (30%) (aumento 2kx), c) contendo o óleo (MP3) (50%) (aumento 1kx) e d) contendo o óleo (MP4) (70%) (aumento 2kx).

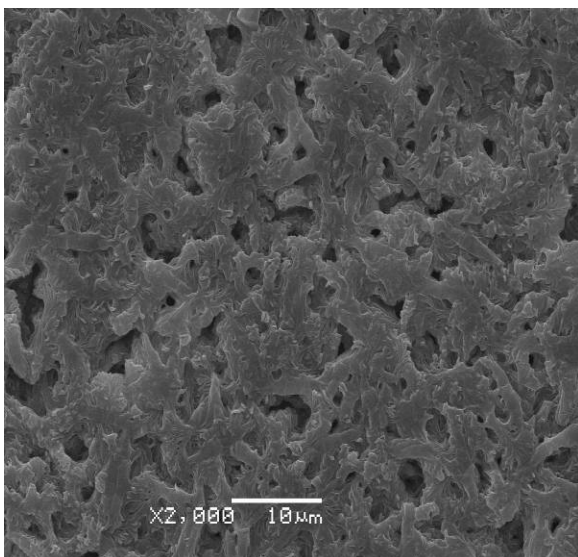
a)



b)



c)



d)

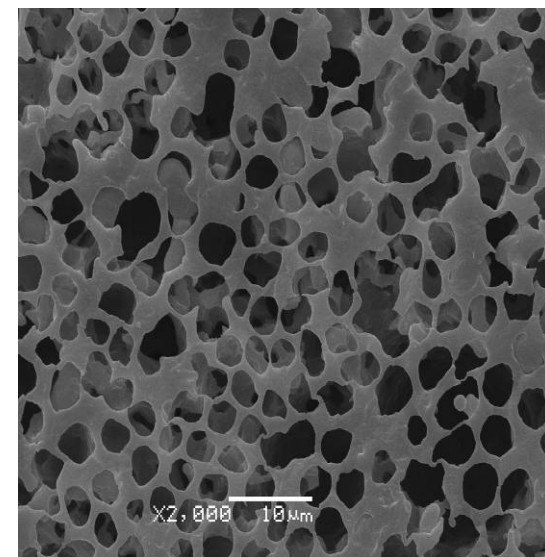


Figura 32: Fotomicrografias das misturas físicas: a) filme PHBV puro (MF) (aumento 2kx), b) contendo o óleo (MF1) (30%) (aumento 2kx), c) contendo o óleo (MF2) (50%) (aumento 2kx) e d) contendo o óleo (MF3) (70%) (aumento 2kx).

### 5.8.6. Análise granulométrica

Foi observado que a avaliação da distribuição granulométrica das formulações de micropartículas poliméricas de PHBV contendo óleo de andiroba, MP2, MP3 e MP4, revelou um aumento no diâmetro médio, em micrômetros, diretamente proporcional à quantidade de óleo adicionada. Esta mesma observação foi constatada por meio dos valores de diâmetros de partículas encontrados, correspondentes a 10, 50 e 90% da distribuição de tamanhos acumulada para cada amostra analisada (Tabela 14). Além disso, comparando o diâmetro médio da formulação MP1 (grupo controle), sem óleo de andiroba, com os demais sistemas contendo óleo, é possível sugerir que o mesmo foi encapsulado, já que os diâmetros foram aumentados (Tabela 14). Os valores de Span (Tabela 14), relacionados com a uniformidade de tamanho das micropartículas poliméricas, encontraram-se abaixo de 2, sendo portanto, os sistemas aqui considerados como monodispersos. Os sistemas que apresentam valor de Span acima de 2 são considerados polidispersos (DOMINGUES, *et al.*, 2008).

TABELA 14  
Dados sobre a dispersão granulométrica das micropartículas poliméricas de PHBV/ óleo de andiroba

<b>Formulações de micropartículas</b>	<b>d (v,10%) (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>d (v,50%) (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>d (v,90%) (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Diâmetro médio (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Span</b>
MP1	7,87	22,17	33,39	21,63	1,15
MP2	11,11	27,68	52,17	29,88	1,48
MP3	17,75	38,30	64,78	39,91	1,23
MP4	22,70	44,60	75,62	47,64	1,18

### 5.9. Controle de qualidade do óleo de andiroba encapsulado

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do óleo de andiroba puro foi realizada com sucesso. Foi realizada com a finalidade de manter um controle de qualidade dos produtos formados nos processos de microencapsulação e de formação de emulsões estáveis com o óleo, ou seja, controlar a qualidade das micropartículas poliméricas de PHBV e das emulsões estáveis.

Esta análise permitiu verificar a presença dos compostos com potencial aplicação como inseticidas, conhecidos como tetranortriterpenóides ou limonóides no óleo de andiroba utilizado neste estudo. Estes compostos, que segundo a literatura (BOUFLEUER, 2004), perfazem de 2 a 5% da composição total do óleo, precisam necessariamente estar presentes para as micropartículas poliméricas ou as emulsões contendo o óleo de andiroba se apresentarem como produtos tecnológicos eficazes no controle em que se deseja efetuar.

O método utilizado nesta análise foi baseado no usado por TAPPIN *et al.*, 2008 para determinação de tetranortriterpenóides presentes no extrato vegetal de *C. guianensis*. Por meio deste método foi possível observar em qual faixa de tempos de retenção ( $T_r$ ) saíam os compostos com propriedades inseticidas presentes no óleo de andiroba puro, tendo sido feita injeções prévias de padrões de limonóides.

Os dois padrões analisados foram o  $6\alpha$  – acetoxigedunina e o gedunina (Figura 33) para identificação dos tempos de retenção ( $T_r$ ) e, posteriormente, o óleo de andiroba foi analisado, nas mesmas condições estabelecidas para os padrões. Pelos cromatogramas obtidos para os padrões de limonóides e para o óleo puro (Figura 34) foi observado que ambos os padrões apresentaram tempos de retenção próximos. O  $6\alpha$ -acetoxigedunina eluiu primeiro em aproximadamente  $T_r = 6,9$  minutos enquanto que o gedunina eluiu logo após em  $T_r = 7,2$  minutos, aproximadamente, o que está de acordo com o cromatograma obtido para os tetranortriterpenóides por TAPPIN *et al.*, 2008 em seu estudo. A análise do óleo de andiroba puro na concentração estudada,  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ , não apresentou picos característicos desses compostos inseticidas nesta região de tempos de retenção, sugerindo a ausência destas substâncias ou a sua ocorrência abaixo do limite de detecção do aparelho. Uma injeção de uma solução do óleo mais concentrada deve ser feita para verificar se a concentração dos limonóides no óleo usado neste estudo se encontra muito baixa, dificultando as suas detecções.

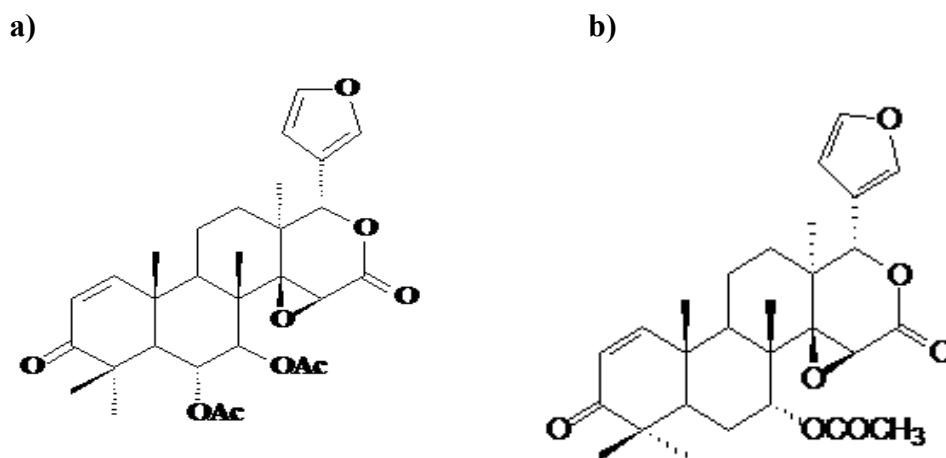


Figura 33: Fórmulas estruturais dos limonóides: a) 6 $\alpha$ -acetoxigedunina e b) gedunina.

