



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

STÉFANI FERREIRA DE OLIVEIRA

**NANOEMULSÃO A BASE DO ÓLEO DA SEMENTE DE *Euterpe oleracea* (Mart.)
COM ATIVIDADE FRENTE *Aedes aegypti***

RECIFE

2022

STÉFANI FERREIRA DE OLIVEIRA

**NANOEMULSÃO A BASE DO ÓLEO DA SEMENTE DE *Euterpe oleracea* (Mart.)
COM ATIVIDADE FRENTE *Aedes aegypti***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, na área de concentração Fármacos e Medicamentos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Keyla Emanuelle Ramos de Holanda

RECIFE

2022

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Rodrigo Leopoldino Cavalcanti I, CRB4-1855

O48n Oliveira, Stéfani Ferreira de.
 Nanoemulsão a base do óleo da semente de Euterpe oleracea (Mart.)
 com atividade frente Aedes aegypti / Stéfani Ferreira de Oliveira. – 2022.
 132 f. : il. ; tab. ; 30 cm.

 Orientador : Pedro José Rolim Neto.
 Coorientador : Keyla Emanuelle Ramos de Holanda.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
 Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências
 Farmacêuticas. Recife, 2022.

 Inclui referências, apêndices e anexos.

 1. Euterpe. 2. Inseticidas. 3. Plantas Amazônicas. 4. Óleos Vegetais.
 I. Rolim Neto, Pedro José (Orientador). II. Holanda, Keyla Emanuelle
 Ramos de (Coorientador). III. Título.

615.321 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2022-280)

STÉFANI FERREIRA DE OLIVEIRA

**NANOEMULSÃO A BASE DO ÓLEO DA SEMENTE DE *Euterpe oleracea* (Mart.)
COM ATIVIDADE FRENTE *Aedes aegypti***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, na área de concentração Fármacos e Medicamentos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 14/09/2022

Banca examinadora:

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Ivone Antônia de Souza (Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Rosali Maria Ferreira da Silva (Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Patrícia Danielle Oliveira de Almeida (Examinadora Externa)

Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Katia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos (Examinadora Externa)

Universidade Federal do Amazonas

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por ter me dado força nos momentos difíceis e por ter colocado pessoas tão especiais no caminho e a Nossa Senhora, que me cobre com seu manto sagrado e abre todas as portas na minha vida.

Agradeço com muito amor aos meus pais, Antônio Carlos e Lucinete Ferreira, que nunca mediram esforços para que eu tivesse um ensino de qualidade e sempre me incentivaram a ir buscar meus sonhos e objetivos. Obrigada por serem compreensivos com a ausência necessária, por todo amor, pelos conselhos, desabafos e encorajamento, sempre acreditando que posso ir muito além. Eu amo vocês!

A minha avó, Neuza Oliveira (in memoriam) que mesmo sem estudos, sempre nos ensinou a importância da educação e da busca pelo conhecimento. A toda minha família, que sempre esteve na torcida e acompanhando a minha formação.

Com muito carinho que agradeço a João Victor Viturino, pelo companheirismo, atenção, amor, amizade, incentivo e por sempre me lembrar de agradecer. Muito Obrigada!

Aos Amigos que ficaram no Amazonas, que mesmo na distância se fazem presente, emanam energias positivas e torcem pelo meu sucesso. As amizades construídas em Recife, cada um com algo especial, para que eu não pensasse em desistir diante das dificuldades.

A minha psicóloga, que muito tem me ajudado a controlar a ansiedade, a me conhecer e a enxergar o mundo com outro olhar.

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Rolim, pela oportunidade de estar sob sua orientação, por todo suporte para o desenvolvimento desse trabalho, por todos os ensinamentos e por ser uma fonte de inspiração.

A minha querida Prof^a. Dr^a. Keyla Emanulle Ramos, minha eterna gratidão. Sua amizade e orientação fizeram grande diferença em minha vida, mostrando-me a possibilidade de trilhar novos caminhos, acreditando em mim, quando nem eu acreditava. Obrigada pela amizade, carinho, conselhos, confiança, e por um dia ter escolhido ir morar no Amazonas.

A Prof^a. Dr^a. Rosali Maria da Silva, pela amizade, infinitas conversas, conselhos e contribuições no desenvolvimento deste projeto.

A todos que fazem e fizeram parte da família LTM durante esse período, estagiários, alunos de iniciação científica, mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos, a amizade e convivência com vocês torna o caminho mais descontraído.

A Prof^a. Dr^a. Ivone Antônia, por toda ajuda necessária na realização do teste de Toxicidade Aguda, e por estar sempre na disposição de contribuir. A Rômulo Cruz, Raíra

Justino, Niedja França, Marcilene Silva e Emanuelle Silva, pela contribuição na realização dos testes larvícida e toxicidade aguda.

Ao Prof. Dr. Jorge Vinicius Fernandes Lima Cavalcanti, por toda ajuda necessária na realização do Doseamento por Cromatografia Gasosa e a Pêrsio, pela contribuição com o Perfil Fitoquímico.

A Prof^a. Dr^a. Patrícia Danielle de Oliveira, pela contribuição com a atividade citotóxica *in vitro*.

