



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS UFRJ-MACAÉ
Professor Aloísio Teixeira



VANESSA VILAS BOAS MUCCELIN

**DESENVOLVIMENTO DE CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS (CLN) CONTENDO ÓLEO DE COPAÍBA E
SEU POTENCIAL USO COMO INIBIDOR ALIEMNTAR EM PRAGAS
DE GRÃOS ARMAZENADOS**

**MACAÉ
2021**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS UFRJ-MACAÉ
Professor Aloísio Teixeira



VANESSA VILAS BOAS MUCCELIN

DESENVOLVIMENTO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS
(CLN) CONTENDO ÓLEO DE COPAÍBA E SEU POTENCIAL USO COMO INIBIDOR
ALIMENTAR EM PRAGAS DE GRÃOS ARMAZENADOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro - Campus Macaé como parte dos requisitos para obtenção do título de farmacêutico.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cassia Britto Detoni da Silva

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Gonçalves Pupe

MACAÉ
2021

CIP - Catalogação na Publicação

M942

Muccelin, Vanessa Vilas boas

Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo óleo de copaíba e seu potencial uso como inibidor alimentar em pragas de grãos armazenados / Vanessa Vilas Boas Muccelin. -- Macaé, 2021.
56 f.

Orientadora: Cassia Britto Detoni.

Coorientadora: Carolina Gonçalves Pupe.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé Professor Aloisio Teixeira, Bacharel em Farmácia , 2021.

1. Nanotecnologia. 2. Planejamento experimental. 3. Óleo vegetal.
4. Manteiga – Tucumã. 5. Inseticida – Botânico. I. Detoni, Cassia Britto orient.
- II. Pupe, Carolina Gonçalves coorient. III. Título.

CDD 620.5

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Campus UFRJ-Macaé Professor Aloisio Teixeira
Bibliotecário Anderson dos Santos Guarino CRB7 – 5280

VANESSA VILAS BOAS MUCCELIN

DESENVOLVIMENTO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS
(CLN) CONTENDO ÓLEO DE COPAÍBA E SEU POTENCIAL USO COMO INIBIDOR
ALIMENTAR EM PRAGAS DE GRÃOS ARMAZENADOS

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para obtenção
do título de farmacêutico.

Macaé-RJ, 18 de Fevereiro de 2021.

Comissão Avaliadora:

Prof^a. Dr^a. Cassia Britto Detoni da Silva
UFRJ/Campus Macaé
<http://lattes.cnpq.br/6034877561577208>

Prof. Dr. Vinícius Albano Araujo
UFRJ/Campus Macaé
<http://lattes.cnpq.br/0559800226477492>

Prof. Dr. Arídio Mattos Júnior
UFRJ/Campus Macaé
<http://lattes.cnpq.br/8768895227036467>

Aos meus pais, Gilmar e Renata e à minha irmã, Marcela.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por me capacitar e guiar durante todas as etapas desta graduação. O caminho é árduo mas a certeza da graça e força que vem de Deus me sustentam. Em tudo dai graças.

Aos meus pais, Gilmar e Renata, e à minha irmã Marcela por serem fontes inesgotáveis de amor e sustento em minha vida. Por possibilitarem financeiramente e emocionalmente a minha graduação e serem meu refúgio em todos os momentos. Esta conquista jamais será só minha.

Ao meu namorado, Juliano, por compreender, acreditar e sonhar os meus sonhos. O seu apoio, dedicação e amor foram imprescindíveis para esta jornada. Esta é mais uma das muitas que ainda iremos compartilhar.

À minha orientadora, Cássia Detoni, por primeiramente ter me aceito como discente de iniciação científica e posteriormente me orientar para o TCC. Agradeço por toda paciência e ensinamentos técnicos e profissionais, sem dúvida sua dedicação na pesquisa e trabalho são fontes de inspiração. Minha eterna admiração.

Aos docentes do laboratório, Carolina Pupe, Edison Carvalho e Arídio Mattos por toda contribuição ao longo destes anos. De modo especial à Carol, minha co-orientadora, pela paciência e auxílio. Agradeço principalmente por todo acompanhamento durante a licença maternidade da Cássia e ter grandes contribuições neste trabalho.

Aos discentes do laboratório por tornarem esta trajetória mais leve e divertida. De modo especial agradeço a Jéssica Cunha, Otávio Velozo e Rodrigo Fonseca por toda amizade e contribuição no projeto, vocês foram essenciais.

Aos meus amigos da graduação, da vida e familiares minha eterna gratidão. Agradeço por confiarem em mim e contribuírem de forma direta ou indireta na minha graduação. Vocês são indescritíveis. De modo especial ao Rafa e a Manu que contribuíram de forma significativa para a finalização técnica deste projeto.

À todos os servidores e docentes da UFRJ - Campus Macaé que me acolheram e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

O *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) é um inseto com status de praga por atacar os grãos e farelos armazenados, o que acarreta em prejuízos consideráveis para diversos setores agrícolas, assim como afeta a qualidade do produto após a colheita. Para seu controle, usualmente utilizam-se inseticidas químicos, o que é questionável, considerando os danos que, a longo prazo, podem oferecer ao meio ambiente e à saúde pública. Assim, medidas alternativas são buscadas, como o uso de pesticidas botânicos, já que os extratos contendo metabólitos secundários botânicos podem apresentar atividade inseticida. O óleo de copaíba, por exemplo, demonstra atividade inseticida, de repelência e *antifeedant* frente algumas pragas de armazenamento, podendo ser um modelo viável de pesticida botânico devido sua composição e facilidade de obtenção. A problemática dos pesticidas botânicos encontra-se na sua baixa eficácia devido a facilidade de volatilização e degradação. O aumento da eficácia pode ser realizado através da nanoencapsulação, que, ao aumentar a área superficial do sistema, resulta numa melhor distribuição em superfícies, liberação prolongada e menor toxicidade. Com isso, o objetivo do trabalho é o desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados, estáveis, a base de manteiga de tucumã e óleo de copaíba para futura aplicação pesticida. Foram preparadas 14 formulações pela metodologia de injeção de solventes adaptada, variando os fatores Óleo: Manteiga (0,5:1 – 2:1) e Lipídios totais: Tensoativos (1:1 – 2,5:1) através de um planejamento de superfície de resposta que apresentou como parâmetro de resposta a estabilidade do tamanho de partícula em dias. A caracterização do sistema ocorreu através do tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e pH pelas metodologias de espalhamento dinâmico de luz e potenciômetro, respectivamente. Três formulações permaneceram estáveis durante 28 dias com baixas concentrações de tensoativos e alta concentração de lipídio sólido e altas concentrações de lipídios líquidos estabilizadas por altas e baixas concentrações de tensoativos. Essas proporções se devem ao fato dos tensoativos diminuírem a tensão interfacial do sistema, o lipídio sólido aumentar a viscosidade da fase interna e o óleo de copaíba poder apresentar componentes que estabilizam o sistema. As formulações apresentaram o tamanho variando entre 154-235 nm, pH em torno de 5,0 e PDI entre 0,09-0,3. A formulação otimizada de acordo com o parâmetro de resposta conterá níveis de fatores do Óleo: Manteiga 2,3107 e Lipídios totais: Tensoativos 0,6893 com predição de estabilidade por 42 dias. Os resultados deste estudo demonstram a necessidade de um planejamento experimental para obtenção de maior estabilidade considerando os constituintes específicos da formulação e apresentou uma formulação estável através de metodologias acessíveis o que viabiliza sua futura produção e aplicação aos testes de inibição alimentar nas pragas de armazenamento.

Palavras-chave: Grãos armazenados; Inseticidas botânicos; Óleo vegetal; Manteiga de tucumã; Nanotecnologia; Planejamento experimental.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1..... *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) nas fases de larva (1 e 2), pupa (3) e adulto (4).
- Figura 2..... Árvore da Copaíba (1); Tronco da Copaíba (2); Fruto da Copaíba (3); Flores da Copaíba (4).
- Figura 3..... Principais constituintes diterpenos, porção resinosa, e sesquiterpenos, porção volátil, do óleo de copaíba.
- Figura 4..... (1) Formação das nanopartículas lipídicas sólidas. (2) Formação dos nanocarreadores lipídicos sólidos.
- Figura 5..... Algumas técnicas relatadas na literatura para produção de sistemas nanoestruturados.
- Figura 6..... Ilustração do desenvolvimento de CLN pela técnica de injeção de solventes adaptada.
- Figura 7..... Ilustração da metodologia de espalhamento dinâmico de luz (DLS). (1) Demonstra os perfis de interferências formados ao incidir um feixe de luz nas partículas em suspensão da amostra. (2) A intensidade detectada é verificada em flutuações no decorrer do tempo devido ao deslocamento das partículas. (3) Gráfico da curva de autocorrelação gerado pelo correlator.
- Figura 8..... Preparo das soluções das amostras de β -cariofileno a partir das soluções mães, com suas respectivas concentrações e volume inicial.
- Figura 9..... pH das formulações estáveis do planejamento experimental durante 28 dias.
- Figura 10..... Gráfico da distribuição de tamanho de partícula das formulações estáveis 2 (1), 3 (2) e 4 (3) no 28º dia.
- Figura 11..... Gráfico de contorno da influência das proporções de lipídio total/tensoativos e óleo/manteiga sobre a estabilidade da formulação.
- Figura 12..... Cromatograma do padrão β -cariofileno em 210 nm (1). Cromatograma do óleo de copaíba em 210 nm (2). Cromatograma da formulação branca para seletividade do método analítico em 210 nm (3).
- Figura 13..... Gráfico de linearidade das áreas dos picos obtidos em triplicata pela análise por CLAE das respectivas concentrações da curva analítica .
- Figura 14..... Curva de calibração média da linearidade e sua equação da reta.
- Figura 15..... Teor do β -cariofileno no óleo de copaíba (1) e na formulação otimizada (2).

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1..... Alguns exemplos de inseticidas botânicos caracterizados quanto as principais espécies vegetais, compostos bioativos e aplicações.
- Tabela 2..... Metabólitos secundários e seus inibidores alimentares respectivamente.
- Tabela 3..... Exemplos de lipídios sólidos utilizados para produção NLS
- Tabela 4..... Proporções e quantidades em gramas dos constituintes de cada formulação.
- Tabela 5..... Parâmetros do método analítico desenvolvido por CLAE para quantificação do β -cariofileno
- Tabela 6..... Estabilidade frente ao tamanho de partícula analisados durante 28 dias.
- Tabela 7..... Reprodutibilidade do método analítico para doseamento de β -cariofileno na amostra.
- Tabela 8..... Precisão intermediária do método analítico para doseamento de β -cariofileno na amostra
- Tabela 9..... Determinação da exatidão da amostra.

LISTA DE ABREVIACOES

ACN - Acetonitrila

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLN - Carreadores lipídicos nanoestruturados

Conab - Companhia Nacional de Abastecimento

DLS – Espalhamento dinâmico de luz

EHL – Equilíbrio Hidrófilo Lipofílico

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

NLS - Nanoprculas lipídicas sólidas

Sinan – Sistema Nacional de Notificao de agravos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Armazenamento de grãos	11
1.2 Inseticidas químicos	12
1.3 Desenvolvimento de formulações	14
1.4 Óleos de origem vegetal	15
1.5 Óleo de copaíba	17
1.6 Nanoencapsulação	19
1.6.1 Carreadores lipídicos nanoestruturados	21
2 JUSTIFICATIVA	24
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Materiais	26
4.2 Metodologias	26
4.2.1 Preparação dos CLN contendo óleo de copaíba	26
4.2.2 Caracterização do CLN	28
4.2.2.1 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e pH dos CLN de óleo de copaíba	28
4.2.3 Validação do método analítico para quantificar o marcador β-cariofileno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
5.1 Preparação dos CLN contendo óleo de copaíba	32
5.2 Caracterização do CLN	33
5.2.1 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e pH dos CLN de óleo de copaíba	33
5.3 Validação do método analítico para quantificar o marcador β -cariofileno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	39
5.3.1 Seletividade	39
6.3.2 Linearidade	39
6.3.3 Precisão	41
6.3.4 Exatidão	41
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
7 PERSPECTIVAS	44
7.1 Determinação do teor e eficiência de encapsulação dos CLN contendo óleo de copaíba usando o β -cariofileno como marcador	44
7.1.1 Eficiência de encapsulação	44

7.1.2 Teor do β -cariofileno.....	44
7.2 Validação da otimização obtida	45
7.3 Avaliação da capacidade de inibição alimentar do óleo de copaíba e da formulação usando a técnica do disco de wafer de trigo	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXO A – Condições do rotaevaporador nas 14 formulações do planejamento experimental.	53
ANEXO B - Tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e pH das 14 formulações analisadas durante 28 dias.	54

1 INTRODUÇÃO

Os grãos como arroz, trigo e feijão são produtos agrícolas de grande importância agrícola e para a alimentação mundial. Seu armazenamento deve ser controlado para assegurar a qualidade e impedir o ataque de pragas na qual estão susceptíveis. Um exemplo de praga que acomete grãos armazenados como arroz, trigo e feijão, é o besouro *Tribolium castaneum* (PACHECO; PAULA, 1995). O *Tribolium spp.* pode ser considerado um modelo aconselhável para o estudo de pragas, tendo sido a primeira espécie de praga a ter seu genoma sequenciado (RICHARDS et al., 2008) e sendo utilizado como espécie-teste para ações de diferentes compostos químicos em insetos.

Algumas das maneiras usuais de conter a presença dos insetos-pragas no armazenamento de grãos é a promoção de limpeza dos alimentos, secagem dos grãos e o uso dos inseticidas químicos que é muito questionável. A utilização dos inseticidas químicos promove, a longo prazo, danos ao meio ambiente e à saúde humana, principalmente aos produtores e comunidades rurais, devido a sua toxicidade (INCA, 2019). Para reduzir ou alterar o uso destes, medidas alternativas podem ser utilizadas. Uma das alternativas sugeridas é o uso de pesticidas botânicos, já que óleos essenciais e extratos vegetais são usados para este fim desde a Idade Antiga e encontram-se em abundância na flora brasileira (FONSECA et al., 2015).

O uso de extratos botânicos é justificável devido aos seus metabólitos secundários. O óleo de copaíba, por exemplo, extraído através da perfuração do tronco da árvore nativa do Brasil, a *Copaifera sp.* (PIERI et al., 2009), é um produto de defesa do organismo vegetal frente a fatores externos devido a sua composição química de ácidos diterpênicos, sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos sesquiterpênicos (ROMERO, 2007; YAMAGUCHI e GARCIA, 2012). Alguns estudos já demonstram atividade inseticida, de repelência e de redução do consumo alimentar (*antifeedant*) contra pragas de armazenamento. Por ser natural, apresenta facilidade de obtenção e deve trazer menor dano ao meio ambiente.