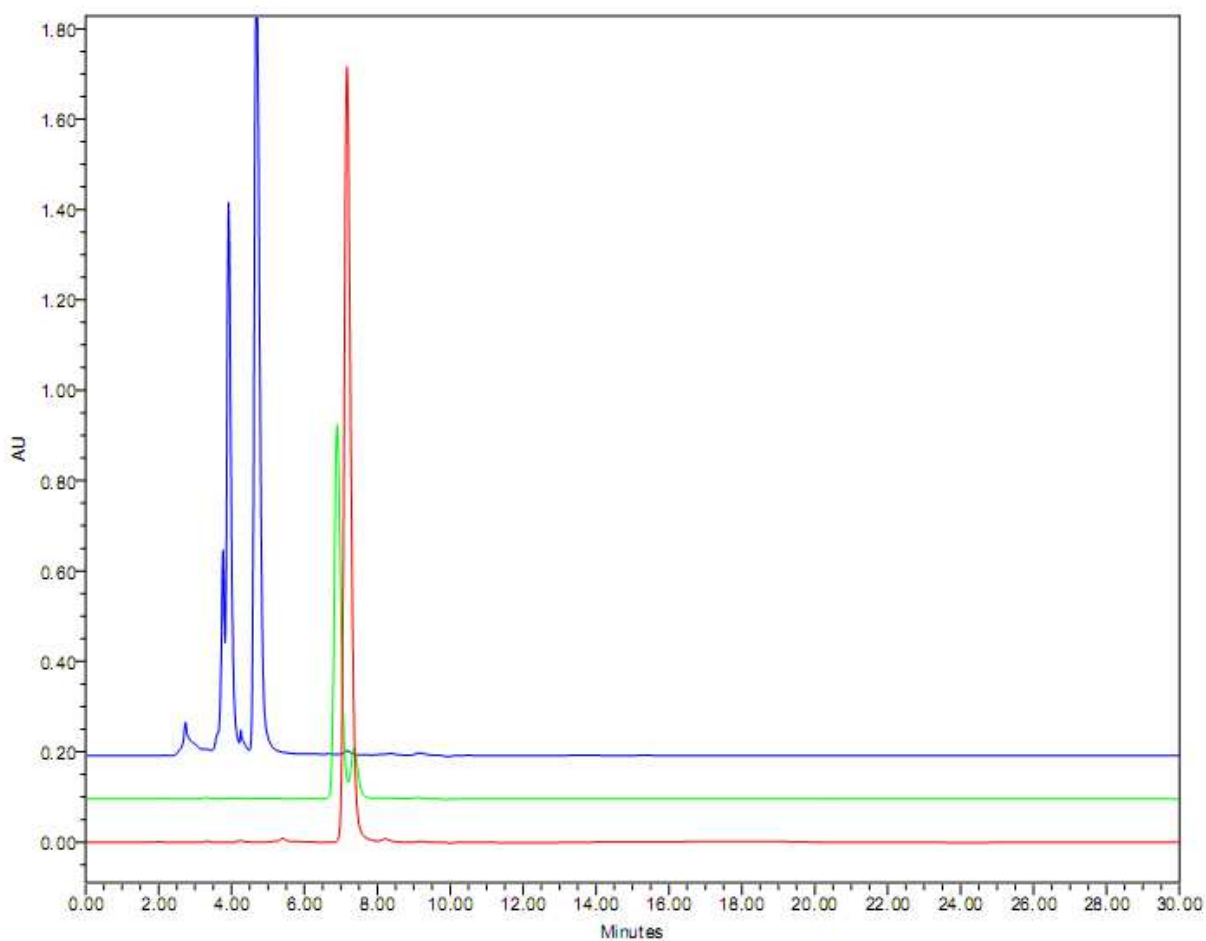


Figura 34: Cromatograma dos limonóides e do óleo de andiroba puro: pico verde) 6 $\alpha$ -acetoxigedunina; pico vermelho) gedunina e pico azul) óleo de andiroba puro.

## **5.10. Determinação da eficiência de encapsulação (%) do óleo de andiroba: método direto e indireto**

### **5.10.1. Método direto**

Para a determinação da eficiência de encapsulação, pelo método direto, das três formulações de micropartículas contendo óleo, designadas como MP2 (30%), MP3 (50%) e MP4 (70%), uma curva analítica do óleo de andiroba puro em hexano destilado em concentrações na faixa de 1,0 a 8,0 mg.mL<sup>-1</sup> foi construída para a posterior análise das soluções do óleo extraídas com hexano destilado de cada formulação. A curva analítica foi obtida, por meio da leitura espectrofotométrica na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), na faixa entre 600 e 190 nm, de seis soluções de óleo de andiroba em concentrações diferentes e crescentes, como citado anteriormente. Os espectros de absorção das soluções de óleo de andiroba de concentrações conhecidas mostraram um pico de absorção máxima em 245 nm, aproximadamente, com um ombro em 266 nm (Figura 35). A curva analítica apresentou uma regressão linear significativa (Figura 36), com um coeficiente de correlação linear da ordem de 0,99308.

Os espectros de absorção das soluções de óleo extraído do interior das micropartículas, com hexano destilado (Figura 37), de cada amostra de micropartículas poliméricas, mostraram um pico máximo de absorção em 245 nm, com um ombro em 266 nm, idêntico aos obtidos para as soluções padrão do óleo de andiroba (Figura 35).

Apesar de todas estas avaliações, realizadas em duplicata, não foi possível determinar as eficiências de encapsulação por esta metodologia pois a quantidade de óleo encontrada experimentalmente, presente em 100 mg de micropartículas poliméricas, foi acima do valor determinado teoricamente (Tabela 15), sugerindo uma encapsulação de mais de 100%. Isto só é possível pois as micropartículas poliméricas apresentam diâmetros variados, podendo uma micropartícula conter mais óleo que a outra. Este tipo de determinação de eficiência de encapsulação irá depender muito da amostragem.

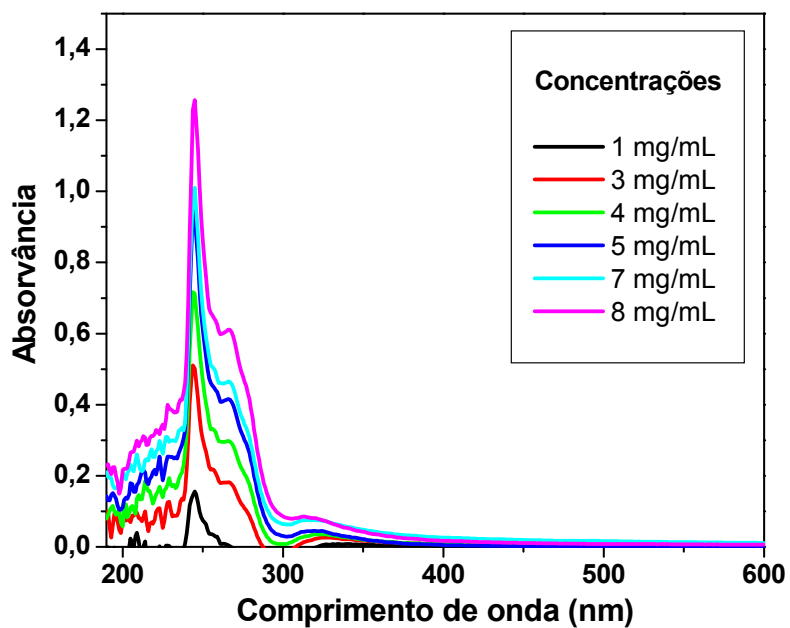


Figura 35: Espectros de absorção das soluções de óleo de andiroba de concentrações conhecidas.