Ao NUDATEF na pessoa do Prof. Dr. Luiz Soares e da aluna Janaína Machado, pela disponibilidade sempre que necessário na utilização de equipamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade da realização do doutorado e da pesquisa científica, a Rilvan e Nerilin, pelas conversas, esclarecimentos e disponibilidade.

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET) por entenderem a importância da qualificação dos seus servidores.

À banca examinadora, pela atenção dedicada a este trabalho.

A todas as pessoas que mesmo não mencionadas aqui fizeram parte da concretização desta etapa em minha vida, este trabalho é a soma da colaboração de todos vocês! Obrigada pelas orações e incentivo.

RESUMO

Euterpe oleracea é uma oleaginosa predominantemente encontrada na Amazônia, tendo sua semente tratada como resíduo da polpa, e seu descarte considerado como um problema de disposição de lixo. O óleo dessa semente é uma promissora matéria-prima não só para a indústria farmacêutica, mas também como defensivos agrícolas, pois os inseticidas de origem vegetal vêm sendo uma alternativa por serem seletivos, biodegradáveis e reduzirem o impacto sobre a biodiversidade. Doenças como Zika, Chikungunya e Dengue vêm sendo relatadas como problemas de saúde pública, cujo principal vetor é o mosquito *Aedes aegypti*, onde a principal forma de controle ainda é com o uso de inseticidas. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma nanoemulsão a base de óleo da semente de *Euterpe oleracea* e avaliar sua atividade frente *Aedes aegypti*. As sementes foram obtidas na cidade de Itacoatiara-AM. Foi realizado planejamento fatorial para escolha do melhor método extrativo, utilizando as técnicas de ultrassom e soxhlet, sendo a extração por Ultrassom escolhida como melhor método. Na caracterização físico-química a densidade de massa foi de 0,879 g.mL⁻¹; densidade relativa de 0,881; índice de refração foi de 1,444; umidade 4,98%; índice de acidez de 1,285 NaOH.g⁻¹; índice de saponificação de 94,47 KOH.g⁻¹, espectroscopia na região de absorção do Infravermelho, apresentou estiramentos característicos a estrutura geral do triglicerídeo. Na análise térmica o óleo apresentou-se termicamente estável até a temperatura de 155°C. O perfil fitoquímico do óleo por análise qualitativa apresentou como compostos majoritários os ácido hexadecanoico; (Z) 6-Pentadecenol. No perfil de ácidos graxos o ácido linoléico mostrou-se majoritário. No teste de atividade citotóxica não foi observada atividade frente às células HEPG2, HCT116, B16F10, CAL27 e MRC5. Foi verificada atividade larvicida nas concentrações de 1,7mg.mL⁻¹ a 6,8 mg.mL⁻¹ e pupicida nas concentrações de 3,5 mg.mL⁻¹ a 13,6 mg.mL⁻¹ de emulsão a base do óleo frente *Aedes aegypti*. No teste de toxicidade aguda não foi observado nenhum óbito dentre os animais testados na dose de 2.000 mg.kg⁻¹. O estudo de compatibilidade evidenciou que o óleo é compatível com os excipientes Tween 80 e Span 80. A estabilidade acelerada preliminar da nanoemulsão mostrou que as formulações 1 e 2 mantiveram-se estáveis até a avaliação no T15, considerando os resultados de PDI, potencial zeta e tamanho de gotícula. A atividade larvicida da nanoemulsão frente *Aedes aegypti* foi verificada após o período de 48h. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a nanoemulsão do óleo da semente de *E. oleracea* é uma alternativa promissora frente *Aedes aegypti*, agregando valor a cadeia de comercialização do fruto.

Palavras-chave: açaí; inseticida; plantas Amazônicas; óleos vegetais.

ABSTRACT

Euterpe oleracea is an oil seed predominantly found in the Amazon, having its seed treated as pulp residue, and its disposal considered as a waste disposal problem. The oil from this seed is a promising raw material not only for the pharmaceutical industry, but also as pesticides, as insecticides of plant origin have been an alternative because they are selective, biodegradable and reduce the impact on biodiversity. Diseases such as Zika, Chikungunya and Dengue have been reported as public health problems, whose main vector is the *Aedes aegypti* mosquito, where the main form of control is still with the use of insecticides. The objective of the present work was to develop an oil-based nanoemulsion from the seed of *Euterpe oleracea* and to evaluate its activity against *Aedes aegypti*. The seeds were obtained in the city of Itacoatiara-AM. Factorial planning was carried out to choose the best extractive method, using ultrasound and soxhlet techniques, and ultrasound extraction was chosen as the best method. In the physical-chemical characterization, the mass density was 0.879; relative density of 0.881; refractive index was 1.444; humidity 4.98%; acid number 1.285 NaOH/g; saponification index of 94.47 KOH/g, spectroscopy in the region of Infrared absorption, showing characteristic stretching of the general structure of the triglyceride. In the thermal analysis, the oil was thermally stable up to a temperature of 155°C. The phytochemical profile of the oil by qualitative analysis showed hexadecanoic acid as major compounds; (Z) 6-Pentadecenol. In the fatty acid profile, linoleic acid showed to be the majority. In the cytotoxic activity test, no activity was observed against HEPG2, HCT116, B16F10, CAL27 and MRC5 cells. Larvicidal activity was verified at concentrations from 1.7mg mL⁻¹ to 6.8 mg mL⁻¹ and pupicidal activity at concentrations from 3.5 mg mL⁻¹ to 13.6 mg mL⁻¹ of oil-based emulsion against *Aedes aegypti*. In the acute toxicity test, no death was observed among the animals tested at the dose of 2,000 mg kg⁻¹. The compatibility study showed that the oil is compatible with the excipients Tween 80 and Span 80. The preliminary accelerated stability of the nanoemulsion showed that formulations 1 and 2 remained stable until the evaluation at T15, considering the results of PDI, zeta potential and droplet size. The larvicidal activity of the nanoemulsion against *Aedes aegypti* was verified after a period of 48h. From the results obtained, it can be concluded that the nanoemulsion of *E. oleracea* seed oil is a promising alternative against *Aedes aegypti*, adding value to the fruit's commercialization chain.