Porém o uso dos pesticidas botânicos por várias vezes é descartado devido a sua baixa eficácia comparada aos inseticidas químicos. Essa eficácia reduzida deve-se a baixa estabilidade físico-química apresentada pelos óleos, por exemplo, que apresentam facilidade de volatilização e degradação (OLIVEIRA et al., 2014).

A nanoencapsulação dos pesticidas botânicos apresentam como uma solução frente a baixa estabilidade, já que esse sistema transportador por apresentar tamanho nanométrico promove maior superfície de contato, mobilidade, solubilidade e menor toxicidade comparada

aos pesticidas convencionais (OLIVEIRA et al., 2014; NGUYEN et al., 2012). Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), são sistemas capazes de proteger o bioativo à degradações, possibilitar uma liberação prolongada e produção em ampla escala barata, o que é favorável financeiramente.

Assim, o desenvolvimento de CLN de óleo de copaíba como nanopesticida ao *T. castaneum* é promissor ao levar em conta que o controle desse inseto nos grãos armazenados é através de inseticidas químicos e por considerar que as nanopartículas apresentam como vantagem o aumento da estabilidade química, melhorando assim a eficácia do produto final.

1.1 Armazenamento de grãos

O Brasil é um dos maiores produtores de grãos, sendo as principais produções: soja, milho, arroz e algodão. A estimativa da produção para safra de 2019/20, de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), era de 248 milhões de toneladas e apresentava uma estimativa de aumento em 27% da produção para os próximos dez anos (CONAB, 2020). Esses valores demonstram a importância do setor agrícola para economia brasileira e sua perspectiva de crescimento.

Os grãos necessitam de um armazenamento adequado com controle de temperatura e umidade para preservação das suas propriedades e garantia da qualidade. O armazenamento inadequado favorece o comprometimento quantitativo e qualitativo do grão já que o expõem dentre os diferentes fatores as pragas de armazenamento. A perda média do grão na etapa de armazenamento por pragas são estimadas em 10,0% do total produzido no Brasil. Assim a limpeza e higienização das instalações de unidades armazenadoras, métodos de controle de pragas e o próprio monitoramento das pragas na massa de grãos são medidas cruciais no manejo dos grãos (LORINI et al., 2015).

As pragas que podem acometer grãos armazenados são fungos, roedores, aves, ácaros, mas os principais são os insetos, destacando-se as traças e os besouros. O besouro *Tribolium castaneum* (Figura 1) é um dos principais representantes de inseto-praga, mas diferente de outras espécies é uma praga secundária, ou seja, depende do ataque anterior de pragas primárias para acometer grãos quebrados, impuros ou com pontos de aquecimento. Os principais grãos são milho, amendoim, café, cacau, arroz, feijão e trigo (LORINI et al., 2015). Sua presença pode causar perda quantitativa do produto, alterar o odor, provocar sabor desagradável, favorecer o aparecimento de microorganismo e por isso devem ser controlados (MACIEL, 2016).

Figura 1. *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) nas fases de larva (1 e 2), pupa (3) e adulto (4).



Fonte: Adaptado de Lorini et al (2015).
(Fotos: Adriana de Marques Freitas).

O controle das pragas de grãos ocorre de forma física ou química, como por exemplo através da remoção direta do inseto, controle de temperatura, umidade, composição da atmosfera e radiação ionizante (MACIEL, 2016). Mas o controle mais utilizado é através dos inseticidas químicos, também referido amplamente como agrotóxico.

1.2 Inseticidas químicos

Os agrotóxicos são definidos pela Lei nº 7802 de 1989 como:

Os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. (BRASIL, 1989).

O uso dos agrotóxicos, a princípio, visa a proteção e preservação dos vegetais que são suscetíveis a doenças, diferentes condições ambientais e ao ataque de pragas, já que esses

fatores colaboram para a produção de metabólitos intrínsecos do vegetal como forma de defesa. Alguns metabólitos podem ser tóxicos à saúde humana o que afetaria posteriormente a composição do alimento ofertado à população. Assim, a aplicação dos defensivos agrícolas teria como propósito uma maior qualidade do vegetal consumido como forma de colaboração a própria saúde humana simultaneamente (SWANTON et al., 2011).

Todavia, os compostos químicos também podem ser considerados tóxicos de acordo com o tipo de composto, dose aplicada e a forma de uso. A exposição aos agrotóxicos tornou-se uma problemática não só ambiental pela contaminação de água e solos, desenvolvimento de pragas resistentes, mas de saúde pública pelo acúmulo de resíduos tóxicos em alimentos e intoxicação dos produtores rurais (CORRÊA e SALGADO, 2011). O contato com esses agentes pode levar a quadros de intoxicação leve, moderada ou grave, além de poder ter consequências como distúrbios respiratórios, gastrointestinais, neurológicos, neoplasias e alergias (BRASIL, 2018).

O Brasil é um país que apresenta alto consumo e comercialização de agrotóxicos devido seu alto mercado agrícola. Para o controle das consequências desse uso, é de notificação compulsória no Sistema Nacional de Notificação de Agravos (Sinan), conforme a Portaria MS nº 1.271/14 os casos de intoxicações por agrotóxicos no país. Os resultados demonstram que as maiores notificações entre os anos de 2007 a 2015 foram nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Pernambuco (BRASIL, 2018).

O agrotóxico mais comercializados no ano de 2014 foi o glifosato, um herbicida que foi responsável por 31,45% da comercialização total (BRASIL, 2018). No controle específico do *T. castaneum*, os agrotóxicos são classificados como inseticidas já que o alvo é o besouro. Os inseticidas químicos amplamente utilizados contém como princípio ativo o fosfeto de alumínio. O fosfeto de alumínio é um composto químico inorgânico precursor da fosfina - gás incolor que apresenta efeitos tóxicos (intoxicação aguda ou crônica) a saúde humana quando inalados ou consumidos de forma inapropriada. Alguns estudos demonstram a ação da fosfina com inibição não-competitiva do transporte de elétrons na citocromo oxidase em animais, interferência na síntese de proteínas e redução na atividade da catalase (FLORÃO et al., 2004). A formulação usual é empregada pelo método de fumigação e distribuídos sobre a forma de pastilhas.

Com a importância do controle de inseto-pragas no armazenamento dos grãos e a problemática de saúde pública e ambiental como consequência ao uso de inseticidas químicos usuais, medidas alternativas para o manejo com o desenvolvimento de novas formulações que sejam menos nocivas são fundamentais.

1.3 Desenvolvimento de formulações

O desenvolvimento de novas formulações agrícolas é um setor fundamental para inovação e adaptação ao mercado, já que o dinamismo possibilita a constante aceitação do produto frente às mudanças temporárias dos consumidores, adequação às novas demandas e promoção de saúde (ARUNDEL et al., 1997). Nos laboratórios buscam formulações que sejam compatíveis e adequadas ao princípio ativo utilizado (VIEIRA e OHAYLON, 2006), de modo a preservar suas propriedades e melhorar parâmetros, como estabilidade, biodisponibilidade, superfície de contato e características organolépticas.

A química das formulações se assemelha em diferentes setores. O desenvolvimento da formulação farmacêutica e pesticida se equivalem em alguns estudos, por exemplo, já que os compostos químicos variam quanto ao organismo, mas podem se assemelhar quanto ao alvo químico. Dessa forma, ambos são aprovados levando em consideração seus riscos e benefícios, já que os compostos químicos podem propiciar efeitos adversos ou impactos ao meio ambiente. Estudos quanto a avaliação da eficácia e toxicidade em animais e no meio ambiente, investigação frente a toxicidade de dose, genotoxicidade e carcinogenicidade são fundamentais para não colocar em risco a saúde do consumidor e preservar a seleção das formulações (SWANTON et al., 2011). Essa semelhança também é notória na preparação e nos conhecimentos da tecnologia farmacêutica sobre as formas de produção e escolha da formulação (REN et al., 2015).

O setor farmacêutico é um dos principais investidores em pesquisa e desenvolvimento no mundo de acordo com o Guia 2019 da Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa (INTERFARMA, 2019). Contudo, o Brasil não é referência em inovação, em 2016 encontrava na 69^o posição no *ranking* mundial de inovação, enquanto a Suíça detinha a 1^o posição (PONTES, 2017). Isto pode ser reflexo ainda do baixo investimento no setor de P&D no país, apesar de o Brasil ter como estratégia a busca de compostos ativos presentes na sua vasta flora que ainda hoje é pouco explorada (SANDILYAN e CIE, 2016; SOUZA et al., 2017). A utilização da matéria prima nacional é uma forma de valorização e estímulo do mercado interno, de maneira a não só prezar pelos produtos nacionais mas por trabalhadores locais.

1.4 Óleos de origem vegetal

Com a ampla biodiversidade brasileira, os extratos botânicos apresentam-se como uma alternativa natural para o desenvolvimento de novas formulações. Estas são utilizadas tradicionalmente para formulação de medicamentos na medicina indiana e chinesa, e são 25-28% da base dos medicamentos utilizados na medicina moderna (FRIDLENDER et al., 2015; ORTEGA e CAMPOS, 2019). Como pesticidas, os extratos botânicos e óleos essenciais já são utilizados a mais de 3000 anos (PAVELA, 2016).

Sua utilização é justificada por serem fontes de substâncias com propriedades bioativas já descritas. Seus metabólitos são produzidos como forma de defesa frente agentes patogênicos ou diferentes formas que possam danificar o vegetal. (MORETTI et al., 2002; SIMÕES e SPITZER, 2004; PACHECO, 2014). Dentre os metabólitos secundários descritos, tem-se os óleos essenciais, ácidos fenólicos, flavonoides, lactonas sesquiterpênicas, cumarinas, alcaloides, saponinas, graxas epicuticulares, iridóides, taninos, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos (NETO-GOBBO e LOPES, 2007). Suas propriedades biológicas demonstram atividades antimicrobiana, antiproliferativa, inseticida e herbicida (SANTOS, 2015).

Os óleos vegetais demonstram diferentes potenciais e aplicações devido à alta complexidade e variação da composição, que são constituídos principalmente por terpenóides e fenilpropanóides. Para sua utilização no mercado é necessário um controle de qualidade considerando que os extratos podem variar consideravelmente de acordo com fatores como a sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, poluição atmosférica, oferta de nutrientes, altitude, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos, condições de coleta, estabilização e estocagem (NETO-GOBBO e LOPES, 2007). O controle assegura a atividade do óleo, que pode ser decorrente dos seus principais constituintes ou pela sinergia dos mesmos (RAUT e KARUPPAYIL, 2014).

Os pesticidas botânicos apresentam atividades variadas podendo ter ação inseticida, repelente e de inibição alimentar (termo do inglês – *antifeedant*) (Tabela 1). O inseticida propriamente dito terá uma ação tóxica atuando no sistema nervoso central do inseto, a ação repelente já impede a aproximação do inseto, sendo característico de óleos essenciais, por exemplo (CORRÊA e SALGADO, 2011). Já os inibidores alimentares atuam na digestão do inseto, esses metabólitos secundários ao serem ingeridos pelos insetos provocam uma mudança comportamental, são capazes de interromper temporariamente ou permanentemente a atividade

alimentar pela estimulação de receptores especializados ou a distorção da função normal de neurônios ao perceberem compostos fagoestimulantes (KOUL, 2008; PIRES, 2017).

Tabela 1. Alguns exemplos de inseticidas botânicos caracterizados quanto as principais espécies vegetais, compostos bioativos e aplicações.

Espécie vegetal	Composto bioativo	Função
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	Azadiractina	Inseticida
<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i> Vis.	Piretrina	Inseticida e acaricida
<i>Derris elliptica</i> Benth.	Rotenona	Inseticida e acaricida
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Nicotina	Inseticida e acaricida
<i>Citrus</i> sp.	Limoneno	Inseticida e acaricida
<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt	Citronelal	Repelente
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merrill & Perry	Eugenol	Inseticida e herbicida
<i>Mentha piperita</i> L.	Mentol	Inseticida
<i>Eucalyptus</i> sp.	1,8-cineol	Inseticida e acaricida

Fonte: OLIVEIRA et al., 2014 (Tradução livre da autora).

Os inibidores alimentares demonstram ter atividade proveniente com baixas concentrações do ativo, maior facilidade de degradação, menores efeitos tóxicos aos organismos não alvo e um baixo desenvolvimento de resistência pelos insetos, favorecendo a qualidade e conservação não só dos insumos agrícolas, mas dos agricultores, consumidores e das próprias pragas (PIRES e CARVALHO, 2017).

A ação *antifeedant* proveniente de diferentes metabólitos secundários (Tabela 2), mas devido as diferenças fisiológicas cada espécie de interesse deve ser estudada individualmente. A atividade *antifeedant* ao *T. castaneum* já foi descrita por Adeyemi e colaboradores (2010) ao usarem a planta *Bobgunnia madagascariensis*, a ação foi proveniente do flavonoide quercetina isolado (2,0 mg/mL), mostrando uma inibição alimentar de 54,04%. Eles acreditam que ao aumentar a concentração de quercetina teria uma atividade ainda maior podendo até ser comparável a azadiractina (1,0 mg/mL) que tem taxa de inibição alimentar de 67,10%. Uma leve ação *antifeedant* frente ao *T. castaneum* também foi descrita por Huang e colaboradores (1997) através do óleo de noz-moscada o que conferiu proteção aos grãos.

Tabela 2. Metabólitos secundários e seus inibidores alimentares respectivamente.

Metabólito secundário	Inibidor alimentar
Alcaloides	Nicotina
Carotenoide	Fuxoxantina
Cumarinas	Cumarina
Flavonoides	Quercetina
Ligninas	Excelsina
Ácidos fenólicos	Ácido <i>p</i> -hidrobenzoico
Quinonas	Juglona
Terpenos	Citronelol

Fonte: Adaptado de PETERSON e COATS, 2001.

1.5 Óleo de copaíba

Dentre os óleos nacionais utilizados pode-se citar o óleo de copaíba, extraído através da perfuração do tronco da árvore nativa do Brasil, a *Copaifera sp.* (Figura 2), encontrado nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Amazônica. É caracterizado por casca aromática, folhagem densa, frutos secos do tipo vagem e flores pequenas, sendo suas propriedades medicinais já utilizadas pelos índios latino-americanos. (PIERI et al., 2009).

Figura 2. Árvore da Copaíba (1); Tronco da Copaíba (2); Fruto da Copaíba (3); Flores da Copaíba (4).