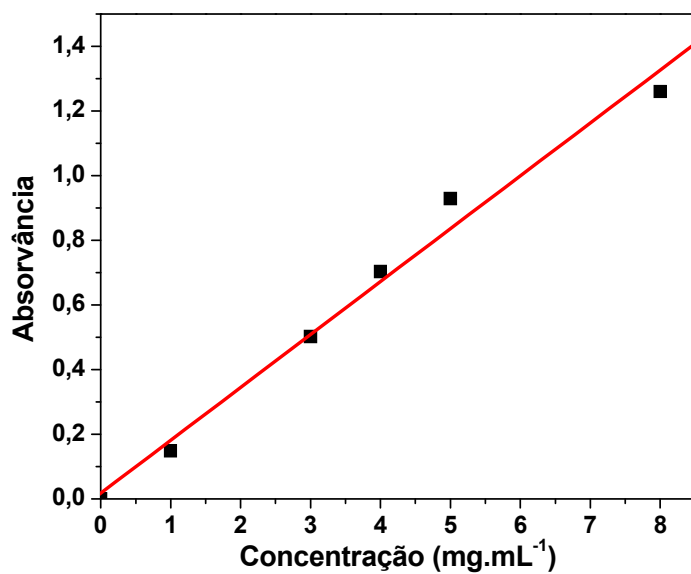
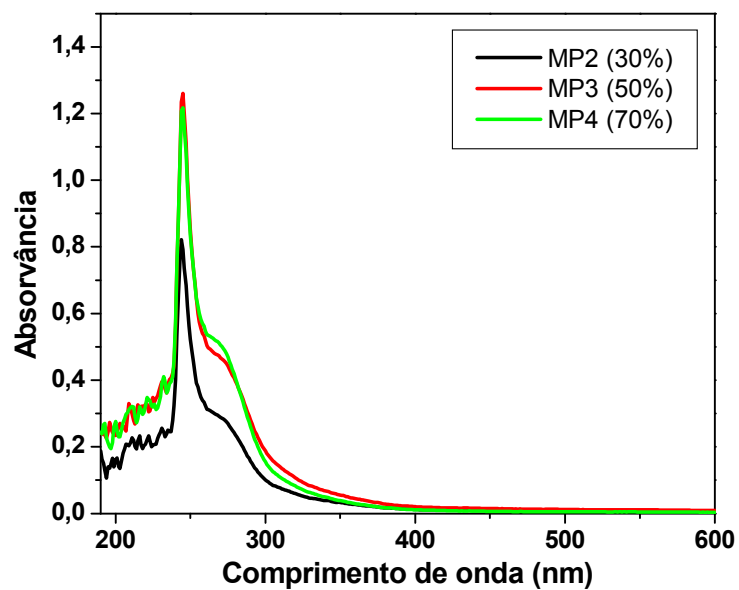


Figura 36: Curva analítica do óleo de andiroba em hexano.

## a) 1ª Tentativa



## a) 2ª Tentativa

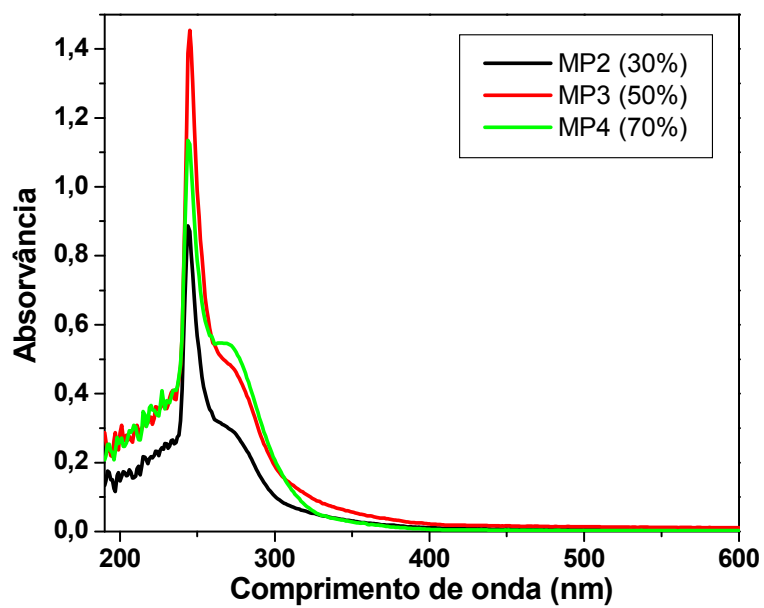


Figura 37: Espectros de absorção das soluções de óleo extraído do interior das micropartículas com hexano: a) 1ª tentativa e b) 2ª tentativa.

TABELA 15  
Quantidade de óleo de andiroba encontrado nas micropartículas: valores teórico e experimental

Amostras	Óleo contido nas micropartículas	Óleo contido nas micropartículas
	(mg de óleo/ 100 mg micro) <u>TEÓRICO</u>	(mg de óleo/ 100 mg micro) <u>EXPERIMENTAL</u> <sup>a</sup>
MP2	23	48
MP3	33	72
MP4	41	75

<sup>a</sup>média (n=2)

### 5.10.2. Método indireto

Para a determinação da eficiência na encapsulação do óleo de andiroba nas três formulações de micropartículas preparadas, foi construída uma outra curva analítica do óleo em solução aquosa de poli(álcool vinílico) (PVAI) a 2% (m/V) para posterior análise dos sobrenadantes armazenados de cada formulação, designadas como MP2 (30%), MP3 (50%) e MP4 (70%). A curva analítica foi obtida, por meio da leitura espectrofotométrica na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), na faixa entre 600 e 190 nm, de cinco soluções de óleo de andiroba em concentrações diferentes e crescentes. As análises mostraram um pico de absorção máxima em 217 nm (Figura 38), o qual apresentou uma regressão linear significativa (Figura 39), com um coeficiente de correlação linear da ordem de 0,9977.

Os espectros de absorção dos sobrenadantes (Figura 40), provenientes de cada amostra de micropartículas poliméricas desenvolvida neste estudo, mostraram um pico máximo de absorção em aproximadamente 217 nm, idênticos aos obtidos para as soluções padrão do óleo de andiroba em solução aquosa de PVAI 2% (m/V) (Figura 38).

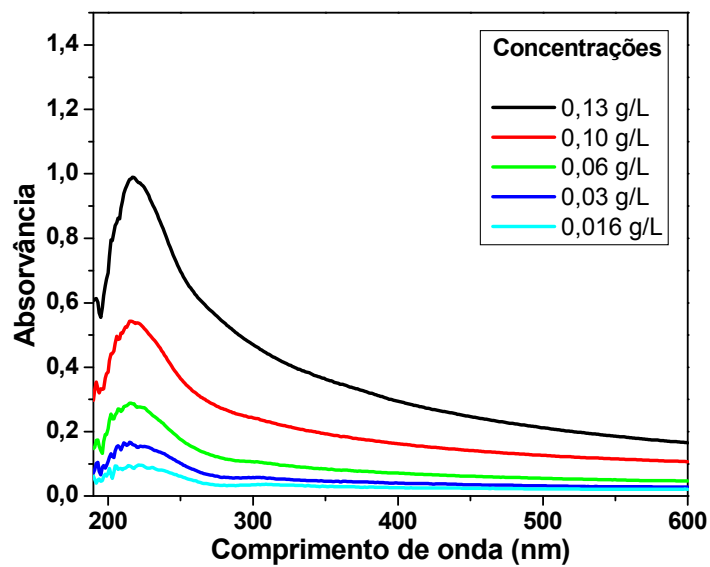


Figura 38: Espectros de absorção do óleo de andiroba, em solução aquosa de PVAI 2% (m/V), de concentrações conhecidas.