Key words: açaí, insecticides; Amazonian plants; fixed oil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Palmeira de açázeiro (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.).....	22
Figura 2 - Fruto açáí (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.).....	23
Figura 3 - Anatomia do fruto do açázeiro (corte transversal): (1) Embrião, (2) Epicarpo, (3) Cicatriz, (4) Polpa, (5) Fibras e (6) Endocarpo.	25
Figura 4 - Ciclo biológico do <i>Aedes aegypti</i>	29
Figura 5 - Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	30
Figura 6 - Sementes de <i>E. oleracea</i> descartadas pelo fornecedor local em Itacoatiara - AM.	45
Figura 7- Infravermelho do óleo da semente de <i>E. oleracea</i> por diferentes métodos de extração.	65
Figura 08 - Estrutura molecular de um triglicerídeo.	66
Figura 09 - Curva TG e DTG do óleo da semente de <i>E. oleracea</i>	67
Figura 10 - Curva TG, DTA e DSC do óleo da semente de <i>E. oleracea</i>	68
Figura 11- Efeito de óleo de açáí na viabilidade de células HEPG2, HCT-116, B16F10, CAL27 e MRC-5 determinado pelo método de Alamar Blue após 72 horas de tratamento.	71
Figura 12 - Médias da massa corporal do GC e GT1 utilizados no teste de Toxicidade Aguda.	79
Figura 13 - Médias da massa corporal do GC e GT2 utilizados no teste de Toxicidade Aguda.	80
Figura 14 - Consumo de ração do GC e GT1 utilizados no teste de Toxicidade Aguda.	80
Figura 15 - Consumo de ração do GC e GT2 utilizados no teste de Toxicidade Aguda.	81
Figura 16 - Consumo de água do GC e GT1 utilizados no teste de Toxicidade Aguda.	81
Figura 17 - Consumo de água do GC e GT2 utilizados no teste de Toxicidade Aguda.	82
Figura 18 - Estudo de compatibilidade das misturas físicas óleo- excipiente no FTIR	85
Figura 19 - Estrutura molecular do Tween 80.....	86
Figura 20 - Estrutura molecular do Span 80.....	86
Figura 21 - Curva TG e DTG da mistura binária óleo e Span 80.....	87
Figura 22 - Curva TG e DTG da mistura binária óleo e Tween 80.	88
Figura 23 - Curva TG e DTG da mistura terciária óleo, Tween 80 e Span 80.....	88
Figura 24 - Formulações para cálculo do EHL após 24h.	90
Figura 25 - Gráfico referente ao tamanho de gotícula em relação a intensidade do experimento 1.	96
Figura 26 - Gráfico referente ao tamanho de gotícula em relação à intensidade do experimento 5.	96

Figura 27 - Gráfico referente ao tamanho de gotícula em relação à intensidade do experimento	
8.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Planejamento fatorial para extração do óleo da semente de <i>E. oleracea</i> por Ultrassom.....	46
Tabela 2 - Extração do óleo da semente de <i>E. oleracea</i> por Soxhlet.	46
Tabela 3 - Determinação do EHL do óleo da semente de <i>E. oleracea</i>	56
Tabela 4 - Matriz codificada de Planejamento fatorial 3 ² para estudar a influência do tempo e potência no preparo de nanoemulsões	57
Tabela 5 - Rendimento obtido do óleo da semente de <i>E. oleracea</i> por ultrassom.	61
Tabela 6 - Rendimento obtido do óleo da semente de <i>E. oleracea</i> por soxhlet.	61
Tabela 7 - Parâmetros físico-químicos do óleo da semente de <i>E. oleracea</i>	62
Tabela 8 - Composição química do óleo da semente de <i>E. oleracea</i>	69
Tabela 9 - Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos presentes no óleo da semente de <i>E. oleracea</i>	70
Tabela 10 - Comparação da composição de ácidos graxos do óleo da semente de <i>E. oleracea</i> com espécies do mesmo gênero.....	71
Tabela 11 - Percentual de mortalidade das larvas de <i>Aedes aegypti</i> , expostas às diferentes concentrações do óleo da semente de <i>E. oleracea</i> , em relação ao tempo de exposição.	72
Tabela 12 - Concentração letal 50 e 90 do óleo da semente do açaí em larvas de <i>Aedes aegypti</i> , nos tempos de exposição de 8, 16 e 24.	73
Tabela 13 - Percentual de mortalidade das pupas de <i>Aedes aegypti</i> , expostas às diferentes concentrações do óleo da semente de <i>Euterpe oleracea</i> , em relação ao tempo de exposição.	74
Tabela 14 - Concentração letal 50 e 90 do óleo da semente de <i>Euterpe oleracea</i> sobre pupas de <i>Aedes aegypti</i> , nos tempos de exposição de 1, 2, 4, 8, 16 e 24.....	75
Tabela 15 - Sinais clínicos do Sistema Nervoso Central após administração por via oral da emulsão à base do óleo da semente do açaí em camundongo <i>Mus musculus</i>	77
Tabela 16 - Sinais clínicos do Sistema Nervoso Autônomo e taxa de mortalidade após administração por via oral da emulsão à base do óleo da semente do açaí em camundongo <i>Mus musculus</i>	78
Tabela 17 - Média $\pm$ Desvio Padrão das massas dos órgãos avaliados dos Grupos Controle e Tratados, no teste de toxicidade aguda.	82