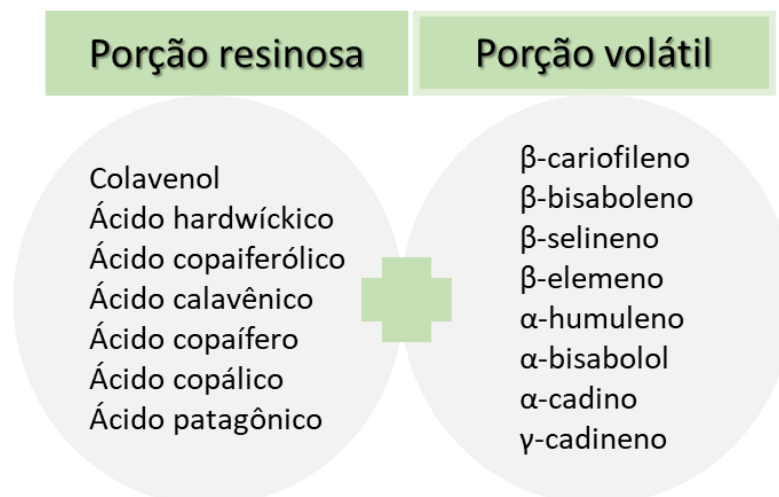


Fonte: Adaptado de Leite (2016).

O óleo de copaíba é proveniente dos canais esquizo-lizígeos, podendo ser obtido pela perfuração do tronco da árvore. A técnica escolhida usualmente para perfuração como uma forma mais sustentável é com um trado. O primeiro é realizado 1 metro acima da base da planta e o segundo a 1-1,5 metros acima do primeiro, na qual irá girar em sentido horário perfurando o tronco até o centro do caule. No momento em que aparece o óleo, insere um cano de PVC por onde irá escorrer o óleo de copaíba. Para essa exploração o produtor deve ter um plano de manejo autorizado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (PIERI et al., 2009).

O óleo de copaíba é caracterizado por uma porção majoritária resinosa não volátil composta por ácidos diterpênicos e uma porção de óleo essencial composta por sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos sesquiterpênicos (Figura 3). As ações anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiedêmica e analgésica são provenientes dos sesquiterpenos (PIERI et al., 2009). Os sesquiterpenos apresentam ainda baixa solubilidade, rápida oxidação e são responsáveis pelo aroma do óleo (VEIGA e PINTO, 2002). Os constituintes podem ter suas concentrações variando de acordo com variações de espécies, fatores biológicos ou abióticos.

Figura 3. Principais constituintes diterpenos, porção resinosa, e sesquiterpenos, porção volátil, do óleo de copaíba.



Fonte: (PIERI et al., 2009).

No ramo agrícola o óleo de copaíba apresenta diferentes atividades dependendo da espécie analisada. O efeito inseticida já foi observado no estudo da mosca-minadora *Liriomyza trifolli* (ZUIM et al., 2013), no besouro de amendoim *Ulomoides dermestoides* (SILVA et al., 2012) e na vaquinha *Diabrotica speciosa* (BARBOSA et al., 2013). Silva e colaboradores

(2012) observaram ainda que os óleos de copaíba mais claros e menos viscosos são os mais eficazes, além da atividade inseticida ser maior em amostras com maior concentração de sesquiterpenos devido ao β -cariofileno.

A atividade repelente foi relatada por Coitinho e colaboradores (2006) tendo 87,7% de repelência em insetos adultos de gorgulho de milho *Sitophilus zeamai* nos grãos de milho e por Freire e colaboradores (2006) ao avaliar no tratamento em colônias infestadas por forídeos (SANTOS, 2014). Sâmia e colaboradores (2009) também demonstraram redução do consumo alimentar da lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* ao utilizar extratos metanólicos de *Copaifera langsdorffii* Desf. solubilizados em solução aquosa de Tween 80 a 1%. Melo e colaboradores (2015) observaram que o óleo de copaíba diluído sendo aplicado por contato ou nebulização apresentava-se tóxico ao *T. castaneum*.

As atividades inseticidas, de repelência e de redução do consumo alimentar já descritas conferem ao óleo de copaíba um potencial composto bioativo nativo do Brasil para o desenvolvimento de novas formulações para o controle do *T. castaneum* além da possibilidade de avaliação do seu índice *antifeedant*. Por ser um óleo apresenta facilidade de obtenção, produção e deve trazer menor impacto ambiental quando comparado aos inseticidas químicos já utilizados.

A problemática encontrada é que os inseticidas botânicos usualmente apresentam facilidade de volatilização, baixa estabilidade físico-química e baixa estabilidade térmica quanto aos seus compostos ativos (OLIVEIRA et al., 2014), foi devida a essas variações das concentrações dos constituintes entre as plantas e o baixo efeito residual que os pesticidas botânicos não apresentavam uma alta eficiência e foram substituídos pelos inseticidas sintéticos (CORRÊA e SALGADO, 2011). Assim, a escolha da forma em que o óleo será administrado ou veiculado depende da área que deseja aplicar, estabilidade da formulação e tipo de liberação esperada.

1.6 Nanoencapsulação

A nanotecnologia é uma área do conhecimento que estuda a matéria em escala nanométrica. Ela tem se difundido cada vez mais em diferentes áreas e sendo útil em produtos pesticidas. Na área agrícola tem um papel importante na liberação controlada de bioativos para controle de pragas e na oferta de nutrientes para plantas (OLIVEIRA et al., 2014). No desenvolvimento industrial isto agrega marketing ao produto e vantagens frente aos produtos concorrentes.

As principais vantagens da nanoencapsulação de pesticidas são a melhora da eficácia pelo aumento da superfície de contato, aumento da atividade sistêmica pela redução do tamanho das partículas o que promove maior mobilidade e diminuição da toxicidade devido à eliminação dos solventes orgânicos. Assim, os pesticidas botânicos nanoencapsulados são capazes de liberar o ativo no organismo alvo através de uma liberação controlada, minimizar efeitos tóxicos em organismo não-alvo, melhorar a estabilidade físico-química e impedir a degradação do ativo, sendo um sistema eficaz de formulação (MÜLLER et al., 2000, OLIVEIRA et al., 2014) e a principal escolha para contornar a baixa estabilidade dos óleos nos pesticidas botânicos é nanoencapsulação (PAVELA, 2016).

A nanoencapsulação caracterizada por uma maior área de superfície de contato e número de partículas, altera propriedades físico-químicas como o ponto de fusão e dissolução ou solubilidade aparente dos compostos. Os sistemas nanoestruturados variam de acordo com seus constituintes e objetivos, podendo ser nanocápsulas, nanoesferas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas, niossomas, microemulsões ou lipossomas (DAUDT et al., 2013).

Dentre os sistemas transportadores que empregam a nanotecnologia, as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram desenvolvidas com o objetivo de obter um sistema com ampla escala de produção barata e estabilidade química dos seus constituintes. Dentre as limitações desse sistema estão a alta complexidade da sua matriz cristalina e a possibilidade de polimorfismo lipídico. As NLS são constituídas unicamente por lipídios sólidos (Tabela 3) à temperatura ambiente (37 °C), na qual para sua produção pode-se fundir o lipídio para dissolver o princípio ativo no mesmo. Este modo de produção traz como desvantagem a etapa de resfriamento da formulação ou seu armazenamento, onde o lipídio ao recrystalizar forma uma estrutura tão ordenada ao ponto de poder expulsar o princípio ativo do sistema (MÜLLER et al., 2000).

Tabela 3. Exemplos de lipídios sólidos utilizados para produção NLS

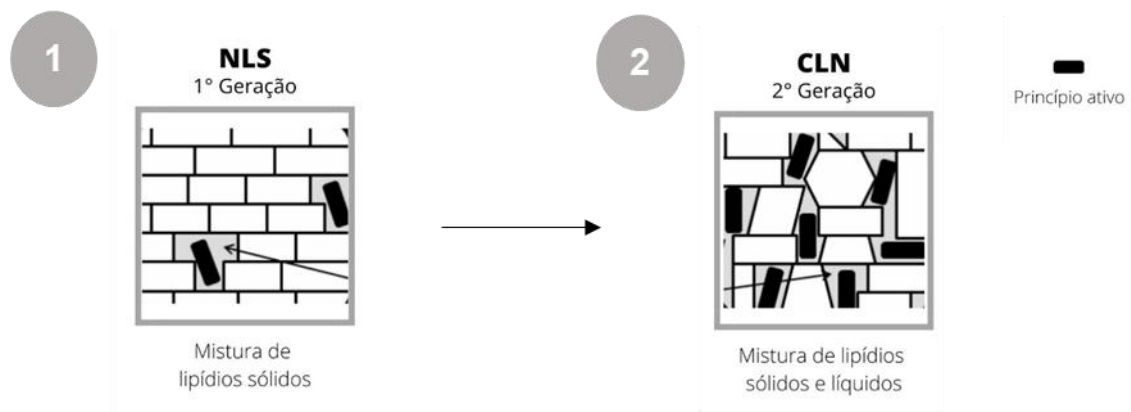
Tipo	Nome químico
Acilgliceróis	Palmitoestearato de glicerila; Behenato de glicerila; Trimiristato de glicerila; Tripalmitato de glicerila; Triestearato de glicerila; Monoestearato de glicerila
Ácidos graxos	Ácido esteárico; Ácido palmítico; Ácido behênico
Álcoois graxos	Álcool cetílico; Álcool esterárfico
Ceras	Cera de carnaúba; Cera de abelha; Palmitato de cetila

Fonte: Adaptado de Sena (2016).

1.6.1 Carreadores lipídicos nanoestruturados

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), segunda geração das NLS, são sistemas constituídos por lipídios sólidos e líquidos. A mistura de diferentes estruturas e estados físicos dos lipídios promove a formação de um sistema desordenado capaz de acomodar melhor o princípio ativo de forma a reduzir as chances da expulsão do mesmo (Figura 4). Os lipídios podem variar ainda quanto sua própria composição, como por exemplo a presença de ácidos graxos de cadeias longas e curtas (MÜLLER et al., 2000).

Figura 4. (1) Formação das nanopartículas lipídicas sólidas. (2) Formação dos nanocarreadores lipídicos sólidos.



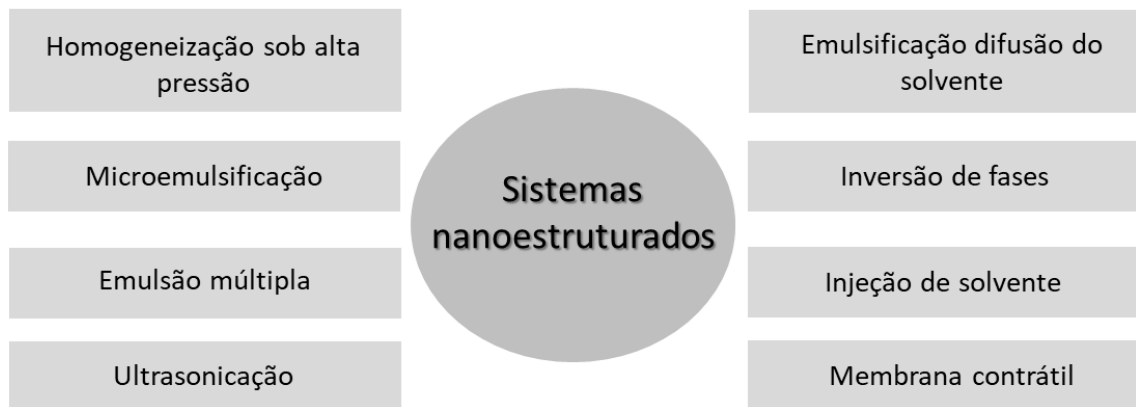
Fonte: Adaptado de Guimarães e Ré (2011), em Tradução livre da autora.

Manteigas vegetais são misturas naturais de lipídios líquidos e sólidos. A aplicação destas como matéria-prima para produção de nanopartículas deve fornecer formulações biodegradáveis e biocompatíveis (COLOMÉ et al., 2010). A manteiga de tucumã proveniente do tucumã, uma palmeira nativa da Amazônia, é composta por 25,6% de ácidos graxos saturados e 74,4% de insaturados dentre eles ácidos graxos palmítico, esteárico, oléico e linoléico (MORAIS; GUTJAHR, 2009). Esta composição se assemelha aos lipídios sólidos já utilizados para produção de NLS propiciando sua possibilidade de utilização.

Colomé e colaboradores (2010) descreveram a produção de nanopartículas utilizando como lipídio a manteiga de semente de cupuaçu, mostrando resultados promissores ao utilizar técnicas de homogeneização a alta pressão e emulsificação- evaporação do solvente. O estudo demonstrou que independente da técnica os resultados são satisfatórios com concentrações de até 10% de lipídios.

Os métodos de produção das NLS e CLN são feitos da mesma forma, variando somente os constituintes. Para incorporação do princípio ativo lipofílico/hidrofílico são descritos alguns métodos na literatura (Figura 5).

Figura 5. Algumas técnicas relatadas na literatura para produção de sistemas nanoestruturados.



Fonte: Adaptado de Pardeike et al (2009) e Sena (2016).

A homogeneização a alta pressão é a principal técnica utilizada na escala industrial por apresentar menor tempo de produção, não utilização de solventes orgânicos, possibilidade de deslocamento de escala e operação em condições assépticas. As partículas da formulação sofrem cisalhamento pelo homogeneizador até o tamanho desejado. A tensão de cisalhamento elevada pode levar a diminuição da massa molar do lipídio e do princípio ativo, sendo esta uma das desvantagens, além da técnica requerer equipamentos de alto custo limitando seu uso em pesquisas acadêmicas (SOUTO et al., 2011).

A técnica de injeção de solventes descrita por Schubert e Muller-Goymann (2003) é uma nova abordagem de técnica que não necessita de homogeneização a alta pressão, apresenta fácil manuseio e um rápido processo de produção sem necessidade de equipamentos sofisticados. O tamanho de partícula é controlado por variações no volume injetado de solvente e concentração de lipídio, na qual alta velocidade de difusão de solvente obtém partículas menores. O método utiliza uma fase aquosa e orgânica contendo um solvente orgânico miscível em água (SCHUBERT; MULLER-GOYMAN, 2003). O método descrito é realizado gotejando a fase oleosa na aquosa através de uma agulha de injeção. O produto resultante é filtrado para remoção do excesso de lipídios sólidos. A problemática do uso de solventes orgânicos pode ser revertida com o uso posterior do rotaevaporador para remoção completa do solvente.

Considerando uma escala industrial, Dong e colaboradores (2012) demonstraram que a nanoprecipitação, que segue o mesmo princípio da injeção de solventes, pode ser realizada em ampla escala utilizando misturadores estáticos. O estudo demonstrou partículas com tamanhos inferiores a 200 nm com uma taxa de produção de 37,5-150 g/h.

Após o preparo dos CLN deve-se caracterizar o sistema. A caracterização é uma etapa fundamental para previsão do comportamento das partículas *in vivo* e avaliação da sua estabilidade no decorrer do tempo, pois o modo como o ativo interage com a matriz lipídica, o tipo de lipídio e tensoativos utilizados são fatores influentes no modo de liberação da substância (MÜLLER et al., 2000; SCHAFFAZICK et al., 2003). Para avaliação desses fatores determina-se o tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta, pH, avaliação morfológica e eficiência de encapsulação do princípio ativo.