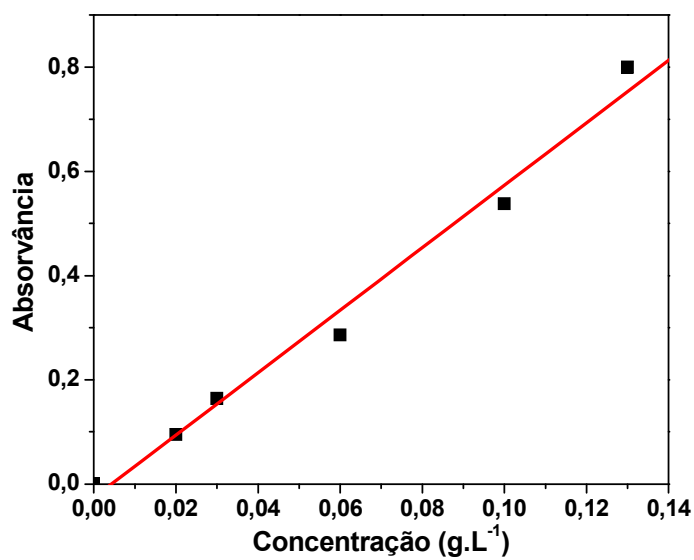


Figura 39: Curva analítica do óleo de andiroba em solução aquosa de PVAI a 2% (m/V).

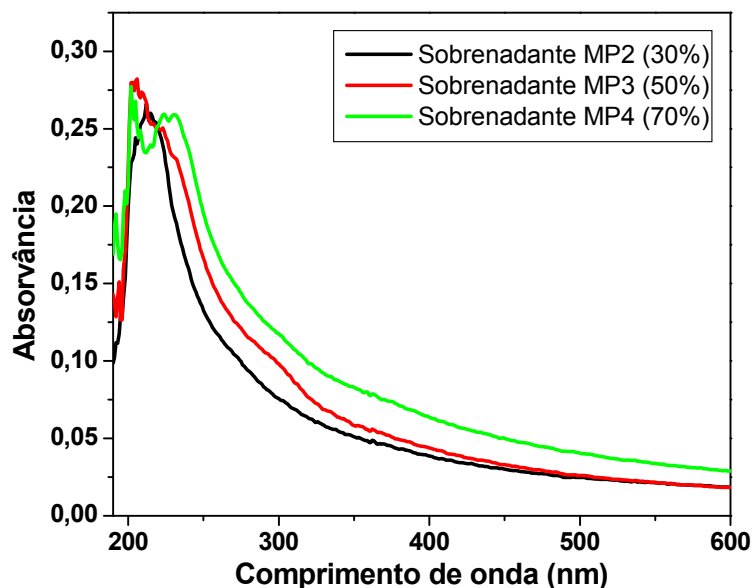


Figura 40: Espectros de absorção dos sobrenadantes provenientes das formulações de micropartículas.

A avaliação quantitativa por UV-Vis dos sobrenadantes, permitiu determinar a taxa de encapsulação do óleo de andiroba. Foi observado um aumento nos valores de encapsulação diretamente proporcional à quantidade de óleo adicionada nas formulações MP2 (30%), MP3 (50%) e MP4 (70%) (Tabela 16). Os desvios padrão não foram significativos. Esta taxa de encapsulação elevada é explicada pela eficiência no processo de formação de emulsão do tipo óleo em água (O/A) do método utilizado, além da baixa solubilidade do óleo em meio aquoso. O processo utilizado propicia o acondicionamento das gotículas de óleo no interior do polímero PHBV, o qual também possui baixa solubilidade em água. E este equilíbrio leva à precipitação do polímero na forma de micropartículas poliméricas, contendo o óleo de andiroba.

TABELA 16  
Eficiência de encapsulação do óleo de andiroba nas micropartículas poliméricas de PHBV pelo método indireto

Formulações de micropartículas	Óleo de andiroba (g)	Eficiência de encapsulação (%) <sup>a</sup>
MP1 (grupo controle)	0,00	-----
MP2	0,60	95,00 ± 0,43
MP3	1,00	96,82 ± 0,04
MP4	1,40	97,85 ± 0,31

<sup>a</sup>média (n=2) ± desvio padrão

### 5.11. Estudo de liberação *in vitro* do óleo de andiroba

Não foi possível por meio de ensaios de liberação *in vitro* do óleo de andiroba, determinar os perfis de liberação do óleo, nas condições adotadas neste estudo, para as amostras de micropartículas designadas como MP2 (30%), MP3 (50%) e MP4 (70%) pois não foi observado pico de absorção máximo do óleo (Figura 41), por meio de análise UV-Vis, referente à liberação de compostos que fazem parte da composição do óleo de andiroba, não sendo possível a quantificação.

Com a finalidade de aumentar a solubilidade do óleo de andiroba em meio aquoso foi adicionado, à solução tampão fosfato pH 5,6, o tensoativo Tween 80, na concentração de 0,3% (m/V). A escolha do pH 5,6 foi feita tendo como referência o pH da água das chuvas, já que as micropartículas poliméricas foram testadas frente à larvas do mosquito *A. aegypti* que possuem um desenvolvimento propício em locais de água parada e limpa, acumulados, principalmente, nos períodos de chuvas ocasionadas no verão.

As alíquotas (10 mL) retiradas para a determinação do teor de óleo de andiroba liberado a cada 24 horas durante 5 dias, por espectrofotometria na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), na faixa de 600 a 190 nm, não apresentaram picos de absorção máxima característicos na faixa de comprimento de onda estudada, para cada amostra analisada, que tornasse viável a construção de um perfil de liberação (Figura 41). Os espectros de absorção das alíquotas avaliadas, de cada amostra de micropartículas, apresentaram o mesmo perfil.

O período total de 5 dias de avaliação da liberação a cada 24 horas foi escolhido, levando-se em consideração o período de estágio de desenvolvimento larval do mosquito *A. aegypti*, que varia de 4 a 5 dias (FUNASA, 2001).

Diante destes resultados, é possível sugerir o desenvolvimento de estudos com mais cautela com a finalidade de determinar com precisão a concentração de polissorbato 80 a ser utilizada nos ensaios de liberação, como também, aumentar o período total de avaliação do processo de liberação.

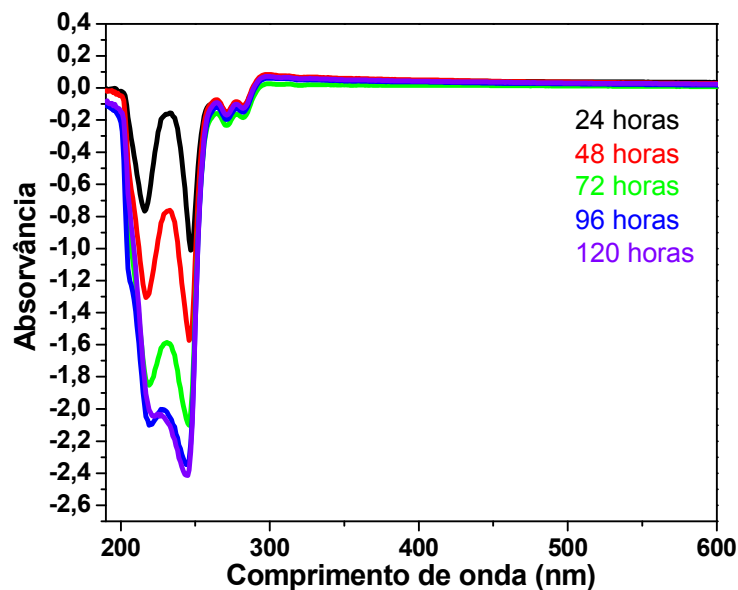


Figura 41: Espectros de absorção de aliquotas analisadas para determinação de perfis de liberação do óleo de andiroba.

## 5.12. Aplicação das micropartículas poliméricas de PHBV contendo o óleo de andiroba

Apesar da falta de sucesso na determinação dos perfis de liberação do óleo de andiroba, foi realizada a aplicação das micropartículas poliméricas de PHBV contendo o óleo, às larvas do mosquito *A. aegypti* e aos animais adultos da aranha-marrom, *L. intermedia*.

### 5.12.1. Avaliação da toxicidade do óleo de andiroba microencapsulado frente às larvas do mosquito *A. aegypti*

As micropartículas poliméricas contendo óleo de andiroba, designadas como MP2 (30%), MP3 (50%) e MP4 (70%), foram usadas em bioensaios larvicidas o qual foi repetido quatro vezes, utilizando 20 larvas do mosquito *Aedes aegypti* em cada ensaio. Foi observado que o sistema micropartículas contendo o óleo não apresentou toxicidade e muito menos mortalidade frente às larvas. Decorridas as 24 horas de aplicação do produto tecnológico formulado, nenhuma larva do mosquito foi encontrada morta. As larvas, portanto, não se mostraram suscetíveis ao óleo de andiroba encapsulado, nem para o tratamento controle (negativo) no período estudado.