Tabela 18 - Efeito do óleo da semente de <i>E. oleracea</i> (2.000 mg kg ⁻¹), por via oral sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos de camundongos <i>Mus musculus</i> fêmeas.	83
Tabela 19 - Dados termoanalíticos das misturas físicas.	89
Tabela 20 - Características macroscópicas e análise de centrifugação das formulações desenvolvidas para determinar o EHL.	90
Tabela 21 - Potencial Zeta, Tamanho de gotícula e PDI avaliados no T ₂₃ .	92
Tabela 22 - Análise estatística da variação de potência e tempo no comportamento do PDI da nanoemulsão.	94
Tabela 23 - Análise estatística da variação de potência e tempo no comportamento do Tamanho de gotícula da nanoemulsão.	95
Tabela 24 - Análise estatística da variação de potência e tempo no comportamento do Potencial Zeta da nanoemulsão.	95
Tabela 25 - Parâmetros de pH e análise macroscópica da nanoemulsão.	97
Tabela 26 - Avaliação do Índice de Polidispersividade (PDI) no teste de estabilidade acelerada.	98
Tabela 27 - Avaliação do Tamanho de gotícula no teste de estabilidade acelerada.	98
Tabela 28 - Avaliação do Potencial Zeta no teste de estabilidade acelerada.	99
Tabela 29 - Percentual de mortalidade das larvas de <i>Aedes aegypti</i> , expostas a nanoemulsão a base de <i>Euterpe oleracea</i> , em relação ao tempo de exposição.	99

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	Reflectância total atenuada
B16F10	Melanoma murinho
CAL27	Carcinoma escamocelular oral
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal
CG	Cromatografia gasosa
CI ₅₀	Índice de citotoxicidade 50%
CL ₅₀	Concentração letal 50%
CL ₉₀	Concentração letal 90%
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DDT	Diclorodifenil-tricloroetano
DL ₅₀	Dose letal 50%
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle médium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial (do inglês <i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
DTA	Análise Térmica Diferencial (do inglês <i>Differential Thermal Analysis</i>)
DTG	Termogravimetria diferencial
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
HCT116	Carcinoma de color retal humano
HEP-G2	Hepatocarcinoma humano
IV	Infravermelho
MRC5	Fibroblastos humanos
ONU	Organização das Nações Unidas
PDI	Índice de Polidispersividade
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
TG	Termogravimetria

UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
ZIKV	Vírus zika

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral	20
2.2	Objetivos Específicos	20
3	REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1	<i>Euterpe oleracea</i> Mart. (AÇAÍ)	21
3.1.1	<i>Características botânicas</i>	21
3.1.2	<i>Produção do açaí</i>	23
3.1.3	<i>Destinação das sementes</i>	24
3.2	Inseticidas vegetais: uma alternativa frente ao vetor <i>Aedes aegypti</i>	26
3.2.1	<i>Alternativas de manejo do vetor</i>	27
3.3	<i>Aedes aegypti</i>: Principal vetor das arboviroses	29
3.3.1	<i>Ciclo de vida</i>	29
3.4	Arboviroses emergentes no Brasil	32
3.4.1	<i>Vírus Dengue</i>	32
3.4.2	<i>Vírus Zika</i>	33
3.4.3	<i>Vírus Chikungunya</i>	34
3.5	Emulsões e Nanoemulsões	35
3.5.1	<i>Nanoemulsões</i>	38
3.5.2	<i>Estabilidade e Controle da Forma Farmacêutica</i>	39
3.6	Técnicas de Caracterização	40
3.6.1	<i>Cromatografia Gasosa</i>	40
3.6.2	<i>Espectroscopia de Absorção no Infravermelho</i>	41
3.6.3	<i>Análise Térmica</i>	42
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	Obtenção da matéria-prima	45