2 JUSTIFICATIVA

As pragas agrícolas de armazenamento apresentam uma perda significativa aos grãos por afetar a qualidade, gerar perda e gastos econômicos ao setor agrícola e poder impossibilitar a distribuição aos consumidores. Dentre elas, o *Tribolium castaneum* apresenta grande relevância por ser uma praga de armazenamento secundária que deve ter sua presença controlada.

Como medidas alternativas as formas usuais do controle das pragas apresentam-se os pesticidas botânicos que devido a sua composição química demonstram atividades inseticidas já descritas e utilizadas desde a Idade Antiga. O óleo de copaíba é um óleo vegetal com diversas aplicações descritas incluindo no setor agrícola. Sua composição e facilidade de obtenção possibilita novos estudos de atividades e o desenvolvimento de formulações que melhorem sua eficácia, já que nas formas usuais apresenta facilidade de degradação. Por este motivo os pesticidas botânicos ainda não se sobrepõem ao uso dos agrotóxicos. O uso de óleos vegetais nacionais, como o óleo de copaíba, ainda possibilita a valorização da economia e trabalhadores do território nacional brasileiro.

A nanoencapsulação apresenta-se como uma forma promissora de carreamento de pesticidas botânicos por diminuir o tamanho de partícula, aumentar a área superficial e assim contribuir para maior solubilidade de compostos lipofílicos, induzir atividade sistêmica, aumentar a mobilidade, diminuir a toxicidade e poder promover um sistema de liberação controlada.

Neste contexto o desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados utilizando técnicas de fácil manuseio e possibilidade de escalonamento contribui significativamente para melhorar a estabilidade do óleo de copaíba na formulação e possibilitar futuros estudos de caracterização do sistema e atividade frente a praga de armazenamento, neste estudo o *T. castaneum*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados, estáveis, a base de manteiga de tucumã e óleo de copaíba para futura aplicação pesticida.

3.2 Objetivos específicos

1. Preparar CLN de óleo de copaíba e manteiga de tucumã usando uma técnica de injeção de solvente adaptada.
2. Avaliar a influência das proporções de lipídios sólidos e líquidos assim como a proporção de tensoativos e lipídios totais na estabilidade das formulações por meio de um planejamento experimental de superfície de resposta.
3. Avaliar a estabilidade ao longo de 28 dias através da determinação de tamanho de partícula, índice de polidispersão e pH das formulações.
4. Obter uma otimização das proporções de lipídios sólidos e líquidos assim como a proporção de tensoativos e lipídios totais para produzir uma formulação com alta estabilidade.
5. Validar método analítico para quantificação do β -cariofileno nas formulações e no óleo de copaíba usado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

a) Matérias-primas:

Água destilada; Manteiga de tucumã (Amazon oil®, BRASIL); Monoleato de sorbitano (Span 80) (SIGMA®, BRASIL); Monoleato de sorbitano polioxietileno (Vetec®, BRASIL) (Tween 80); Óleo de copaíba (Amazon oil®, BRASIL); Acetona (Vetec®, BRASIL); β -cariofileno (Sigma®, BRASIL); Acetonitrila (TEDIA®, USA); Fosfato de sódio dihidrogênio; Fosfato dipotássico; Água milli-Q.

b) Equipamentos:

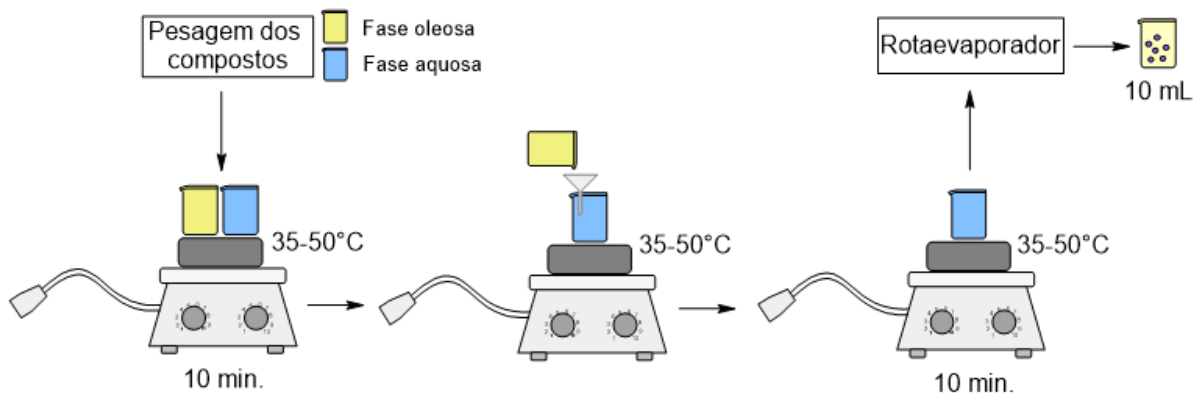
Balança analítica; Agitador magnético (RO 10 – IKA®); Rotaevaporador (R-215 BUCHI®); Zetasizer® (Malvern); Potenciômetro (PHS-3E Edutech®); Cromatógrafo líquido de alta eficiência (SHIMADZU®).

4.2 Metodologias

4.2.1 Preparação dos CLN contendo óleo de copaíba

O preparado das CLN foi realizado por uma adaptação da técnica de injeção de solvente descrita por Schubert e Muller-Goymann (2003), na qual em vez de utilizar agulhas, usou-se um fluxo laminar (Figura 6). Os CLN foram produzidos contendo a fase oleosa contendo monoleato de sorbitano (0,04 g), manteiga de tucumã, óleo de copaíba e acetona (27 mL), e a fase aquosa contendo água destilada (53 mL) e monoleato de sorbitano polioxietileno (0,04 g). Após pesagem em balança analítica, ambas as fases foram colocadas sob agitador magnético em banho-maria variando a temperatura da água entre 35-50 °C durante 10 minutos. Em seguida, foi vertida a fase oleosa na fase aquosa através do funil conectado a uma ponteira (200 μ L) para que ocorresse a nucleação dos materiais insolúveis em água sob um fluxo laminar da fase aquosa, a fim de garantir o tamanho nanométrico das partículas formadas. A formulação foi deixada sob agitação para estabilização por 10 minutos e levada ao rotaevaporador para que possibilitasse a evaporação do solvente orgânico e o ajuste do volume da suspensão a 10 mL, não sendo necessário a etapa de filtração dos lipídios sólidos. O rotaevaporador foi mantido em todos os preparos com rotação de 80 rpm.

Figura 6. Ilustração do desenvolvimento de CLN pela técnica de injeção de solventes adaptada.



Fonte: Da autora (2021)

Para entender a influência das proporções dos componentes sobre a estabilidade da formulação, as amostras foram preparadas segundo planejamento experimental de superfície de resposta do tipo composto central com 2 fatores contínuos e com sextuplicata no ponto central utilizando o software Minitab® Statistical Software. Os fatores utilizados foram a proporção de Óleo: Manteiga tendo um nível de 0,5: 1 a 2: 1, respectivamente, e a proporção de Lipídios totais: Tensoativos com nível de 1: 1 a 2,5: 1, respectivamente. Os solventes utilizados, acetona e água, foram mantidos constantes nas formulações preparadas, assim como os tensoativos. O programa gerou 14 ensaios (Tabela 4), na qual a repetibilidade do experimento foi avaliada através da sextuplicata do ponto central. O parâmetro de resposta utilizado foi o tamanho de partículas em dias. Foram consideradas estáveis as formulações que tiveram variação de tamanho médio (z-avarege) inferior a 10 nm com o objetivo de assegurar uma constância do tamanho médio e as formulações que atendessem aos critérios de qualidade do software Zetasizer® (*Resul quality; Expert advice*) após a medição do tamanho de partícula.

A análise do experimento de superfície de resposta foi feita pelo programa Minitab® com a análise de variância e equação de regressão através da visualização gráfica da superfície resposta. O programa através dos fatores e limites analisados encontra condições ótimas do processo.

Tabela 4. Proporções e quantidades em gramas dos constituintes de cada formulação.

Formulação	Proporção O:M	Proporção Lt:T	Lipídios totais (g)	Manteiga (g)	Óleo (g)
1	2,000	1,000	0,080	0,0267	0,0533
2	0,189	1,750	0,140	0,1177	0,0223
3	1,250	2,810	0,225	0,0999	0,1249
4	0,500	1,000	0,080	0,0533	0,0267
5	1,250	1,750	0,140	0,0622	0,0778
6	1,250	1,750	0,140	0,0622	0,0778
7	1,250	1,750	0,140	0,0622	0,0778
8	1,250	1,750	0,140	0,0622	0,0778
9	1,250	0,690	0,055	0,0245	0,0306
10	0,500	2,500	0,200	0,1333	0,0667
11	1,250	1,750	0,140	0,0622	0,0778
12	1,250	1,750	0,140	0,0622	0,0778
13	2,000	2,500	0,200	0,0667	0,1333
14	2,311	1,750	0,140	0,0423	0,0977

*O ponto central na qual realizou sextuplicata foram as formulações 5, 6, 7, 8, 11 e 12.

*O:M – Óleo: Manteiga e Lt:T – Lipídios totais: Tensoativos

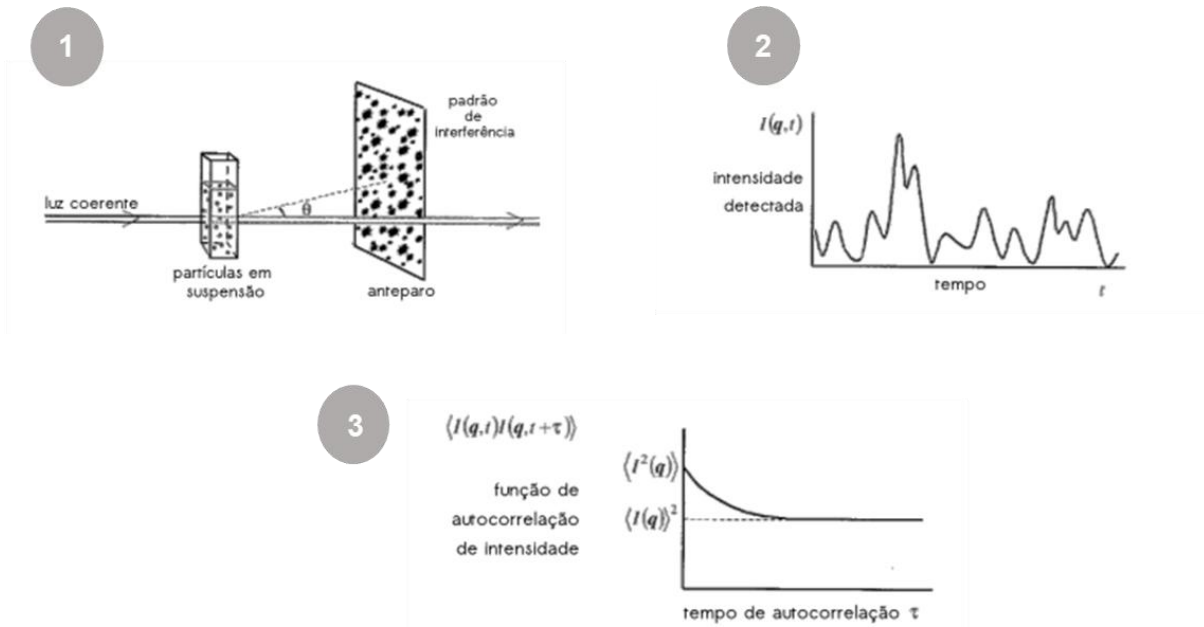
4.2.2 Caracterização do CLN

4.2.2.1 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e pH dos CLN de óleo de copaíba

As partículas foram caracterizadas físico-quimicamente quanto ao tamanho de partícula, PDI e pH em triplicata durante 28 dias (0, 7, 14, 21, e 28) após a preparação das formulações dos CLN contendo óleo de copaíba, conforme o planejamento experimental.

O tamanho de partícula e PDI utilizou a metodologia de espectroscopia de correlação de fótons ou também conhecida como espalhamento dinâmico de luz (DLS) que aparece como uma das principais técnicas de análise (MÜLLER et al., 2000). Essa técnica (Figura 7) analisa o tamanho de partículas através do movimento browniano das moléculas em suspensão. Um feixe de laser ilumina a amostra que espalha a luz em diferentes regiões. As flutuações de intensidade geradas no espalhamento são influenciadas pelo tamanho de partícula que através de modelos matemáticos é calculado (DIALETACHI, 2017). Assim, a relação do movimento com o tamanho das partículas pela intensidade de luz analisada pelo detector permite calcular o tamanho e o PDI das amostras. O PDI analisa a distribuição dos tamanhos avaliando a homogeneidade do sistema. Esses parâmetros foram analisados no aparelho Zetasizer®.

Figura 7. Ilustração da metodologia de espalhamento dinâmico de luz (DLS). (1) Demonstra os perfis de interferências formados ao incidir um feixe de luz nas partículas em suspensão da amostra. (2) A intensidade detectada é verificada em flutuações no decorrer do tempo devido ao deslocamento das partículas. (3) Gráfico da curva de autocorrelação gerado pelo correlator.



Fonte: Adaptada de Dialetachi (2017)

O pH das formulações foi analisado para avaliar a possibilidade de instabilidades químicas e microbiológicas. Adicionalmente, para fins comparativos é interessante que todas as preparações tenham pH parecidos. A determinação do pH foi feita em potenciômetro calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0, sendo feito a leitura de toda amostra da formulação em triplicata.

4.2.3 Validação do método analítico para quantificar o marcador β -cariofileno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A técnica de quantificação utilizada para o marcador β -cariofileno foi por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU® com detector de arranjo de diodo e injetor automático. Esta técnica baseada na separação dos compostos por diferentes interações entre a fase móvel e a fase estacionária permite análises qualitativas através da comparação dos tempos de retenção e uma análise quantitativa através da comparação das áreas.