### 5.12.2. Avaliação da toxicidade do óleo de andiroba microencapsulado frente a adultos da aranha-marrom *L. intermedia*

As micropartículas poliméricas carregadas com o óleo de andiroba, de todas as formulações preparadas neste estudo, não revelou toxicidade, mortalidade ou qualquer alteração comportamental visível nos adultos das populações de aranhas-marrom utilizados neste experimento, decorridas as 24 horas de aplicação das formulações MP2 (30%), MP3 (50%) e MP4 (70%).

Foi possível observar que o animal, durante a realização do bioensaio com as micropartículas poliméricas contendo o óleo, espalhou a formulação aplicada pela extensão de seu corpo, ao tentar se limpar (Figuras 42 e 43). Este resultado é de extrema importância para os estudos futuros que se deseja efetuar, utilizando-se de outros produtos naturais, que já se mostraram mais eficazes.

Estes resultados indicam que o óleo de andiroba não mostrou boa eficácia nestes ensaios, embora os dados de literatura relatem este efeito. É sabido que alguns limonóides apresentam efeito sobre algumas pragas, enquanto que outros não. Pode ser que os compostos inseticidas que compõem o óleo de andiroba não apresentem toxicidade para as pragas selecionadas neste estudo, sendo eficaz para muitas já relatadas na literatura.

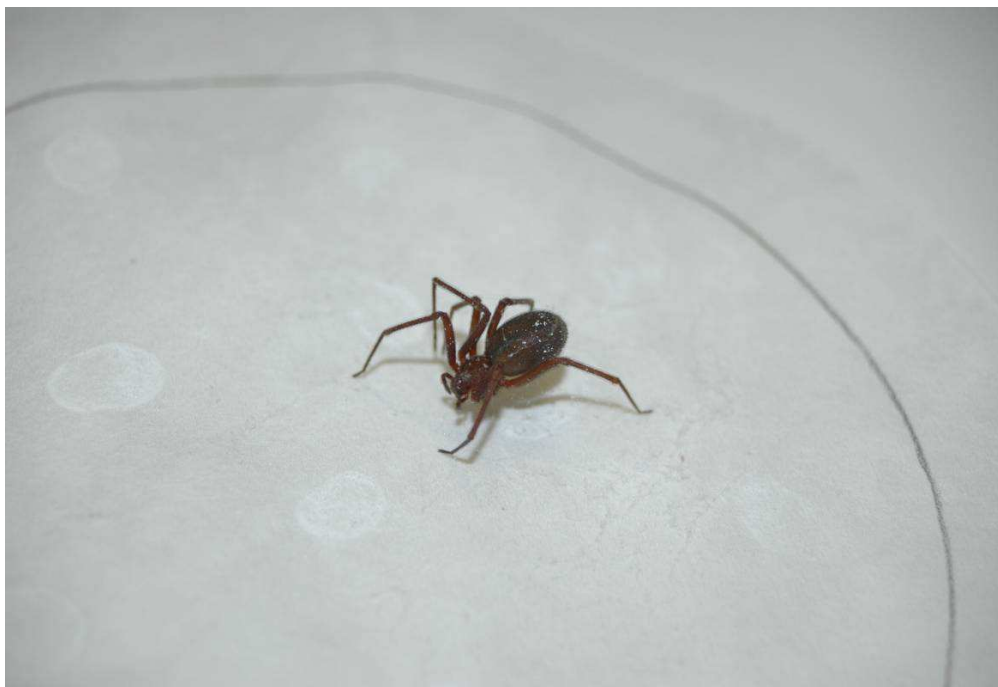


Figura 42: Aranha-marrom com micropartículas poliméricas contendo o óleo espalhadas pelo corpo, foto 1.



Figura 43: Aranha-marrom com micropartículas poliméricas contendo o óleo espalhadas pelo corpo, foto 2.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram desenvolvidas metodologias que permitiram produzir emulsões estáveis bem como encapsular o óleo de andiroba, de natureza hidrofóbica, no interior de um polímero biodegradável, também hidrofóbico. As emulsões do óleo de andiroba apresentaram um tempo de vida útil (*shelf-life*) de 3 meses, o que foi considerado bom. As emulsões mantiveram suas propriedades e morfologia estáveis durante o tempo em que foram avaliadas. A estabilidade, porém, não foi mantida, quando as emulsões foram expostas aos testes de estabilidade acelerados (ciclos de estresse) por períodos mais curtos.

As análises por espectroscopia na região do infravermelho das micropartículas poliméricas produzidas na presença do óleo vegetal de *Carapa guianensis* revelaram absorções características do material polimérico bem como do óleo vegetal, sugerindo a encapsulação. Os espectros tanto das micropartículas como das misturas físicas, indicaram que não ocorreram interações moleculares que afetassem a estrutura química do óleo de andiroba ou do polímero PHBV. Também não foram observadas bandas referentes à reações paralelas.

Os estudos de difração de raios-X sugeriram que a presença do óleo alterou a intensidade dos picos de cristalinidade do polímero empregado na confecção das micropartículas e das misturas físicas, sendo este fato indicativo de que o óleo está disperso na matriz, na forma de microesferas. O alargamento de um dos picos, nos

difratogramas, sugere que a estrutura amorfa do óleo de andiroba interagei com as porções amorfas do polímero PHBV.

A análise térmica mostrou alterações nas temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ) e nas temperaturas de fusão cristalina ( $T_m$ ), o que sugere uma possível interação física favorável entre o óleo e a matriz polimérica, tanto nas micropartículas como nas misturas físicas.

A visualização direta das micropartículas permitiu revelar que estas se apresentaram esféricas, porosas e rugosas, características requeridas para o êxito nos estudos posteriores de liberação *in vitro* do óleo de andiroba. As misturas físicas apresentaram mesmas características morfológicas das micropartículas.

Os dados obtidos com relação aos tamanhos de partículas (análise granulométrica) como seus respectivos valores de Span (variação granulométrica de tamanho) estão de acordo com os valores determinados de eficiência de encapsulação pelo método indireto como para os não determinados pelo método direto. Não é possível se ter controle da amostragem de micropartículas poliméricas utilizada na determinação da eficiência de encapsulação por meio do método direto, que dosa o teor de ativo no interior do produto tecnológico desenvolvido.

Os ensaios de liberação não foram satisfatórios, já que a liberação de material lipofílico em meio aquoso tornou-se dificultada pela incompatibilidade química dos sistemas. A concentração de tensoativo utilizado para solubilizar a matriz hidrofóbica em água e o período avaliado devem ser reconsiderados.

Por meio de testes preliminares que avaliaram a toxicidade das emulsões do óleo de andiroba frente às pragas agrícolas, foi possível perceber que as mesmas apresentaram resultado mais promissor para o ácaro rajado (*Tetranychus urticae*), tendo em vista que a emulsão a 5% m/m exterminou a mesma quantidade de insetos que o inseticida comercial.

As micropartículas poliméricas contendo o óleo de andiroba, produto tecnológico desenvolvido neste estudo, não se apresentaram eficazes para o controle da aranha-marrom *L. intermedia* bem como não apresentaram toxicidade frente às larvas do mosquito *A. aegypti*.

As metodologias desenvolvidas neste trabalho envolvendo a preparação de emulsões estáveis de materiais de natureza hidrofóbica, bem como a microencapsulação dos mesmos abrem boas perspectivas para a aplicação de materiais de origem vegetal, previamente testados em laboratório e com uma possível eficácia para o controle de pragas agrícolas,

florestais e urbanas. Os procedimentos adotados mostram-se compatíveis com a crescente preocupação de preservação do meio ambiente.

## 7. CONCLUSÃO

Emulsões estáveis e micropartículas poliméricas contendo óleo de andiroba foram preparadas com sucesso pelos métodos adotados neste estudo.