4.2	Métodos de extração.....	45
4.3	Caracterização físico-química do óleo.....	47
4.3.1	<i>Densidade de Massa e Densidade relativa</i>	47
4.3.2	<i>Índice de Refração.....</i>	47
4.3.3	<i>Umidade.....</i>	48
4.3.4	<i>Índice de Acidez</i>	48
4.3.5	<i>Índice de Saponificação</i>	48
4.3.6	<i>Análise Estatística</i>	49
4.4	Espectroscopia por absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	49
4.5	Estudos de Análise Térmica	49
4.6	Perfil fitoquímico	50
4.7	Doseamento de Ácidos Graxos Essenciais	50
4.8	Avaliação do potencial citotóxico <i>in vitro</i>	51
4.8.1	<i>Cultivo celular.....</i>	51
4.8.2	<i>Avaliação da citotoxicidade pelo método Alamar Blue®</i>	51
4.9	Preparo da Emulsão	52
4.10	Ensaio inseticidas	52
4.10.1	<i>Atividade larvicida</i>	52
4.10.2	<i>Atividade pupicida</i>	53
4.10.3	<i>Análises estatísticas para o ensaio larvicida e pupicida sobre Aedes aegypti.....</i>	53
4.11	Toxicidade aguda (Dose Letal 50)	53
4.11.1	<i>Animais</i>	54
4.11.2	<i>Protocolo Experimental</i>	54
4.11.3	<i>Acompanhamento, análise bioquímica e histopatológica</i>	55
4.11.4	<i>Análises estatísticas para os ensaios da avaliação toxicológica aguda</i>	55
4.12	Estudo de compatibilidade frente a excipientes	55

4.13	Planejamento e desenvolvimento das formulações	55
4.13.1	<i>EHL</i>	55
4.13.2	<i>Análise macroscópica</i>	57
4.13.3	<i>Centrifugação.....</i>	57
4.13.4	<i>Planejamento fatorial quali quantitativo das formulações.....</i>	57
4.13.5	<i>Medições de potencial Zeta, Índice de polidispersão e Tamanho de gotícula</i>	58
4.14	Estudo de estabilidade acelerada da nanoemulsão á base do óleo da semente de <i>E. oleracea</i>.....	58
4.15	Atividade larvicida da nanoemulsão contendo óleo da semente de <i>E. oleracea</i> frente <i>Aedes aegypti</i>	59
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1	Extração	60
5.2	Caracterização físico-química do óleo da semente do açaí	62
5.3	Espectroscopia por absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	64
5.4	Estudos de Análise Térmica	66
5.5	Perfil Fitoquímico	68
5.6	Doseamento do perfil de Ácidos Graxos por Cromatografia Gasosa	69
5.7	Avaliação do potencial citotóxico <i>in vitro</i>	71
5.8	Ensaio inseticidas	72
5.8.1	<i>Atividade Larvicida</i>	72
5.8.2	<i>Atividade Pupicida</i>	74
5.9	Toxicidade Aguda	75
5.10	Estudo de compatibilidade frente a excipientes	84
5.11	Planejamento e desenvolvimento das formulações	89
5.11.1	<i>Planejamento fatorial quali-quantitativo.....</i>	91
5.12	Estabilidade Acelerada	97

5.12.1	Análise macroscópica e pH	97
5.12.2	Medições de potencial Zeta, Índice de polidispersão e Tamanho de gotícula	98
5.13	Atividade larvica da nanoemulsão contendo óleo da semente de <i>E. oleracea</i> frente <i>Aedes aegypti</i>	99
6	CONCLUSÃO	100
7	PERSPECTIVAS	101
	REFERÊNCIAS	102
	APÊNDICE A – Tabela estatística	126
	APÊNDICE B -Pedido do depósito de patente.....	127
	APÊNDICE C – Resumo biofito	128
	APÊNCIDE D – Artigo publicado.....	129
	APÊNCIDE E – Artigo submetido.....	130
	ANEXO A - Folha aprovação comitê de ética	126
	ANEXO B – Cadastro no SISGEN	132

1 INTRODUÇÃO

Diferentes frutos comestíveis são utilizados na elaboração de produtos alimentícios, dentre os quais, possuem sementes que, muitas vezes, são descartadas, gerando anualmente um acúmulo de milhões de toneladas como resíduo, causando problemas de ordem ambiental e econômica. Esses resíduos alimentícios quando tratados adequadamente poderiam ter uma finalidade benéfica ao homem e ao meio ambiente (KOBORI; JORGE, 2005; SILVA, 2015; BENÍTEZ, 2020).

O açaí (*Euterpe oleracea*) é uma oleaginosa predominantemente encontrada na Amazônia, no norte do Brasil, tem a polpa consumida amplamente por toda a população brasileira. A produção de polpa do fruto no Brasil no ano de 2020 foi de 1.698.657 toneladas (CONAB, 2022). Nos últimos anos, essa fruta vem sendo exportada para países como Estados Unidos e Alemanha, tanto para consumo alimentício quanto para pesquisa (GARZON *et al.*, 2017).

A semente de açaí, que até alguns anos atrás, era tratada como resíduo da polpa, e seu descarte considerado como um problema de disposição de lixo vem demonstrando com o avanço das pesquisas, um possível componente de valor econômico agregado, sendo usada na produção de artesanatos, alimentação animal, adubo orgânico (TEIXEIRA *et al.*, 2004), insumo energético (CARNEIRO *et al.*, 2013; SILVA; TAVARES, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2013), atividades farmacológicas (MARTINEZ *et al.*, 2018 ; COSTA *et al.*, 2017; TRINDADE *et al.*, 2019), além de ser uma excelente fonte de matéria prima para a indústria farmacêutica (RODRIGUES *et al.*, 2006; SCHAUSS, 2016).