O método utilizado foi uma adaptação do descrito por Borges e colaboradores (2013) e sua validação ocorreu de acordo com os parâmetros da Agência Nacional de Vigilância

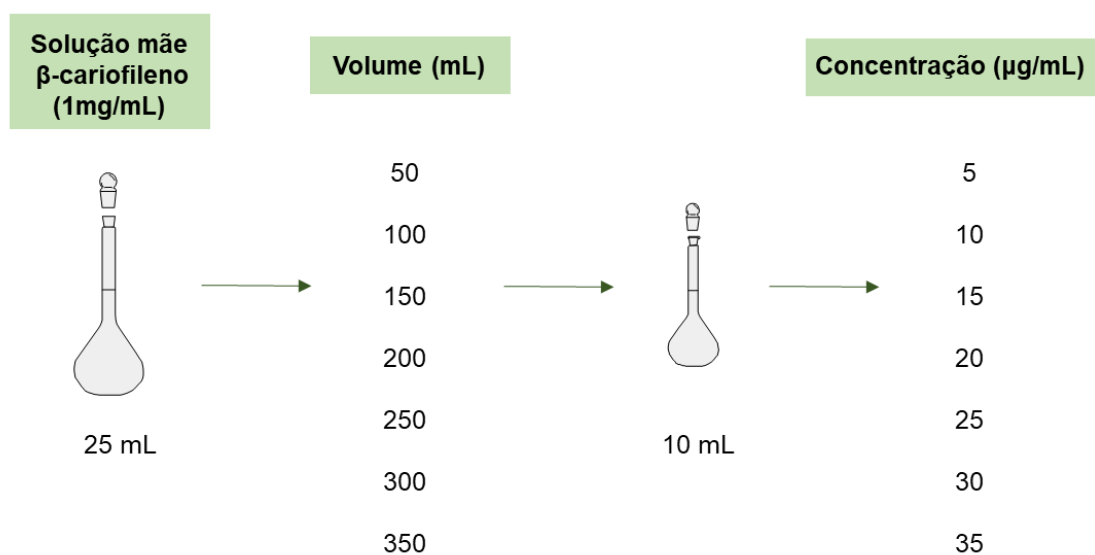
Sanitária (ANVISA) sendo eles linearidade, precisão, exatidão e especificidade (BRASIL, 2017) com o objetivo de garantir a confiabilidade dos dados e que o método previamente desenvolvido (Tabela 5) atende as especificações das aplicações analíticas.

Tabela 5. Parâmetros do método analítico desenvolvido por CLAE para quantificação do β -cariofileno

Parâmetro	Descrições
Coluna	C18 100 mm x 5 mm (NUCLEODUR®)
Deteção	210 nm (Detector de arranjo de diodo)
Fase móvel	acetonitrila:tampão fosfato (1:1)
Fluxo	1,2 mL.min ⁻¹ (Sistema de eluição isocrático)
Tempo de análise	30 min.
Volume injetado	20 mL

As soluções mães do β -cariofileno (1 mg.mL⁻¹) foram preparados em balão volumétrico de 25 mL, tendo como solvente acetona (10 mL) e avolumado com acetonitrila (ACN), já as soluções das amostras foram preparadas em um balão volumétrico de 10 mL em ACN (Figura 8), todas as amostras foram filtradas em membrana de 0,45 μ m antes da injeção. A fase móvel também foi filtrada a vácuo com filtro de 0,2 μ m, tendo a solução tampão de fosfato preparada com fosfato de sódio dihidrogênio, fosfato dipotássico e água milli-Q. Os picos cromatográficos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com o padrão de referência e a quantificação por integração das áreas dos picos.

Figura 8. Preparo das soluções das amostras de β -cariofileno a partir das soluções mães, com suas respectivas concentrações e volume inicial.



A seletividade do método, analisada pelo índice de pureza do pico, foi realizada utilizando uma formulação branca contendo óleo de coco. A solução de 10 mL foi realizada com 200 μL da formulação e injetada em um *vial* com um filtro de 0,22 μm .

A linearidade foi verificada realizando 3 curvas da solução de β -cariofileno, na qual continha sete concentrações ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) distintas (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35). A análise foi feita através da representação gráfica das áreas obtidas em função da concentração da amostra e a avaliação estatística pelo método dos mínimos quadrados.

A precisão foi avaliada considerando a repetibilidade e a precisão intermediária. A repetibilidade foi realizada com sextuplicata do ponto central 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, pelo mesmo operador e dia. Já a precisão intermediária foi realizada preparando 6 amostras do ponto central, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por operador e dia diferentes. Ambas foram analisadas pelo desvio padrão relativo por demonstrar a dispersão dos resultados.

A exatidão que avalia a concordância entre os resultados foi analisada através do teste de recuperação contendo nove pontos. Em balões volumétricos de 10 mL foi adicionado 100 μL da formulação preparada somente com excipientes e acrescidos três diferentes quantidades da solução mãe do β -cariofileno – 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (concentrações baixa, média e alta) e analisadas cada uma das três amostras em triplicatas.

Os cromatogramas foram gerados e analisados pelo software Lcsolution. Tabelas e gráficos foram plotados nos programas Microsoft Word e Excel, respectivamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Preparação dos CLN contendo óleo de copaíba

A técnica de injeção de solventes foi primeiro descrita para partícula lipídicas sólidas por Schubert e Muller-Goymann (2003), usando o gotejamento da fase oleosa sobre a aquosa e requerendo uma etapa de filtração do excesso dos lipídios. A produção de CLN através da técnica de injeção de solventes adaptada por este trabalho resultou em partículas nanométricas monomodais e com PDI abaixo de 0,3. A adaptação consistiu na adição da fase oleosa sob fluxo laminar e não houve necessidade de filtração dos lipídios sólidos, já que as formulações não apresentam grumos característicos do excesso de lipídios sólidos.

Ao realizar o planejamento experimental de superfície de resposta do tipo composto central com as formulações resultou em um experimento completo de 14 ensaios com sextuplicata no ponto central variando as possíveis combinações de proporções de Óleo: Manteiga e Lipídio total: Tensoativos de acordo com os níveis pré-estabelecidos. A escolha dos níveis foi baseada nas proporções usuais dos compostos já utilizados pelo laboratório de Farmacotécnica da Universidade Federal do Rio de Janeiro - Campus Macaé para o preparo de nanopartículas.

O experimento de superfície de resposta foi realizado para avaliar a influência que os fatores podem exercer sobre a estabilidade da formulação. O planejamento experimental estatístico é uma ferramenta importante para o desenvolvimento de novas formulações e vem sendo bastante utilizada para otimização dos processos. Nele tem-se uma produção otimizada, com redução das variabilidades dos fatores influentes, redução do tempo e custos totais do desenvolvimento, além de diminuir as chances de erro (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Às 14 formulações foram preparadas por uma adaptação inovadora da técnica de injeção de solventes e foi realizada em rotaevaporador priorizando a não formação de espuma, para isto houveram pequenas variações em alguns parâmetros, como temperatura de vaporização (°C), pressão mínima alcançada (mbar), temperatura do banho (°C) e tempo de funcionamento (Anexo A), com uma temperatura de banho média de 30-24 °C.

A metodologia utilizada além de possibilitar a não utilização da homogeneização de alta pressão, manuseio fácil e rápido, obteve suspensão de CLN com aspecto leitoso, homogêneo e com coloração branca. A formulação resultante é uma nanoemulsão devido ao estado líquido do lipídio, pela manteiga de tucumã ter um ponto de fusão de 30-32 °C, a partir do momento que o produto é levado ao rotavaporador com temperaturas inferiores a 30 °C ocorre a

recristalização do lipídio, levando à formação de suspensão de CLN, pela mistura de lipídios sólidos e líquidos.

Compostos bioativos derivados de plantas com atividade inseticidas, como azadiractina, timol, eugenol e curcumina já foram encapsulados utilizando sistemas transportadores em escala nano e micro (OLIVEIRA et al., 2014). Publicações de nanopesticidas até o ano de 2013 mostraram formulações já a base de polímeros, nanometais e nanoemulsões (KAH e HOFMANN, 2014). Isso demonstra o mercado crescente e promissor da nanoencapsulação dos extratos vegetais na atividade agrícola. Em um estudo de Vaucher e colaboradores (2015), por exemplo, foi possível demonstrar que a nanoencapsulação de óleos vegetais potencializa seu efeito e diminui a volatilização. No estudo, em específico, nanoemulsões de óleo de copaíba apresentaram concentração mínima inibitórias inferiores quando comparada ao óleo livre.

Dessa forma, a utilização de carreadores lipídicos nanoestruturados no desenvolvimento de formulações com o óleo de copaíba pode ser promissora para diminuição da concentração mínima inibitória e aumento da estabilidade do bioativo.

5.2 Caracterização do CLN

5.2.1 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e pH dos CLN de óleo de copaíba

A estabilidade frente ao tamanho médio das partículas (Tabela 6) demonstra que as formulações 2, 3 e 4 (Anexo B) foram as que não tiveram variações de tamanho superiores a 10 nm e atenderam aos critérios de qualidade do software Zetasizer®. Nenhuma das 14 formulações analisadas apresentaram instabilidades visíveis como separação de fases, sedimentação, cremeagem ou gelificação, porém variações no tamanho de partícula podem ser indicativos de um processo inicial de instabilidades físicas, química ou microbiológica.

Tabela 6. Estabilidade frente ao tamanho de partícula analisados durante 28 dias.

Formulação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Estabilidade (dias)	14	28	28	28	21	21	21	21	7	7	7	14	14	14

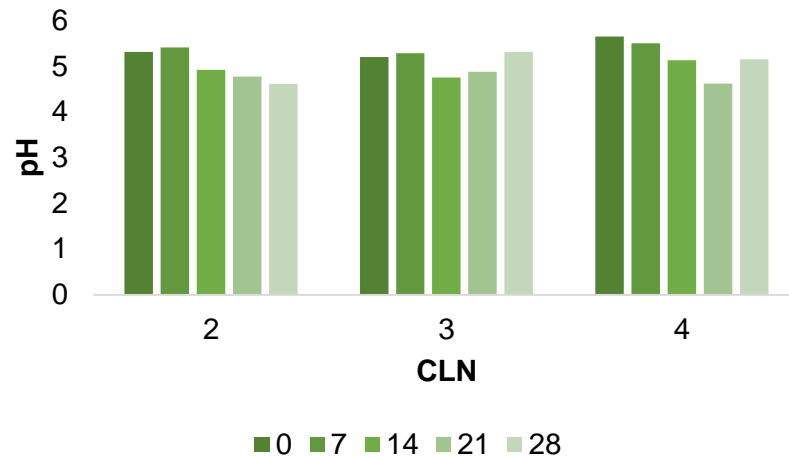
A repetibilidade do planejamento foi acompanhada através da sextuplicata do ponto central (formulações 5, 6, 7, 8, 11 e 12), que ao serem analisadas pode-se observar que das seis

formulações quatro apresentaram uma estabilidade até o 21º dia e duas perderam a estabilidade anteriormente. As formulações consideradas estáveis da sextuplicata apresentaram um tamanho médio de 182,9 nm. As variações de estabilidade em dias obtida demonstra que o planejamento descrito não apresenta uma repetibilidade intermediária, sugerindo que outros parâmetros também podem ser levados em consideração, como por exemplo a diluição das amostras para avaliação do tamanho de partícula. Schubert e Muller-Goymann (2003) em seus estudos da metodologia de injeção de solventes abordam sobre a diluição da amostra até uma concentração de partículas alcançada para evitar a dispersão múltiplas na medição do tamanho de partícula, mostrando um fator que possa ter influenciado nas análises já que as amostras foram diluídas sem uma concentração verificada quanto ao erro no equipamento. Por este motivo uma padronização de diluição para avaliação de tamanho de partículas foi implementada no laboratório de pesquisa farmacotécnica. Foi verificado no laboratório que a concentração de $20 \mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ (200 μL da formulação em 10 mL de água destilada) confere um resultado mais fidedigno para a formulação, diferentes concentrações possibilita um erro no equipamento quanto ao valor da estabilidade (VELLOZO et al., 2019).

Durante os 28 dias de armazenamento pode-se observar pequenas variações do pH. As formulações estáveis apresentaram uma média de pH de 5,0, 5,1 e 5,2 respectivamente. Nota-se que no decorrer do tempo o pH diminui em algum momento para todas as formulações (Figura 9). Cola e colaboradores (2016) no desenvolvimento de CLN demonstrou também uma tendência do pH diminuir ao longo do tempo quando comparado as NLS que demonstram o contrário. As variações podem estar relacionadas a degradação do princípio ativo ou dos constituintes da formulação devido à hidrólise química. O pH relaciona-se aos componentes da formulação, de modo que os estudos da eficiência de encapsulação e o teor do princípio ativo no CLN poderão demonstrar se a diminuição do pH é decorrente da expulsão do óleo da matriz. Estudos relacionados a matriz lipídica sem o ativo também devem ser considerados para comparação dos resultados e avaliação dos demais componentes da CLN.

Alternativamente, contaminação microbiológicas também podem resultar em variação do pH e possível acidificação do meio. Um possível uso de conservante é o imidazolinidil uréia 0,5% (SANTOS et al., 2012) que já foi previamente utilizado em nanopartículas sólidas com manteigas vegetais brasileiras.

Figura 9. pH das formulações estáveis do planejamento experimental durante 28 dias.

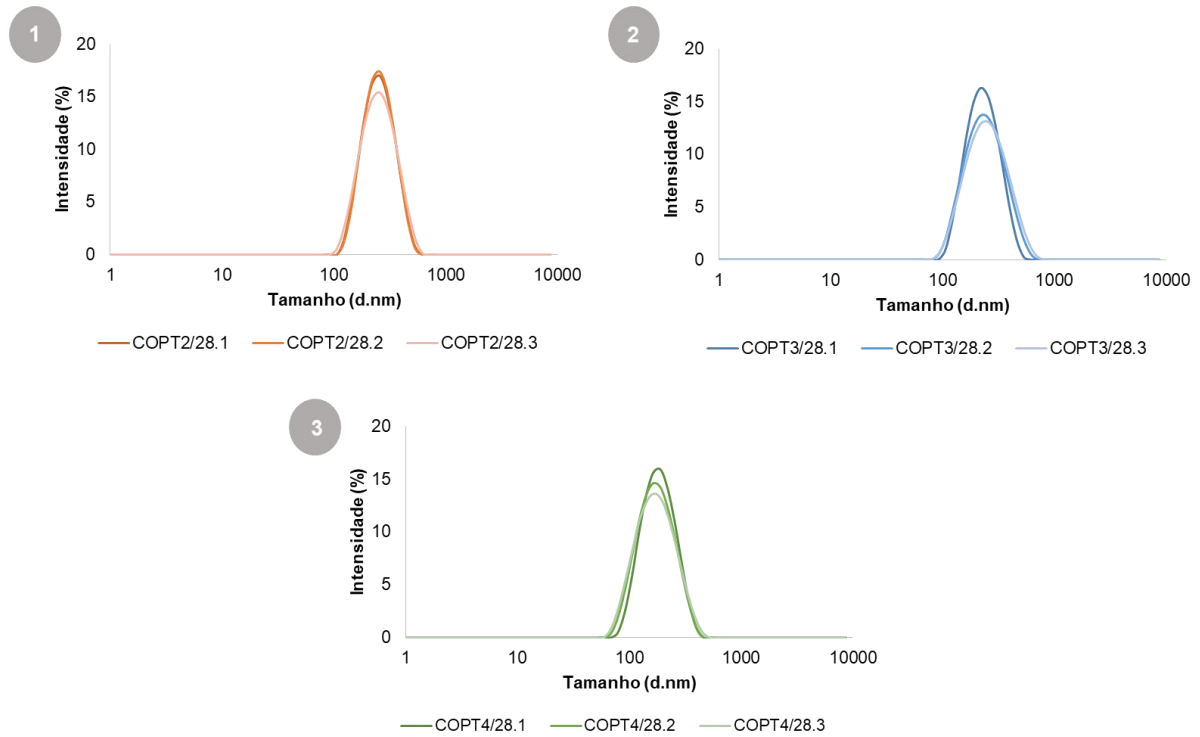


A variação de pH das formulações 2 e 3 foi inferior a 15% e o aspecto visual das três formulações não sofreu alteração nos 28 dias de análise.