O método de emulsão simples seguida da evaporação do solvente orgânico se mostrou eficiente para encapsular extrato vegetal de *C. guianensis*, de acordo com as condições adotadas.

As micropartículas apresentaram uniformidade de tamanho e forma assim como os glóbulos de óleo vistos por microscopia ótica, nas emulsões preparadas.

As técnicas de caracterização utilizadas mostraram que o óleo de andiroba está disperso na matriz polimérica, na forma de microesferas.

As emulsões só perderam estabilidade quando submetidas a ciclos de estresse pré-estabelecidos.

A liberação do óleo *in vitro* não foi observada e as aplicações de todas as formulações contendo óleo desenvolvidas, não se mostraram satisfatórias.

## 8. PERSPECTIVAS

Outros óleos de origem vegetal têm se mostrado eficientes para o controle de importantes pragas agrícolas e florestais em testes preliminares realizados em nosso laboratório e serão emulsionados utilizando a metodologia desenvolvida nessa dissertação para potencializar a utilização dos mesmos.

A tecnologia de encapsulação desenvolvida nessa dissertação será explorada no controle de importantes pragas urbanas, principalmente da aranha-marrom *L. intermedia* e do caramujo africano *A. fulica*.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): Formulation and process optimization. *Int. J. Pharm.*, p. 178 – 188, **2006**.

ABURTO, L. C.; TAVARES, D. Q.; MARTUCCI, E. T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, vol. 18, n. 1, **1998**.

AHN, J. H.; KIM, Y. P.; LEE, Y. M.; SEO, E. M.; LEE, K. W.; KIM, H. S. Optimization of microencapsulation of seed oil by response surface methodology. *Food Chem.*, vol. 107, p. 98 – 105, **2008**.

ALBUQUERQUE, M. J.; PIRES DE CAMPOS, V. F.; RIBEIRO, L. A.; TAKAOKA, N. Y. 1990. Epidemiological and clinical aspects of accidents due to spiders in São Paulo State, Brazil, in 1988. *Toxicon*, 28, 599, **1990**.

ALLÉMANN, E.; LEROUX, J. C.; GURNY, R. Polymeric nano- and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, vol. 34, p. 171 –189, **1998**.

AMBROZIN, A.R.P.; Química e atividade inseticida do óleo de *Carapa guianensis* e das folhas de *Canavalia ensiformis*; São Carlos, UFSCar, **2000**. Dissertação Mestrado.

AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION. Handbook of pharmaceutical excipients. 5 ed. London: Pharmaceutical Press; **2006**. 918p.

ARAÚJO, M. E. M. DQB ([www.dqb.fc.ul.pt](http://www.dqb.fc.ul.pt)), Química dos produtos naturais, 2008 e 2009. Acessado em 25 de outubro de **2009**.

ARAÚJO, F. A. A.; RESENDE, C. C. Araneísmo: análise epidemiológica. Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde, Coordenação de controle de Zoonoses e Animais peçonhentos. **1991**.

BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; QUEIROGA, M. F. C.; JR. CASTRO, F. P. Resistência de Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao Organofosforado Temefós na Paraíba. *Neotropical Entomology*, vol. 36, n. 2, p. 303 – 307, **2007**.

BOUFLEUER, N. T. ASPECTOS ECOLÓGICOS DE ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aublet., MELIACEAE), COMO SUBSÍDIO AO MANEJO E CONSERVAÇÃO; Rio Branco, UFAC, **2004**. Dissertação Mestrado.

BRAY, D. H.; WARHURST, D. C.; CONNOLLY, J. D.; O'NEILL, M. J. & PHILLIPSON, J. D. Plants as sources of antimalarial drugs. Part 7. Activity of some species of Meliaceae plants and their constituent limonoids. *Phytoter. Res.*, 4: 29, **1990**.

BUENO, C. A.; BARQUERO, A. A.; CÓN SOLI, H. D.; MAIER, M. S.; ALCHE, L. E. A natural tetranortriterpenoid with immunomodulating properties as a potential anti-HSV agent. *Virus Res.*, vol. 141, p. 47-54, **2009**.

CANEVAROLO JR., S.V. Técnicas de Caracterização de Polímeros. São Paulo: Artliber Editora, **2004**.

CARDOSO, J. L. C. Ofidismo - Aracneísmo - Escorpionismo. Epidemiologia, Patogenia e Clínica. Em: Soerensen, B. (editor). Animais Peçonhentos. Atheneu, São Paulo. **1990**.

CHAMPAGNE, D. E.; KOUL, O.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. E. & TOWERS, G. H. N. Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochem.*, 31: 377, **1992**.

CLARO, L. B. L.; TOMASSINI, H. C. B.; ROSA, M. L. G. Prevenção e controle do dengue: uma revisão de estudos sobre conhecimentos, crenças e práticas da população. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, vol. 20, n. 6, p. 1447-1457, **2004**.

CONSOLI, R. A. G. B; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, **1994**.

COSTA-SILVA, J. H.; LYRA, M. M. A.; LIMA, C. R.; ARRUDA, V. M.; ARAUJO, A. V.; RIBEIRO, A.; ARRUDA, A.C.; FRAGA, M. C.C.A.; LAFAYETTE, S. S. L.; WANDERLEY, A. G. A toxicological evaluation of the effect of *Carapa guianensis* Aublet on pregnancy in Wistar rats. *J. Ethnopharmacol.*, vol. 112, p. 122-126, **2007**.

COSTA-SILVA, J. H.; LYRA, M. M. A.; LIMA, C. R.; ARRUDA, V. M.; ARAUJO, A. V.; RIBEIRO, A.; ARRUDA, A.C.; FRAGA, M. C.C.A.; LAFAYETTE, S. S. L.; WANDERLEY, A. G. A toxicological evaluation of the effect of *Carapa guianensis* Aublet on pregnancy in Wistar rats. *J. Ethnopharmacol.*, vol. 116, p. 495-500, **2008**.

DAMIN, VIRGÍNIA , “ Biodegradação , Sorção e Dessorção do Herbicida  $^{14}\text{C}$  – Diuron m Dois Latossolos Tratados com Lodo de Esgoto”. Piracicaba, USP, **2005**. Dissertação Mestrado.

DELAY, C. E. Estudo da Comunicação Química, Acústica-Vibracional e da Eficiência de Pesticidas e de Repelentes Visando o Controle Populacional da Aranha-Marrom *Loxosceles intermedia*. Curitiba, UFPR, **2007**. Tese Doutorado.

DOMINGUES, G. S.; GUTERRES, S. T.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. *Quím. Nova*, vol. 31, nº 8, **2008**.

DORES , C. DE G. F. ELIANA E FREIRE L. DE ERMELINDA MARIA. Contaminação do Ambiente Aquático por Pesticidas. Estudo de Caso: Águas Usadas para Consumo Humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise Preliminar . *Quim. Nova* ,Vol. 24 ,p. 27-36, **2001**.

EICKSTEDT, V. R. Aranhas de importância médica no Brasil. Em: Venenos animais. 1º ed. (Ed: Barravera, B.) Epuc, São Paulo:151-172. **1994**.

FARAGO, P. V.; RAFFIN, R. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; ZAWADZKI, S. F. Physicochemical Characterization of a Hydrophilic Model Drug-Loaded PHBV Microparticles Obtained by the Double Emulsion/Solvent Evaporation Technique. *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 19, n. 7, p. 1298-1305, **2008**.

FARIA, N. M. X.; FACCHINI, L. A.; FASSA, A. G.; TOMASI, E. Trabalho rural e intoxicações por agrotóxicos. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, vol. 20, n. 5, p. 1298-1308, **2004**.

FARIAS, M. P. O.; SOUSA, D. P.; ARRUDA, A. C.; ARRUDA, M. S. P.; WANDERLEY, A. G.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Eficácia in vitro do óleo da Carapa guianensis Aubl. (andiroba) no controle de Boophilus microplus (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Plan. Med.*, vol. 9, nº 4, p.68-71, **2007**.

FERRARI, M.; OLIVEIRA, M. S. C.; NAKANO, A. K.; FILHO, P. A. R. Determinação do fator de proteção solar (FPS) in vitro e in vivo de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). *Braz. J. Pharmacognosy*, vol. 17, nº 4, **2007**.