Um dos principais produtos das oleaginosas são os óleos extraídos de suas sementes, compostos por ácidos graxos na forma livre ou esterificada e pela fração insaponificável que varia de 2 a 5% sendo heterogênea e muito importante devido à presença de esqualeno, fitosteróis, pró-vitaminas e vitaminas lipossolúveis (REBELLO, 2005; GUEDES, 2006; REDA; CARNEIRO, 2007). Além de serem usados como produto alimentício fazendo parte da dieta humana os óleos vegetais apresentam funções tecnológicas (JORGE, 2009; MORAIS *et al.*, 2018) além de atividades farmacológicas e usadas como defensivos agrícolas (QUEIROZ *et al.*, 2020).

Os inseticidas de origem vegetal vêm sendo uma alternativa aos inseticidas sintéticos, os quais têm levado ao surgimento de populações de mosquitos resistentes, revelando a

necessidade de mudanças nas ações de controle e manejo destes produtos (GARCEZ *et al*, 2013). Contudo, os inseticidas de origem vegetal deverão apresentar baixa toxicidade para os mamíferos, serem seletivos, além de biodegradáveis, reduzindo, dessa forma, o impacto sobre a biodiversidade (VIANA, SAMPAIO, MARTINS, 2018).

Nos últimos anos doenças como Zika, Chikungunya e Dengue têm apresentado destaque e vem sendo relatadas como problemas de saúde pública (BRASIL, 2016a), sobretudo nos países tropicais e subtropicais, cujo principal vetor dessas doenças é o mosquito *Aedes aegypti*, o qual apresenta ampla dispersão urbana, sendo considerado um dos insetos de maior relevância médico sanitária (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Para a redução da densidade populacional desse vetor, recomenda-se o controle com o uso de inseticidas.

Tendo em vista que a matéria-prima é proveniente de resíduo que é descartado em grande quantidade, o presente trabalho visou também contribuir para a realização dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável proposto pela ONU (Organização das Nações Unidas, 2019) que são importantes para fortalecer a cultura da sustentabilidade ambiental e social, promovendo crescimento econômico e sustentável, beneficiando a comunidade local e agregando valor a cadeia de comercialização da espécie.

Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver uma nanoemulsão a base de óleo da semente de *Euterpe oleracea* e avaliar sua atividade frente *Aedes aegypti*, padronizando a obtenção da matéria prima, bem como a sua caracterização física e química, pois dessa forma permite-se criar a identidade da mesma, garantindo um alto padrão de qualidade dos seus produtos dentro das exigências técnicas estabelecidas pela legislação vigente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Desenvolver nanoemulsão a base de óleo da semente de *Euterpe oleracea* e avaliar sua atividade frente *Aedes aegypti*.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter e caracterizar físico-quimicamente o óleo da semente *Euterpe oleracea*;
- Realizar o Perfil Fitoquímico do óleo da semente de *E. oleracea*;
- Dosear os Ácidos Graxos Essenciais do óleo da semente de *E. oleracea*;
- Avaliar o potencial citotóxico *in vitro* do óleo da semente de *E. oleracea*;
- Obter emulsão á base do óleo da semente de *E. oleracea*;
- Avaliar atividade larvicida e pupicida da emulsão contendo óleo da semente de *E. oleracea* frente *Aedes aegypti*;
- Avaliar a toxicidade aguda da emulsão contendo o óleo da semente de *E. oleracea*.
- Realizar estudo de compatibilidade física e química frente os excipientes;
- Desenvolver nanoemulsão á base do óleo da semente de *E. oleracea*;
- Avaliar estabilidade acelerada da nanoemulsão á base do óleo da semente de *E. oleracea*;
- Avaliar atividade larvicida da nanoemulsão contendo óleo da semente de *E. oleracea* frente *Aedes aegypti*;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Euterpe oleracea* Mart. (AÇAÍ)

As palmeiras (família Arecacea) adaptam-se aos mais diversos ambientes, porém, o maior número de espécies está presente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo considerada a terceira família de plantas mais importantes da região amazônica (ZANINETTI, 2009), onde apresentam grande potencial econômico e cultural, pois além de compor a dieta de animais e seres humanos, são utilizadas como fontes de produtos florestais não madeireiros (HENDERSON, 2000; ELIAS *et al.*, 2015; ELIAS, 2017).

O gênero *Euterpe* tem cerca de 28 espécies de ocorrência nas Américas Central e do Sul e está distribuído por toda a Bacia Amazônica (YAMAGUCHI *et al.*, 2015), 10 espécies são registradas no Brasil, dentre essas, 7 de ocorrência na Amazônia. Duas espécies predominam a região, a espécie *Euterpe precatoria* de prevalência de estado do Amazonas e a espécie *Euterpe oleracea* de maior concentração no estado do Pará e Amapá, mas também encontrada nos estados do Amazonas e Maranhão (NOGUEIRA *et al.*, 1995; BRASIL, 2005a).

3.1.1 Características botânicas

A palmeira pode atingir altura de até 25 m, possui caule de 15 a 25cm de diâmetro e ocorre geralmente formando touceiras com vários estipes em diferentes estágios de desenvolvimento. Os estipes apresentam altura e diâmetro variando entre 3m a 20m e 7cm a 18cm, respectivamente, sustentando, em sua porção terminal, um conjunto de 8 a 14 folhas, sendo cilíndricos, externamente lisos, de cor cinza, com manchas de líquens, conforme pode ser observado na Figura 1. Em toda extensão dos estipes são encontradas cicatrizes, deixadas pelas folhas que nascem e caem (HENDERSON; GALEANO, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1998; CALBO; MORAES, 2000).