Os valores do PDI das formulações estáveis variaram entre 0,09 e 0,3. Esta faixa de valores é comumente encontrada para nanopartículas a base de lipídios (DANAIEI et al., 2018). O índice de polidispersão relaciona-se com a homogeneidade da formulação, ou seja, o modo como se dá a distribuição do tamanho podendo ser monodispersa ou polidispersa. Os valores e gráficos obtidos (Figura 10) mostram sistemas monomodais polidispersos.

Os tamanhos de partículas das três formulações estáveis variou numa faixa de 154- 235 nm. Sena (2016) em seus estudos ao desenvolver CLN a partir da gordura vegetal de murumuru obteve tamanho médio entre 98,60 e 161,56 nm e PDI de 0,115 e 0,276. NLS desenvolvidas com o óleo de copaíba obteve uma formulação otimizada com tamanho médio de $208,0 \pm 2,10$ nm (CARDOSO, 2015), enquanto que nanopartículas contendo azadiractina para ação inseticida no controle de *Plutella xylostella* apresentou um tamanho médio de 245 nm na melhor formulação com PDI de 0,119 (FORIM et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014). CLN desenvolvidas com óleo de copaíba para o carregamento de extrato de *Curcuma longa* por SILVA (2017) apresentaram um diâmetro médio próximo de 200 nm, de modo que as formulações desenvolvidas neste trabalho apresentam valores semelhantes aos descritos na literatura quanto a encapsulação do óleo de copaíba, utilização de manteigas vegetais e a nanoencapsulação de pesticidas botânicos. As CLN apresentam um tamanho de partícula menor comparado as NLS devido a sua composição lipídica líquida e sólida, já que lipídios com o ponto de fusão maior podem elevar o tamanho de partícula (COLA et al., 2016).

Figura 10. Gráfico da distribuição de tamanho de partícula das formulações estáveis 2 (1), 3 (2) e 4 (3) no 28º dia.



Os parâmetros analisados dos CLN são frequentemente determinados para caracterizar sistemas nanométricos, porque estas características irão ter grande influência sobre a estabilidade e eficiência biológica dos ativos, inclusive nas preparações pesticidas (SCHAFFAZICK et al., 2003). Os resultados de tamanho de partícula e PDI demonstraram que a metodologia de preparo, aqui proposta pela primeira vez é adequada para a produção de CLN.

Considerando os fatores de influência levados em consideração no estudo de acordo com o parâmetro de resposta obteve a visualização gráfica da superfície de resposta (Figura 11) de acordo com a equação de regressão (Eq. 1):

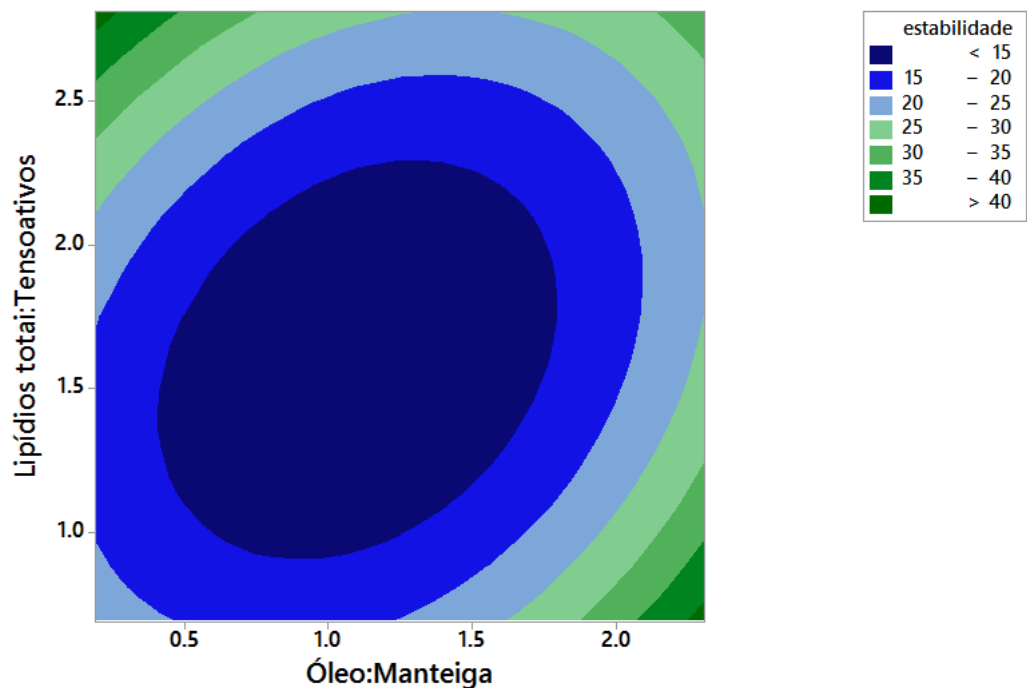
$$\begin{aligned} \text{Estabilidade} = & 40.3 - 14.00 \text{ Óleo: Manteiga} - \\ & 28.0 \text{ Lipídios totais: Tenssoativos} + 10.89 \text{ Óleo: Manteiga} \times \text{Óleo: Manteiga} + \\ & 10.89 \text{ Lipídios totais: Tenssoativos} \times \text{Lipídios totais: Tenssoativos} - \\ & 6.22 \text{ Óleo: Manteiga} \times \text{Lipídios totais: Tenssoativos} \text{ (Equação 1)} \end{aligned}$$

que considera todos os ensaios e interações e descreve o comportamento das variáveis frente ao parâmetro de resposta. O R^2 do modelo foi de 80, 65%.

A análise da variância do modelo quadrado demonstra que as proporções Óleo: Manteiga x Óleo: Manteiga e Lipídios totais: Tensoativos x Lipídios totais: Tensoativos apresentam uma interação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na faixa de concentração estudada. Isto significa que existe uma correlação não linear entre as variáveis e a resposta (estabilidade quanto ao tamanho em dias).

Figura 11. Gráfico de contorno da influência das proporções de Lipídios totais:Tensoativos e Óleo:Manteiga sobre a estabilidade em dias da formulação.

Gráfico de Contorno de estabilidade versus Tensoativos, Lipídeos



O gráfico de contorno mostra três possíveis zonas de estabilidade, em verde escuro. CLN com baixas concentrações de tensoativos são estabilizadas por uma maior concentração de lipídio sólido (manteiga) e CLN com maiores concentrações de lipídio líquido (óleo) são estabilizadas por maiores concentrações de tensoativos ou lipídios totais.

Os sistemas coloidais podem apresentar instabilidades proveniente da tensão superficial, tensão interfacial ou pela viscosidade do sistema e por isso contam com um agente emulsificante, espessante da fase aquosa, espessante da fase oleosa e umectantes. O uso dos agentes emulsificantes diminui a força da tensão interfacial e superficial, enquanto os espessantes aumentam a viscosidade das fases aumentando a estabilidade físico-química do sistema e evitando os processos de cremeagem, agregação e coalescência. Por isto, as suas proporções estão intimamente ligadas a estabilidade da formulação (ANSEL et al., 2013).

O aumento da proporção de lipídio sólido no CLN torna a fase dispersa mais espessa, pelo lipídio sólido agir como um espessante da fase oleosa. Essa viscosidade interna aumentada induz maior estabilidade por evitar o processo de coalescência (ANSEL et al., 2013).

Os tensoativos são substâncias que reduzem a resistência entre fases e facilitam a fragmentação em partículas menores por reduzir a tensão superficial e interfacial e com isso diminuem a tendência dos líquidos de agregar ou coalescer (ANSEL et al., 2013). Isto se dá pela sua capacidade de interação entre as fases e por isso a mistura de tensoativos é uma estratégia comum, como realizado neste estudo, que usou dois tensoativos diferentes considerando os valores do equilíbrio hidrófilo lipofílico (EHL).

A região de estabilidade do gráfico de contorno com maior concentração de lipídio líquido e lipídios totais foi inesperada. Possivelmente o aumento da proporção do óleo de copaíba promove um aumento de estabilidade devido à sua própria composição. O óleo de copaíba em específico pode conter substâncias influenciando na estabilidade do sistema.

A análise estatística do software permite verificar a influência dos fatores e ter um otimizador de resposta, ou seja, determinar condições ótimas da formulação considerando o parâmetro de resposta das condições estudadas. Nesse processo busca-se a melhor proporção considerando a maior estabilidade por tempo em dias. A estabilidade é requerida por orientar um desenvolvimento adequado, fornecer informações para a otimização das formulações, contribuir para o monitoramento da formulação, e assim propiciar uma maior eficácia dos pesticidas. O otimizador de resposta maximizando a estabilidade para ter uma formulação otimizada frente a estabilidade em dias obteve CLN otimizado com proporções de Óleo:Manteiga 2,3107 e Lipídios totais:Tensoativos 0,6893 ($d=1,0$) e uma estabilidade máxima de 42 dias ($d=1,0$).

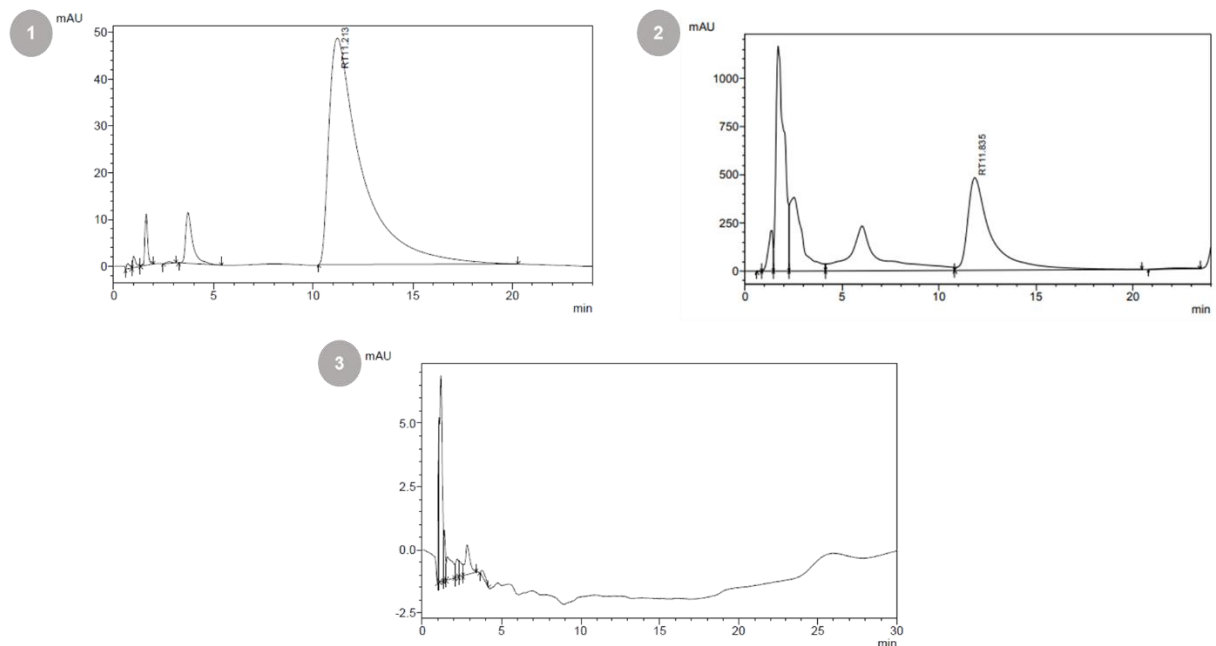
A condição ótima predita do CLN demonstra uma proporção que não foi realizada, de modo que seja necessário uma validação da otimização para assegurar sua confiabilidade de estabilidade em dias. O CLN otimizado apresenta uma maior proporção de óleo que será estabilizado por uma proporção maior de tensoativos. Um aspecto bastante positivo deste resultado é que de acordo com o planejamento experimental a formulação otimizada apresenta uma carga alta de óleo de copaíba, que é o ingrediente ativo.

5.3 Validação do método analítico para quantificar o marcador β -cariofileno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

5.3.1 Seletividade

A seletividade mostra a capacidade do método em identificar o analito de interesse na presença de interferentes, ou seja, deve demonstrar que os demais componentes da CLN não interferem no pico do β -cariofileno. Os cromatogramas obtidos (Figura 12) demonstram o pico do β -cariofileno em seu padrão a partir de 10 min., a presença do mesmo pico no óleo de copaíba utilizado e a ausência de pico na formulação branca. A não absorção em 210 nm, comprimento de onda onde o analito é absorvido, demonstra que o método é específico para o óleo de copaíba na formulação independente dos excipientes.

Figura 12. Cromatograma do padrão β -cariofileno em 210 nm (1). Cromatograma do óleo de copaíba em 210 nm (2). Cromatograma da formulação branca para seletividade do método analítico em 210 nm (3).

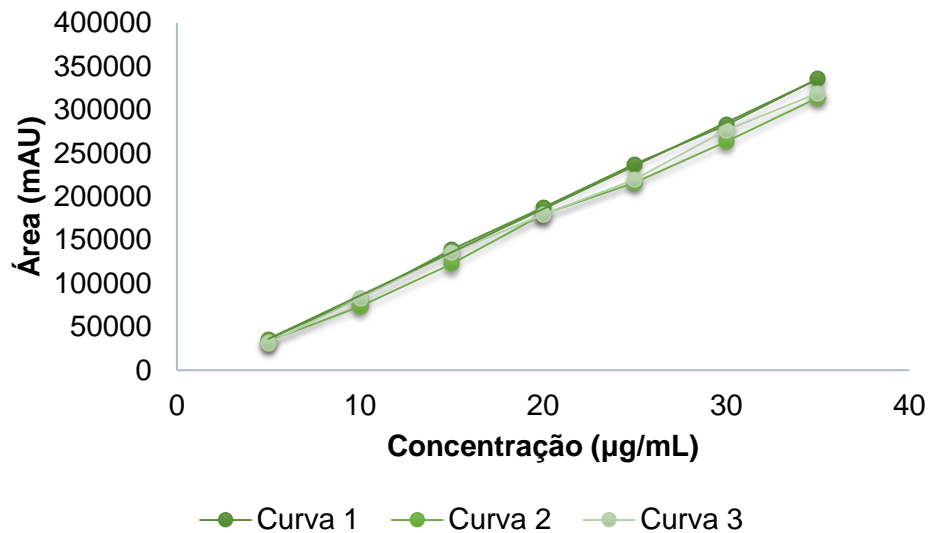


6.3.2 Linearidade

A linearidade demonstra a capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais as concentrações do analito na amostra. Essa análise é feita pela elaboração da curva analítica e análise estatística da regressão linear. A curva analítica teve suas

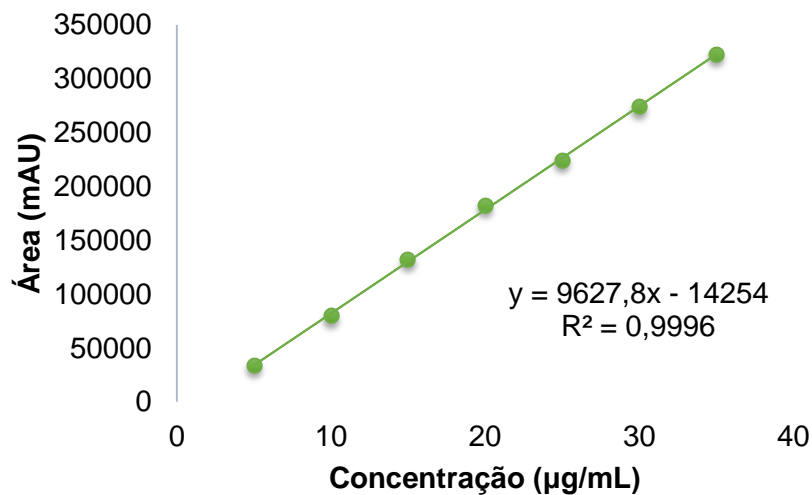
concentrações variando entre 5-35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e suas respectivas áreas foram compiladas pela análise por CLAE (Figura 13).