FERREIRA, J.T.B.; CORREA, A.G.; VIEIRA, P.C; Produtos Naturais no Controle de Insetos, Edufscar, p.30, **2001**.

FILIZOLA, H. F.; FERRACINI, V. L.; SANS, L. M. A.; GOMES, M. A. F.; FERREIRA, C. J. A. Monitoramento e avaliação do risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guaíra. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, vol. 37, n. 5, p. 659 – 667, **2002**.

FISCHER, M. L. Levantamento de espécies de *Loxosceles* Heinecken & Lowe 1832 no município de Curitiba, Paraná, Brasil. *Estudos de Biologia*, vol. 63, n. 3, **1994**.

FORATTINI, O.P. Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia v.2. EDUSP, São Paulo, **2002**.

FREIRE, D. C. B., BRITO-FILHA, C. R. C., CARVALHO-ZILSE, G. A. Efeito dos óleos vegetais de andiroba (*Carapa sp.*) e Copaíba (*Copaifera sp.*) sobre forídeo, pragas de colméias, (Diptera:Phoridae) na Amazônia Central. *Acta Amazon.*, vol. 36, nº 3, p. 365-368, **2006**.

FUNASA. Dengue. Instruções para pessoal de combate ao vetor, Manual de Normas Técnicas. Brasília, abril de **2001**.

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. *Quím. Nova*, vol. 29, n. 1, p. 105-112, **2006**.

GENNARO, A. R. Remington: A Ciência e a Prática da Farmácia. 20 ed., p. 759-763, **2004**.

GERTSCH, W. J. The spider genus *Loxosceles* in North America, Central America, and West Indies. *American Museum Novitates*, 1, 1907, **1958**.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.*, vol. 40, p. 1107- 1121, **2007**.

GIUNCHEDI, P.; CONTE, U. Spray-drying as a preparation method of microparticulate drug delivery systems: overview. *STP Pharm.a Sci.*, vol. 5, p. 276-290, **1995**.

GLUBER, D. J. Epidemic dengue/ dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21<sup>st</sup> century. *Trends Microbiol.* 10, 100, **2002**.

GRÜTZMACHER, D. D.; GRÜTZMACHER, A. D.; AGOSTINETTO, D.; LOECK, A. E.; ROMAM, R.; PEIXOTO, S. C.; ZANELLA, R. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. *R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental*, vol. 12, n.6, p.632–637, **2008**.

GÜRSEL, I.; KORKUSUZ, F.; TÜRESIN, F.; ALAEDDINOGLU, N. G.; HASIRCI, V. In vivo application of biodegradable controlled antibiotic release systems for the treatment of implant-related osteomyelitis. *Biomaterials*, vol. 22, p. 73 – 80, **2001**.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. *Int. J. Pharm.*, vol. 113, n. 1, p. 57-63, **1995**.

HEINZELMANN, K.; FRANKE, K. Using freezing and drying techniques of emulsions for the microencapsulation of fish oil to improve oxidation stability. *Colloid Surface B*, vol. 12, p. 223–229, **1999**.

HOROWITZ, D. M.; SANDERS, J. K. M. Amorphous, Biomimetic Granules of Polyhydroxybutyrate: Preparation, Characterization, and Biological Implications. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 116, n. 7, **1994**.

HUANG, W.; WANG, Y.; REN, L.; DU, C.; SHI, X. A novel PHBV/HA microsphere releasing system loaded with alendronate. *Mater. Sci. Eng. C*, **2009**.

KAUR, K., JAIN, M., KAUR, T., JAIN, R. Antimalarials from nature. *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 17, p. 3229-3256, **2009**.

KE, Y.; WANG, Y. J.; REN, L.; ZHAO, Q. C.; HUANG, W. Modified PHBV scaffolds by in situ UV polymerization: Structural characteristic, mechanical properties and bone mesenchymal stem cell compatibility. *Acta Biomaterialia*, **2009**.

KLIMAS, C. A.; KAINER, K. A.; WADT, L. H.O. Population structure of *Carapa guianensis* in two forest types in the southwestern Brazilian Amazon. *Forest. Eco.l Manag.*, p. 256- 265, **2007**.

KÖSE, G. T.; KORKUSUZ, F.; ÖZKUL, A.; SOYSAL, Y.; ÖZDEMİR, T.; YILDIZ, C.; HASIRCI, V. Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. *Biomaterials*, vol. 26, p. 5187–5197, **2005**.

LEE, S. M.; KLOCKE, J. A.; BARNABI, M. A.; YAMASAKY, R. B. & BALANDRIN, M. F. “Insecticidal constituents of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* (Meliaceae)”. IN: *Naturally Occurring Pest Bioregulators, ACS Symposium Series 449*. HEDIN, P. H. (Eds.). Washington, ACS, p. 293, **1991**.

LEITE, A. M. C. Ecologia de *Carapa guianensis* Aublet. (MELIACEAE) “ANDIROBA”. Belém, UFPA, **1997**. Tese de Doutorado em Biologia Ambiental.

LEMES, A. P. Desenvolvimento de novos compósitos biodegradáveis baseados em Poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) e lignosulfonatos. Campinas, UNICAMP, **2005**. Dissertação Mestrado.

LEVI, H. W.; SPIELMAN, A. . The biology and control of the south american brown spider, *Loxosceles laeta*, in a North American focus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 13,132, **1968**.

LIU, Q. S.; ZHU, M .F.; WU, W. H.; QIN, Z. Y. Reducing the formation of six-membered ring ester during thermal degradation of biodegradable PHBV to enhance its thermal stability. *Polym. Degrad. Stabil.*, vol. 94, p. 18–24, **2009**.

LUCCHESI, C. Cultura de células vero sobre membranas de Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) tratadas por plasma gasoso. Campinas, UNICAMP, **2006**. Dissertação Mestrado.

MAIA, J.L.; SANTANA, M.H.A. & RÉ, M.I. The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. *Braz. J. Chem. Engineering* v.21, n.1, p.1-12, **2004**.

MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M. P. D.; EVANGELISTA, R. C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Braz. J. Pharm. Sci.*, vol. 42, n. 4, **2006**.

MAJI, T. K.; BARUAH, I.; DUBE, S.; HUSSAIN, M. R. Microencapsulation of *Zanthoxylum limonella* oil (ZLO) in glutaraldehyde crosslinked gelatin for mosquito repellent application. *Bioresource Technol.*, vol.98, p. 840 – 844, **2007**.

MANDAL, T. K.; BOSTANIAN, L. A.; GRAVES, R. A.; CHAPMAN, S. R.; IDODO, T. U. Porous biodegradable microparticles for delivery of pentamidine. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 52, p. 91-96, **2001**.

MANFREDINI, L.; MALUF, E. M. C. P.; CARVALHO, D. S.; OKABE, I.; MANGILI, O. . *Loxosceles*: “a aranha marrom”. *Cadernos de Saúde*, 1,1, **1993**.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. Introdução a Polímeros. 2 ed. Brasil: Editora Edgard Blucher, p. 1-20, **2004**.

MENDONÇA, F. A. C., SILVA, K.F.S., SANTOS, K.K., JUNIOR, K. L. R., SANT’ANA, A.E.G. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*, vol. 76, p.629 -636, **2005**.

MIOT, H. A.; BATISTELLA, R. F.; BATISTA, K. A.; VOLPATO, D. E. C.; AUGUSTO, L. S. T.; MADEIRA, N. G.; HADDAD, V.; MIOT, L. D. B. Comparative study of the topical effectiveness of the andiroba oil (*Carapa guianensis*) and deet 50% as repellent for *Aedes sp.* *Rev. Inst. Med. Trop.*, vol. 46, nº 5, p. 253-256, **2004**.

MISRA, S. K.; VALAPPIL, S. P.; ROY, I.; BOCCACCINI, A. R. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules*, vol. 7, n. 8, **2006**.