As folhas apresentam comprimento de até 278,8cm (NOGUEIRA, 1997), são compostas, pinadas de arranjo espiralado, com 40 a 80 pares de folíolos, opostos ou sub-opostos e inseridos em intervalos regulares. Os folíolos são pendentes nos indivíduos adultos e ligeiramente horizontais nos indivíduos jovens, apresentando comprimento entre 20cm e 50cm e largura entre 2cm e 3cm. Em cada folíolo encontra-se uma nervura central, proeminente na face adaxial e mais dois conjuntos com duas ou três nervuras, proeminentes na face abaxial, distribuídos em relação ao plano da nervura central (PRANCE; SILVA, 1975; HENDERSON; GALEANO, 1996).

Figura 1 - Palmeira de açázeiro (*Euterpe oleracea* Mart.).



Fonte: Pinheiro, 2017.

A inflorescência é infrafoliar solitárias chamadas de espádices, desenvolvendo-se em maior intensidade após a queda da folha e quando aberta apresenta-se disposta quase horizontalmente. Possui 5 pedúnculos, com comprimento entre 5cm e 15cm e diâmetro entre 2,7cm e 4,0cm (HENDERSON; GALEANO, 1996). Nas ráquias as flores estão dispostas em tríades, com uma flor feminina central e duas flores masculinas laterais. As flores são unissexuadas (CAVALCANTE, 1991; HENDERSON; GALEANO, 1996), o terço terminal de cada ráquila apresenta, na maioria dos casos, somente flores masculinas, o que proporciona a presença de 80,5% de flores masculinas e apenas 19,5% de flores femininas na inflorescência (CALZAVARA, 1972).

O fruto é uma drupa globosa ou levemente depressa, apresentando resíduo do estigma lateralmente, com diâmetro variando entre 1cm e 2cm e pesando, em média, 1,5g. O epicarpo, na maturação, possui coloração roxo-escuro, conforme pode ser observado na Figura 2. O mesocarpo, com cerca de 1mm espessura, é polposo, envolvendo um endocarpo lenhoso que acompanha, aproximadamente, a forma do fruto e contém em seu interior uma semente, com embrião diminuto e endosperma abundante e ruminado (CAVALCANTE, 1991; HENDERSON; GALEANO, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1998; SCHULTZ, 2008).

Figura 2- Fruto açáí (*Euterpe oleracea* Mart.).



Fonte: Martins, 2013.

O sistema radicular é do tipo fasciculado parcialmente denso, com raízes emergindo do estipe da planta adulta atingindo de 30cm a 40cm acima da superfície do solo e aproximadamente 1cm de diâmetro, apresentando coloração avermelhada (HENDERSON; GALEANO, 1996). As raízes são providas de lenticelas e que se prolongam superficialmente, por até cerca de 3,0m a 3,5m da base do estipe, em indivíduos com até três anos de idade, em plantas com mais de dez anos, pode atingir 5m a 6m de extensão aerênquimas (ANDERSON, 1986; MENEZES NETO, 1994).

3.1.2 Produção do açáí

A fruticultura é umas das cadeias produtivas que tem tido crescimento no país, por conta das suas características climáticas. O açáí é um alimento essencial e de consumo diário para a população da região Amazônica, sendo o processamento do fruto de suma importância para a vida econômica e social da região, tanto em termos de comercialização quanto na geração de emprego para a população local (REYMÃO; SILVA, 2018).

A partir de meados da década de 90, o suco de açáí ou vinho de açáí, como é popularmente conhecido na região Norte, foi gradativamente conquistando novas fronteiras de mercado, atendendo não apenas o mercado local, mas também as outras regiões do país e o mercado internacional, principalmente os Estados Unidos, países da União Européia, Japão e Austrália (SANTANA; CARVALHO; MENDES, 2006).

No Brasil, a demanda de açáí vem crescendo entre os consumidores de maior renda. A motivação do consumo se dá por razões que vão além da necessidade alimentar, envolvendo questões culturais e principalmente por estética e saúde (SILVA; SANTANA; REIS, 2006).

Diante dessa crescente demanda, o que antes era considerado apenas como produto vindo do extrativismo tradicional, passou a ter um ambiente de trabalho visando a cadeia de produção global (REYMÃO; SILVA, 2018).

A exploração dessa espécie era concentrada na extração do palmito, mas com o aumento do consumo da polpa do açaí um novo direcionamento foi dado a economia dessa espécie na região, fato que levou a maior preservação da espécie. A base da cadeia produtiva do açaí na região Norte ainda é a agricultura familiar, responsável pela produção extrativista, de onde vem a maior parte do produto, fato que é de importância crucial para a formação de renda desses pequenos produtores (REYMÃO; SILVA, 2018).

O crescente consumo da polpa motivou a produção plantada do açaí, principalmente nas áreas de várzea da região, pois são terras que conseguem manter um nível adequado de umidade no solo, por conta da regularidade das chuvas, o que favorece para o plantio desta espécie. Nessas condições o açaizeiro começa a produzir frutos a partir de 3 a 4 anos de idade (AGUIAR, 2016).