Figura 13. Gráfico de linearidade das áreas dos picos obtidos em triplicata pela análise por CLAE das respectivas concentrações da curva analítica.



A faixa de concentração média analisada obteve um coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9996 (Figura 14) com coeficiente angular (a) médio de 9627,8 e coeficiente de linearidade (b) médio de 14254,3. Assim o método demonstrou ser linear por apresentar um $R^2 > 0,990$, como preconizado pela ANVISA.

Figura 14. Curva de calibração média da linearidade e sua equação da reta.



6.3.3 Precisão

A precisão verifica a proximidade dos resultados através da repetibilidade e precisão intermediária. Na repetibilidade preparou seis amostras iguais com o mesmo analista e mesmas condições experimentais (Tabela 7). Na precisão intermediária preparou as amostras variando o dia o e analista (Tabela 8). Os valores apresentado pelo desvio padrão relativo encontram-se próximos ou abaixo de 3%.

Tabela 7. Reprodutibilidade do método analítico para doseamento de β -cariofileno na amostra.

Análise	Concentração experimental	Área	Concentração
1	20	179631	20,1
2	20	170498	19,2
3	20	187273	20,9
4	20	185539	20,8
5	20	179097	20,1
6	20	189436	21,2
Concentração média			20,4
Desvio padrão			0,72
Desvio padrão relativo (%)			3,54

Tabela 8. Precisão intermediária do método analítico para doseamento de β -cariofileno na amostra

Análise	Concentração experimental	Área	Concentração
1	20	189065	21,1
2	20	180739	20,3
3	20	180573	20,2
4	20	187273	20,9
5	20	185539	20,8
6	20	179097	20,1
Concentração média			20,6
Desvio padrão			0,43
Desvio padrão relativo (%)			2,08

6.3.4 Exatidão

A exatidão (Tabela 9) analisa a concordância de três concentrações distintas com seu valor dito verdadeiro. As concentrações preparadas devem ser consideradas baixa, média e alta.

Na validação as concentrações foram de 15, 20 e 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com uma recuperação média percentual variando entre 100,6 - 103,2% mostrando ser um método exato.

Tabela 9. Determinação da exatidão da amostra

[C] experimental	Área	[C]	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
15	137262	15,74	104,92	
15	129811	14,96	99,76	100,66
15	126179	14,6	97,31	
20	182509	20,44	102,19	
20	179920	20,17	100,85	100,65
20	176197	19,78	98,91	
30	290301	31,63	105,45	
30	278193	30,38	101,26	103,25
30	283326	30,91	103,03	

A validação do método descrito por Borges mostrou-se aplicável para quantificação do β -cariofileno, marcador específico do óleo de copaíba utilizado. Esse controle é importante já que o β -cariofileno é um dos componentes principais responsáveis pelas ações descritas do óleo, inclusive no setor agrícola. Através da validação do método será possível realizar a quantificação do teor do β -cariofileno na formulação e eficiência de encapsulação que são fatores importantes para caracterização do sistema. Outras formas de quantificação também são descritas na literatura como a cromatografia gasosa e por espectrofotometria no UV-Vis (MEYAGUSKU, 2014; CARDOSO, 2015).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos com o trabalho permitem concluir que foi possível obter CLN com tamanho e PDI adequado, pela técnica de injeção de solvente adaptada. Essa técnica por ser de fácil manuseio e maior acessibilidade, possibilita a futura continuidade e produção de pesquisa de base, ou seja, comprovação de conceitos sem a necessidade de aquisição de equipamentos.

O planejamento experimental foi de grande relevância para o desenvolvimento da formulação e determinação de condições ótimas de acordo com os fatores analisados.

A análise estática da influência das proporções dos componentes da formulação no tamanho de partícula em dias possibilitou escolher e prever uma formulação otimizada, que apresentasse de forma mais adequada para o objetivo proposto – desenvolver CLN de óleo de copaíba com maior estabilidade em dias. A formulação otimizada possivelmente apresentará 42 dias máximos de estabilidade com uma concentração de lipídio líquido maior que lipídio sólido, o que será possível e estável por ter uma concentração desejável de tensoativos.

A validação do método analítico para quantificar o marcador β -cariofileno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) mostrou-se reprodutível, específica, linear e exata, o que é de suma importância para continuidade dos estudos referente ao teor do β -cariofileno e eficiência de encapsulação do CLN.

7 PERSPECTIVAS

7.1 Determinação do teor e eficiência de encapsulação dos CLN contendo óleo de copaíba usando o β -cariofileno como marcador

7.1.1 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação dos CLN contendo óleo de copaíba será analisada pelo método de ultrafiltração/centrifugação, que se baseia em submeter a formulação de CLN à centrifugação em dispositivos de ultrafiltração constituídos de celulose regenerada de 10kDa (Microcon - Millipore ®) e quantificar o ultrafiltrado por CLAE (COLA et al, 2016). A eficiência de retenção (% ER) será estabelecida pela equação (Eq. 2).

$$\%ER = A \div B \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

onde, A corresponde a quantidade do óleo de copaíba encapsulado nas partículas e B a quantidade total inicial do óleo de copaíba adicionado às formulações de CLN.

No processo de centrifugação irá colocar 2 mL da CLN otimizada em 3 *falcons* para realização em triplicata e levar para centrífuga com rotação de 2000rpm, tempo de 5 min. e aceleração de 80rpm/s² em 4 ciclos. O ultrafiltrado então será quantificado por CLAE. O processo descrito já foi testado e resultou um volume de filtrado suficiente para a análise sem rompimento de membrana.

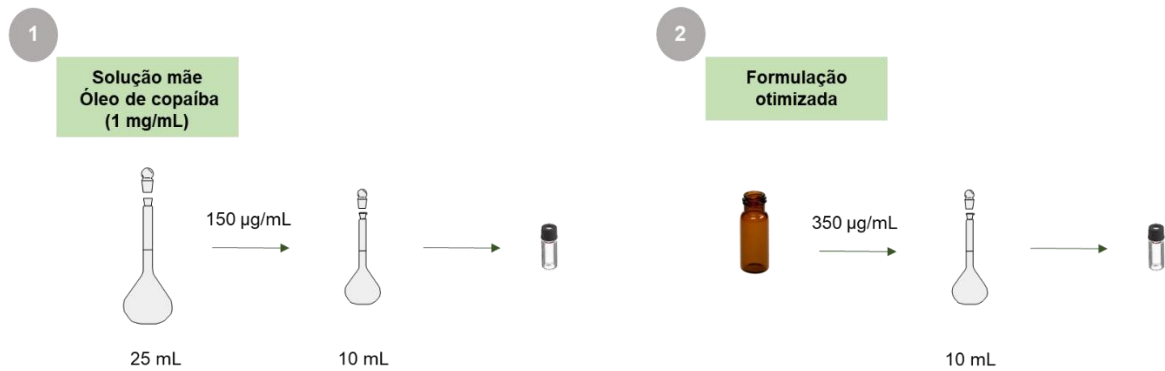
7.1.2 Teor do β -cariofileno

O teor de β -cariofileno do óleo de copaíba presente no CLN será determinado por CLAE. Para isto, serão preparadas as soluções mães do óleo puro e da formulação. A solução mãe do óleo de copaíba terá uma concentração igual a 1 mg.mL⁻¹ e será realizada em um balão volumétrico de 25 mL com 10 mL de acetona e avolumado com ACN, em uma balão de 10mL será pipetado 150 μ L. A solução da formulação será feita a partir da CLN de óleo de copaíba pipetando 350 μ L. As soluções das amostras serão preparadas em triplicata e injetadas em *vials* com um filtro de 0,22 μ m e o teor calculado através da equação da reta obtida na linearidade (Figura 15).

Com a metodologia por CLAE obterá os cromatogramas da amostra do óleo de copaíba puro e da formulação do óleo de copaíba com seus respectivos valores de tempo de retenção e

área. Com a equação da reta obtida na linearidade e as respectivas áreas obterá o teor do β -cariofileno na formulação.

Figura 15. Teor do β -cariofileno no óleo de copaíba (1) e na formulação otimizada (2).



7.2 Validação da otimização obtida

Para validar a equação gerada pelo software Minitab® Statistical Software a partir do planejamento experimental de superfície de resposta será realizada pelo preparo em triplicata da formulação com a proporção de Óleo:Manteiga 2,3107 e Lipídios totais:Tensoativos 0,6893 através da metodologia adaptada de injeção de solventes desenvolvida neste projeto e será analisada por 42 dias para confiabilidade e reprodutibilidade da estabilidade mínima predita.

7.3 Avaliação da capacidade de inibição alimentar do óleo de copaíba e da formulação usando a técnica do disco de wafer de trigo

Para avaliação da capacidade de inibição alimentar será utilizada a metodologia do teste de wafer de trigo (XIE et al, 1996). Serão preparados como substrato para o *T. castaneum* discos de wafers de trigo em um béquer de 5 mL, contendo 1 mL de água e 200 mg de farinha de trigo, que serão assados em moldes a 80 °C.

Após o preparo, os discos e os insetos serão pesados e fotografados, para posterior avaliação da mortalidade e índice de inibição alimentar, no inglês, *antifeedant index* (AFI) – que é uma medida percentual de peso consumido do disco de *wafer* tratado em comparação com o não tratado.

O biensaio será analisado durante 3 dias através da deposição em placas de petri dos discos de *wafers* que serão tratados com a formulação, óleo de copaíba e solventes para solubilização e *T. castaneum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEYEMI, M. M. et al. Antifeedant Activity of Quercetin Isolated from the Stem Bark of *Bobgunnia madagascariensis* (Desv.) J.H.Kirkbr & Wiersema. (Caesalpiniaceae). **Australian Journal of Basic and Applied Sciences** v.4, 2010, p. 3342-3346.
- ANSEL, H. C.; ALLEN, L. V. Jr.; POPOVICH, N. G. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. Revisão técnica: Elenara Lemos-Senna. 9. ed. Dados eletrônicos. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- ARUNDEL, A.; PATEL, P.; SIRILLI, G.; SMITH, K. The Future of Innovation Measurement in Europe: Concepts, Problems and Practical Directions. STEP Group OSLO, **IDEA Paper Series** n. 3, 1997.
- INTERFARMA. Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa. **Guia 2019**, Brasil, 2019.
- BARBOSA, F. S. et al. Medicinal plant extracts on the control of *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 1, p. 142-149, jan./mar. 2013.
- BORGES, V. R. A. et al. Development of a high performance liquid chromatography method for quantification of isomers, caryophyllene and, humulene incopaiba oleoresin using the Box-Behnken design. **Journal of chromatography B**. 940. p. 35-41. 2013.
- BRASIL. **Lei nº 7802 de 1989**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1989.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agrotóxicos na ótica do Sistema Único de Saúde. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. Brasília, 2018.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Resolução RDC n.º 166 de 24 de julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2017.
- CALADO, V.; MOTGOMERY, D. C. **Planejamento de Experimentos usando Statistica**. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003, p. 260.
- CARDOSO, A. C. A. **Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas contendo óleo de copaíba (*Copaifera spp.*) e avaliação da atividade cicatrizante in vivo**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Fluminense, 2015.
- COITINHO, R. L. B. D. C. et al. Atividade inseticida de óleos vegetais sobre *Sitophilus zeamais* mots. (Coleoptera: Curculionidae) em milho armazenado. **Revista Caatinga**, Mossoró, p. 176-182, Jun. 2006.

COLA, D. F. et al. Sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados para ivermectina e metopreno visando controle de parasitas. **Química Nova**, v. 39, n. 9, p. 1034-1043, 2016.

COLOMÉ, L. M. et al. Theospheres based on theobroma grandiflorum seed butter: development of innovative nanoparticles for skin application. **Soft Materials**, 8:2, 72-88. 2010.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira grãos**. v. 7, n. 4, p. 1-25. Brasília: Conab, Janeiro 2020.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Insecticidal activities of plants and applications: A review. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 500–506, 2011.

DANAEI et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**. v. 10, n. 57, 2018.

DAUDT, Renata M. et al. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 65, n. 3, p. 28-31, Julho 2013.

DIALETACHI, E. L. G. Espalhamento dinâmico de luz em sistemas coloidais diluídos. Dissertação (Mestre em Ciências). Universidade de São Paulo, 2017.

DONG, Y., NG, W. K., SHEN, S., KIM, S. e TAN, R. B. H. (2012). Nanopartículas lipídicas sólidas: Produção contínua e potencial de nanoprecipitações em larga escala em misturadores estáticos. Colóides e superfícies B: **Biointerfaces**, 94, 68–72, 2012.

FLORÃO, A. et al. Fosfina: Riscos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 15185192, p. 101–107, 2004.

FONSECA, M. C. M. et al. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais sem controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 45-50, Mar. 2015.

FORIM, M. R. et al. Development of a new method to prepare nano-/microparticles loaded with extracts of *Azadirachta indica*, their characterization and use in controlling *Plutella xylostella*. *Journal of Agric Food Chemistry* 2013.

FREIRE, D. da C. B.; BRITO-FILHA, C. R. da 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 Amazonica**, Manaus, v. 36, n. 3, p. 365-368, jul./set. 2006.

FRIDLENDER, M., KAPULNIK, Y., KOLTAL, H., 2015. Plant derived substances with anti-cancer activity: from folklore to practice. **Frontiers in Plant Science**, Outubro, 2015.