MUELLNER, A. N.; SAMUEL, R.; JOHNSON, S. A.; CHEEK, M.; PENNINGTON, T. D. & CHASE, M. W. “Molecular phylogenetics of Meliaceae (Sapindales) based on nuclear and plastid DNA sequences”. *Am. J. Botany*, vol. 90, n. 471, **2003**.

MÜLLER, C. R.; HAAS, S. E.; BASSANI, V. L.; GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; PERALBA, M. C. R.; POHLMANN, A. R. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. *Quim. Nova*, vol. 27, n. 4, p. 555- 560, **2004**.

NEVES, K. Nanotecnologia em cosméticos. *Cosmetic & Toiletries*, 20, 22, **2008**.

NODA, I.; GREEN, P. R.; SATKOWSKI, M. M.; SCHECHTMAN, L. A. Preparation and Properties of a Novel Class of Polyhydroxyalkanoate Copolymers. *Biomacromolecules*, vol. 6, n. 2, **2005**.

PENNINGTON, T. D. & STYLES, B. T. “A generic monograph of the Meliaceae”. *Blumea*, vol. 22, n. 419, **1975**.

PÉREZ, M. H.; ZINUTTI, C.; LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; ASTIER, A.; HOFFMAN, M.; BODMEIER, R.; MAINCENT, P. The preparation and evaluation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *J. Control. Release*, vol. 65, p. 429–438, **2000**.

A-PICH, A.; SCHIEMENZ, N.; BOYKO, V.; ADLER, H. J. P. Thermoreversible gelation of biodegradable polyester (PHBV) in toluene. *Polymer*, vol. 47, p. 553–560, **2006**.

B-PICH, A.; SCHIEMENZ, N.; CORTEN, C.; ADLER, H. J. P. Preparation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) particles in O/W emulsion. *Polymer*, vol. 47, p. 1912–1920, **2006**.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quím. Nova*, vol. 25, supl. 1, p. 45-61, **2002**.

POHLMANN, A. R.; MEZZALIRA, G.; VENTURINI, C. G.; CRUZ, L.; BERNARDI, A.; JÄGER, A.; BATTASTINI, A. M. O.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. Determining the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-loaded polymeric nanocapsule aqueous suspensions: A relation between light scattering and drug content. *Int. J. Pharm.*, vol. 359, p. 288 – 293, **2008**.

A-POLETTI, F. S.; FIEL, L. A.; DONIDA, B.; RÉ, M. I.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Controlling the size of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanoparticles prepared by emulsification–diffusion technique using ethanol as surface agent. *Colloid Surface A*, vol. 324, p. 105 – 112, **2008**.

B-POLETTI, F. S.; JÄGER, E.; CRUZ, L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S.S. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 28, p. 472–478, **2008**.

PRATA, F. Comportamento do Glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina. Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, junho de **2002**.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.; LOBO, J. S. Tecnologia Farmacêutica. 6 ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, vol. 1, p.597-669, **2003**.

RIBEIRO, L.A.; EICKSDT, V.R.D.; RÚBIO, G.B.G.; KONALSAISEN, J.F.; HANDAR, Z.; ETRES, M.; CAMPOS, V.A.F.P.; JORGE, M.T. Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *L.* no estado do Paraná (Brasil). *Mem. Inst. Butantan*. vol. 55, p. 19-26, **1993**.

ROCHA W.S., *et al.* Sorption of imazaquin in soils with positive balance of charges, *Chemosphere*, Oct; 49(3) : 263-70, **2002**.

ROMEIRO, A. R. Agricultura e agroindústria: perspectivas de novas configurações. *Rev. Economia Política*, vol. 14, n. 3, p. 51 – 66, **1994**.

ROSA, D. S.; PANTANO, R. F. Biodegradação: Um Ensaio com Polímeros. Itatiba: Editora Moara, **2003**.

ROSA, D. S.; CHUI, Q.S.H.; PANTANO, R.F.; AGNELLI, J. A. M. Avaliação da Biodegradação de Poli-β β β β β-(Hidroxibutirato), Poli-β β β β β-(Hidroxibutirato-co-valerato) e Poli-ε ε ε ε ε-(caprolactona) em Solo Compostado. *Polímeros: ciência e tecnologia*, vol. 12, n. 4, p. 311-317, **2002**.

ROSA, D. S.; FRANCO, B. L. M.; CALIL, M. R. Biodegradabilidade e Propriedades Mecânicas de Novas Misturas Poliméricas. *Polímeros: ciência e tecnologia*, vol. 11, n. 2, p. 82-88, **2001**.

SALEHIZADEH, H.; VAN LOOSDRECHT, M. C.M. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol. Adv.*, vol. 22, p. 261–279, **2004**.

SARRIA, A. L. F.; YAMANE, E. S.; BUENO, F. C.; MATOS, A. P.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; BUENO, O. C. Atividade inseticida de limonóides isolados de *Carapa guianensis* sobre a lagarta-do-cartucho-do-milho e a formiga cortadeira. *Anais da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ*, **2007**.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova* **2003**, 26, 726.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. *Acta Farm. Bonaerense*, vol. 21, n. 2, p. 99 – 106, **2002**.

SCHMALTZ, C.; SANTOS, J.V.; GUTERRES, S.S. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. *Infarma*, 16, 80, **2005**.

SENDIL, D.; GÜRSEL, I.; WISE, D. L.; HASIRCI, V. Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles. *J. Control. Release*, vol. 59, p. 207 – 217, **1999**.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Rev. Bras. Cien. Farm.*, vol. 39, nº 1, jan./mar., **2003**.

SILVA, W. J.; DÓRIA, G. A. A.; MAIA, R. T.; NUNES, R. S.; CARVALHO, G. A.; BLANK, A. F.; ALVES P. B.; MARÇAL, R. M.; CAVALCANTI, S. C. H. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternativesto environmentally safe insecticides. *Bioresource Technol.*, vol. 99, p. 3251-3255, **2008**.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*, R. B. Alencastro, LTC, Rio de Janeiro, **2007**; 7ª edição, 70-104.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. C.; CONCEIÇÃO, S. R.; KUSTER, R. M.; FILHO, A.M.O. Produtos Naturais para o controle da transmissão da dengue – Atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quim. Nova*, vol. 27, nº 1, p. 46-49, **2004**.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release* **2001**.

SQUIO, C. R.; ARAGÃO, G. M. F. Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxitirato) e poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxitirato) por bactérias. *Quim. Nova*, vol. 27, n. 4, p. 615-622, **2004**.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Health Environ. J.*, vol. 7, n. 2, p. 12- 20, **2006**.

TAPPIN, M. R. R.; NAKAMURA, M. J.; SIANI, A. C.; LUCCHETTI, L. Development of an HPLC method for the determination of tetranortriterpenoids in *Carapa guianensis* seed oil by experimental design. *J. Pharmaceut. Biomed.*, vol. 48, p. 1090 – 1095, **2008**.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 17 (Suplemento):99-102, **2001**.

TEIXEIRA, Z.; DURAN, N. Obtenção de Micropartículas de PHBV no Encapsulamento de Urucum: Uma Abordagem Atual em Laboratório de Química Aplicada. *Anais da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ*, **2007**.

VOIGT, R. Tratado de Tecnología Farmacéutica. Zaragoza ( Espanha ): Acribia, p. 367-375, **1982**.

WANG, Y.; WANG, X.; WEI, K.; ZHAO, N.; ZHANG, S.; CHEN, J. Fabrication, characterization and long-term in vitro release of hydrophilic drug using PHBV/HA composite microspheres. *Mater. Lett.*, vol. 61, p. 1071 – 1076, **2007**.

WANG, Y, W.; WU, Q.; CHEN, G. Q. Attachment, proliferation and differentiation of osteoblasts on random biopolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds. *Biomaterials*, vol. 25, p. 669 – 675, **2004**.

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.; CHIMELLI, M.; DALMAZ, A. C. Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões. *Visão Acadêmica*, Curitiba, vol. 2, n. 2. p. 47-58, jul./dez. **2001**.

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.; CHIMELLI, M. C.; OLIVEIRA, A. B. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. *Visão Acadêmica*, Curitiba, vol. 3, n.1. p. 13-18, jan./jun. **2002**.