GUIMARÃES, K.; RÉ, M. I.; Lipid Nanoparticles as Carriers for Cosmetic Ingredients: The First (SLN) and the Second Generation (CLN). In: BECK, R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A.; Nanocosmetics and Nanomedicines: **New Approaches for Skin Care**. Springer, 2011, Capítulo 5, p. 101-122.

HUANG, Y. et al. Toxic and antifeedant action of nutmeg oil against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. **Journal of Stored Products Research**, v. 33, n. 4, p. 289–298, 1997.

INCA. **Agrotóxicos**. 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/alimentacao/agrotoxicos>>. Acessado em: 02 ago. 2019.

KAH, M.; HOFMANN, T. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. **Environment International**, 63, 224–235, 2014.

KOUL, O. Phytochemicals and insect control: An antifeedant approach. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 27, n. 1, p. 1–24, 2008.

LEITE, C. **Copaíba, o balsámo da floresta**. Secretária de Infraestrutura e Meio Ambiente. 2016.

LORINI, I., et al. **Manejo integrado de pragas de grãos e sementes armazenadas**. Brasília. Embrapa, 2015., p. 84.

MACIEL, F. C. Ação de óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* e *Thymus vulgaris* sobre *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* em laboratório. **IOSR Journal of Economics and Finance**, v. 3, n. 1, p. 56, 2016.

MELO, B. A. D., et al. Atividade inseticida do óleo de *Copaifera langsdorffii* Desf. (copaiba) sobre *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v. 20, n. 4, p. 419-428. 2015.

MEYAGUSKU, V. M. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas contendo ciprofloxacino**. Dissertação (Mestrado). Universidade do Estado de São Paulo – Júlio de Mesquita Filho (UNESP), 2014.

MORAIS, L. R. B.; GUTJAHR, E. **Química de Oleaginosas: Valorização da Biodiversidade Amazônica**, Ed. Do Autor. Belém, PA. 2009.

MORETTI, M. D. L., et al. Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. **AAPS PharmSciTech**, v. 3, n. 2, p. 64-74, 2002.

MULLER, R. H; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 50. p. 161-177. 2000.

NETO-GOBBO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, Ribeirão Preto – SP, v. 30, n. 2, 374-381, 2007.

NGUYEN, H. M. et al. Enhanced payload and photo-protection for pesticides using nanostructured lipid carriers with corn oil as liquid lipid. **Journal of Microencapsulation**, South Korea, p. 596-604, 13 fev. 2012.

OLIVEIRA, J. L. D. et al. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1550 – 1561, 2014.

ORTEGA, A. M. M.; CAMPOS, M. R. S. Plantas medicinais e seus metabólitos bioativos na prevenção e tratamento do câncer. **Compostos bioativos**. p. 85-109, 2019.

PACHECO, C. C. **Desenvolvimento de nanocápsulas contendo óleo de *Copaifera reticulata* Ducke**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus – AM, 2014.

PACHECO, I. A.; PAULA, D. C. **Insetos de grãos armazenados: identificação e biologia**. 1 ed. Campinas: Fundação Cargill, 1995. 228p.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R.H; Lipid Nanoparticles (SLN, NCL) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 170 – 184, 2009.

PAVELA, R. History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects: a review. **Plant Protec. Sci.**, v. 52, n. 4: 229-241. 2016.

PETERSON, C.; COATS, J. Insect repellents – past, present and future. **Pesticide Outlook**, v. 4, n.12, p. 154-158, 2001.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.

PIRES, E. V.; CARVALHO, C. M. de. Uma visão geral sobre *antifeedants* em insetos. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 19, n.º. 1, Jan/Jun, 2017.

PONTES, C. E. C. Patentes de medicamentos e a indústria farmacêutica nacional: Estudo dos depósitos feitos no Brasil. **Revista produção e desenvolvimento**. v. 3, n. 2, p. 38-51. Agosto, 2017.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils **Industrial Crops and Products**. p. 250-264. 2014.

REN, X. W., et al. Application of pharmaceutical preparation technology in pesticide formulations based on patent analysis. v. 35. 2015.

RICHARDS S. et al. 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature** 452: 949–955.

ROMERO, A. L. **Contribuição ao conhecimento químico do óleo-resina de copaíba: configuração absoluta de terpenos**. 2007. 222 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2007.

- SÂMIA, R. R. et al. Efeito de Extratos de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae : Caesalpinoideae) Sobre Diferentes Características Biológicas de *Spodoptera frugiperda* (J . E . Smith). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 3423–3426, 2009.
- SANDILYAN, S.; CIE, V. K. The other sides of invasive alien plants of India-With special reference to medicinal values. **J. Nat. Conserv.** 2016, 31:16-21.
- SANTOS, A. C. V. Plantas inseticidas ocorrentes na amazônia como alternativa de controle de *Spodoptera frugiperda* e *Sitophilus zeamais*. Dissertação (Mestrada em Agronomia). Universidade Federal do Acre. Rio Branco - AC. 2014.
- SANTOS, D. Y. A. C. Botânica aplicada: Metabólitos secundários na interação planta-ambiente. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2015.
- SANTOS et al. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas destinadas à aplicação tópica de dapsona. **Química Nova**. v. 35, n. 7, 1388-1394. 2012.
- SCHAFFAZICK, S. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
- SCHUBERT, M. A.; MULLER-GOYMANN, C. C. Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles - evaluation of the method and process parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 55, 125-131. 2003.
- SENA, L. W. P. **Obtenção e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados a partir de gordura vegetal de murumuru (*astrocaryum murumuru mart*)**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.
- SILVA, D. A. da; IMAMURA, P. M.; ROMERO, A. L. Atividade inseticida de óleosresina de copaíba sobre adultos de *Ulomoides* (=Palembo) dermestoides. In: ENCONTRO DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, 07, 2012, Campo Mourão, Paraná. Anais eletrônicos. Campo Mourão: Núcleo de Pesquisa Multidisciplinar, 2012. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/2475030-Atividade-inseticida-de-oleos-resina-de-copaiba-sobre-adultos-de-ulomoides-palembo-dermestoides.html>>. Acessado em 13 de Agosto de 2020.
- SILVA, J. C. **Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados como sistema de transporte de extrato de *Curcuma longa* e avaliação biológica *in vitro* em células de câncer de bexiga**. Dissertação (Mestre em Ciências). Universidade de São Paulo. p. 114. Ribeirão Preto, 2017.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. UFRGS: Porto Alegre, 2004.
- SOUTO, E. B. et al. Nanopartículas de lipídios sólidos: Métodos Clássicos de Produção Laboratorial. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1762–1769, 2011.
- SOUZA, I. J. O., et al. A diversidade da flora brasileira no desenvolvimento de recursos de saúde. **Revista UNINGÁ Review**. Vol 31, n. 1, p. 32-39. Jul-Set, 2017.

SWANTON, C. J., *et al.* Similarities between the discovery and regulation of pharmaceuticals and pesticides: in support or a better understanding of the risks and benefits of each. **Society of Chemical Industry**. p. 790-797. 2011.

VAUCHER, R. D. A. *et al.* Antimicrobial activity of nanostructured Amazonian oils against *Paenibacillus* species and their toxicity on larvae and adult worker bees. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 18, n. 2, p. 205–210, 2015.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C. O Gênero *Copaifera* L. **Química nova**, v. 25, n. 2, p. 273-86, 2002.

VELLOZO, O. C. *et al.* Influência da concentração de partículas na determinação da distribuição de tamanho usando espalhamento de luz dinâmico. SEMANA DE INTEGRAÇÃO ACADÊMICA DA UFRJ. p. 243, 2019.

VIEIRA, V. M. M.; OHAYLON, P. Inovação em fármacos e medicamentos: estado-da-arte no Brasil e políticas de P&D. **Economia & Gestão – PUC MINAS**, Belo Horizonte, v. 6, n. 13, 2008.

XIE *et al.* A rapid and simple flour-disk bioassay for testing substances active against stored-product insects. **Can. Entomol.** 1996, 128, 865-875.

YAMAGUCHI, M. H.; GARCIA, R. F. Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: Revisão Bibliográfica. **Revista Saúde e Pesquisa**, 2012.

ZUIM, V. *et al.* Efeito do óleo-resina de copaíba sobre a mosca minadora *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae). **Enciclopédia biosfera**, v. 9, p. 2721–2728, 2013.

ANEXO A – Condições do rotaevaporador nas 14 formulações do planejamento experimental.

Formulação	Temperatura de vaporização (°C)	Pressão mínima alcançada (mbar)	Temperatura de banho (°C)	Tempo de funcionamento (min.)
1	21-17	20	32-23	100
2	22-19	18	32-24	70
3	24-20	20	31-25	60
4	24-20	19	35-25	80
5	24-19	18	35-27	50
6	21-19	17	27-24	50
7	22-20	17	35-26	50
8	21-18	13	29-24	50
9	22-18	12	30-26	40
10	21-17	12	28-24	40
11	21-17	12	28-16	50
12	21-18	13	27-25	45
13	21-18	13	28-25	50
14	21-18	12	29-26	50

ANEXO B - Tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e pH das 14 formulações analisadas durante 28 dias.

Formulação		Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Critério de estabilidade
1	Tamanho (nm)	153,1 ± 3,109	153 ± 1,473	144,2 ± 2,501	141,3 ± 2,023	140,5 ± 1,007	Variação > 10 nm
	PDI	0,126 ± 0,004	0,114 ± 0,014	0,112 ± 0,02	0,117 ± 0,021	0,107 ± 0,014	
	pH	6,41	5,41	4,94	5,28	4,6	
2	Tamanho (nm)	234,2 ± 4,689	235,4 ± 4,729	231,2 ± 2,219	234,9 ± 3,889	235,2 ± 1,664	Atende os critérios de qualidade
	PDI	0,120 ± 0,002	0,090 ± 0,028	0,131 ± 0,019	0,118 ± 0,020	0,332 ± 0,023	
	pH	5,31	5,41	4,92	4,77	4,61	
3	Tamanho (nm)	223,5 ± 3,650	223,1 ± 3,318	221,2 ± 1,890	221,8 ± 1,803	217,5 ± 5,260	Atende os critérios de qualidade
	PDI	0,152 ± 0,025	0,134 ± 0,023	0,162 ± 0,017	0,140 ± 0,023	0,135 ± 0,021	
	pH	5,2	5,28	4,75	4,88	5,31	
4	Tamanho (nm)	157,2 ± 2,307	157 ± 2,946	154,3 ± 1,873	154,8 ± 1,380	159,8 ± 4,122	Atende os critérios de qualidade
	PDI	0,145 ± 0,002	0,143 ± 0,023	0,157 ± 0,022	0,139 ± 0,006	0,133 ± 0,008	
	pH	5,65	5,5	5,13	4,62	5,15	
5	Tamanho (nm)	176,7 ± 0,808	178,5 ± 2,403	172 ± 2,318	174,5 ± 0,6110	177,6 ± 4,782	Não atende os critérios de qualidade do software Zetasizer®
	PDI	0,133 ± 0,008	0,144 ± 0,006	0,191 ± 0,011	0,140 ± 0,011	0,127 ± 0,018	
	pH	5,26	5,41	5,43	5,29	4,79	
6	Tamanho (nm)	187,5 ± 0,8327	189,3 ± 1,332	186,6 ± 1,097	183,8 ± 3,288	129 ± 1,601	Variação > 10 nm
	PDI	0,118 ± 0,012	0,133 ± 0,032	0,132 ± 0,006	0,125 ± 0,011	0,073 ± 0,057	
	pH	5,65	5,54	5,19	4,74	4,71	
7	Tamanho (nm)	184,3 ± 2,203	181,9 ± 2,684	186,1 ± 2,597	180,1 ± 2,434	130,7 ± 1,305	Variação > 10 nm
	PDI	0,113 ± 0,014	0,101 ± 0,021	0,124 ± 0,019	0,117 ± 0,031	0,142 ± 0,027	
	pH	5,65	5,58	5,66	5,43	5,2	
8	Tamanho (nm)	185,7 ± 2,146	183,3 ± 1,474	185,8 ± 1,601	182 ± 0,5132	2127 ± 813,2	Variação > 10 nm
	PDI	0,120 ± 0,014	0,129 ± 0,031	0,1 ± 0,015	0,137 ± 0,030	0,791 ± 0,232	
	pH	5,82	5,84	5,4	5,23	5,58	

9	Tamanho (nm)	122 ± 2,443	122,2 ± 0,8185	125 ± 4,536	123,9 ± 2,458	107,9 ± 1,650	Não atende os critérios de qualidade do software Zetasizer®
	PDI	0,119 ± 0,013	0,135 ± 0,009	0,125 ± 0,027	0,142 ± 0,007	0,133 ± 0,009	
	pH	5,92	5,8	4,81	4,43	4,32	
10	Tamanho (nm)	214,7 ± 0,8505	213,3 ± 2,255	220,5 ± 8,238	251,4 ± 1,277	193,8 ± 2,290	Não atende os critérios de qualidade do software Zetasizer®
	PDI	0,115 ± 0,013	0,114 ± 0,031	0,082 ± 0,032	0,121 ± 0,016	0,109 ± 0,021	
	pH	5,55	5,59	5,35	5,43	5,15	
11	Tamanho (nm)	180,2 ± 2,318	182,5 ± 1,498	185,8 ± 5,408	179,8 ± 0,6245	177,6 ± 1,250	Não atende os critérios de qualidade do software Zetasizer®
	PDI	0,108 ± 0,037	0,134 ± 0,008	0,128 ± 0,010	0,109 ± 0,039	0,121 ± 0,034	
	pH	5,71	5,76	5,15	6,01	6,23	
12	Tamanho (nm)	186,3 ± 1,637	189,5 ± 3,808	185,9 ± 2,517	133,3 ± 6,504	134,2 ± 3,053	Não atende os critérios de qualidade do software Zetasizer®
	PDI	0,120 ± 0,018	0,090 ± 0,028	0,141 ± 0,018	0,587 ± 0,094	0,113 ± 0,063	
	pH	5,63	5,63	4,96	4,98	5,15	
13	Tamanho (nm)	203,8 ± 2,344	207,6 ± 4,951	204,4 ± 2,470	120,3 ± 0,6	124 ± 10,91	Não atende os critérios de qualidade do software Zetasizer®
	PDI	0,137 ± 0,037	0,152 ± 0,021	0,122 ± 0,017	0,381 ± 0,032	0,180 ± 0,568	
	pH	5,26	5,72	5,54	5,26	5,49	
14	Tamanho (nm)	177,6 ± 1,102	185 ± 4,007	181,6 ± 1,353	285,5 ± 1,589	133,4 ± 1,868	Não atende os critérios de qualidade do software Zetasizer®
	PDI	0,133 ± 0,012	0,134 ± 0,009	0,121 ± 0,031	0,926 ± 0,063	0,121 ± 0,020	
	pH	5,73	5,89	5,33	5,72	5,68	