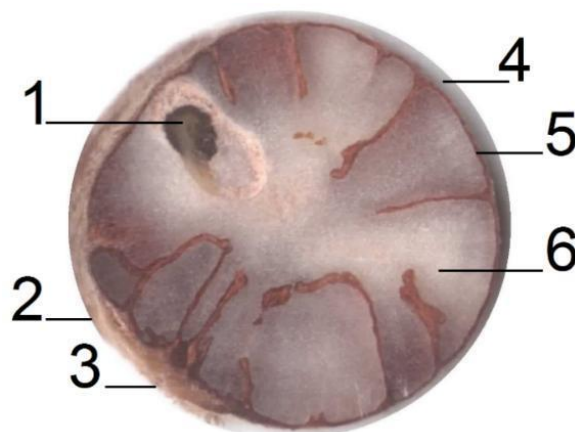
A cadeia de beneficiamento do fruto pode ser dividida em duas etapas: extração da biomassa (coleta do açaí, transporte e armazenamento) e o beneficiamento da biomassa (recepção, seleção, maceração, extração da polpa, homogeneização, envasamento, congelamento e armazenamento). Dentro desse processo envolvem-se os extrativistas, produtores, intermediários, indústrias de beneficiamento e batedores artesanais (QUIRINO, 2016).

O maior produtor nacional do fruto é o estado do Pará, chegando a 1.274.056 toneladas/ano, seguido do estado do Amazonas com a produção de 52.701 toneladas/ano (SAUMA; MAIA, 2019). A produção do açaí no estado do Amazonas em sua maior parcela ainda é extrativista, porém já se tem áreas de plantio planejado para as espécies *E. oleracea* e *E. precatoria* (BRASIL, 2005a).

3.1.3 Destinação das sementes

A parte comestível do açaí (o epicarpo e o mesocarpo) representa, em média, 26,54% do peso do fruto, apresentando, no entanto, variações acentuadas, em função da variedade genética da espécie. A maior parte do fruto é composta pelo volumoso endocarpo (semente), o qual contém em seu interior um tecido de reserva rico em lipídios, conforme pode ser observado na Figura 3.

Figura 3 - Anatomia do fruto do açaizeiro (corte transversal): (1) Embrião, (2) Epicarpo, (3) Cicatriz, (4) Polpa, (5) Fibras e (6) Endocarpo.



Fonte: Cordeiro *et al.*, 2019

A indústria alimentícia faz o aproveitamento de toda a polpa, ao passo que a maior parte do fruto que são as semente e fibras, não possui um manejo adequado e acabam sendo descartadas como rejeitos sólidos após o despulpamento. Esse processo apresenta dois grupos de sementes: germinativas e não germinativas (QUIRINO, 2016).

As sementes germinativas são empregadas para o plantio e as sementes não germinativas, são estocadas e aproveitadas para diversos fins, como por exemplo, para o artesanato, para geração de energia elétrica (CARNEIRO *et al.*, 2013; SILVA; TAVARES, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2013), para ração animal, pavimentação de calçadas, produção de painéis e como substrato orgânico (TEIXEIRA *et al.*, 2004), além de ser uma excelente fonte de matéria prima para a indústria farmacêutica (RODRIGUES *et al.*, 2006; SCHAUSS, 2016). Para o aproveitamento da semente destinada ao plantio, ela não deve ser estocada ou armazenada, pois perde a capacidade germinativa, devendo ser plantada logo após o despulpamento, o que dificulta a utilização das sementes para esta finalidade (FARIAS NETO *et al.*, 2006).

A parte das sementes que não é vendida para utilização como ração, adubo e artesanato é descartada como resíduo sólido. No município de Manaus – AM o descarte das sementes do açaí é feito no aterro público de resíduos sólidos, denominado Aterro Controlado de Manaus, localizado no quilômetro 19 da rodovia AM - 010 (Manaus - Itacoatiara), porém nos demais municípios do estado produtores de açaí a produção gera o acúmulo de grande número de sementes sem destino manejado e sem aproveitamento, sendo despejadas formando um amontoado de sementes, resultantes da produtividade ao longo da safra (QUIRINO, 2016).

3.2 Inseticidas vegetais: uma alternativa frente ao vetor *Aedes aegypti*

O controle de *Aedes* tem constituído um importante desafio, especialmente nos países em desenvolvimento. Mesmo diante das técnicas de controle utilizadas, não consegue-se a solução para erradicação de *Aedes aegypti*, pois ainda são recorrentes os vários surtos de doenças relacionadas ao mosquito.

A crescente preocupação com o meio ambiente, o elevado número de espécies resistentes aos inseticidas disponíveis no mercado e a dificuldade de se descobrir novas classes químicas com ação inseticida, tem retomado a utilização de plantas como uma alternativa no controle de pragas, pois além de serem menos poluentes e apresentarem boa eficácia, são mais seletivas (GUARDA *et al.*, 2016).

A utilização de produtos de origem natural faz parte da evolução humana e foram os primeiros recursos utilizados para fins terapêuticos, controle de pragas e outros usos (VIEGAS JR *et al.*, 2006). As plantas são fontes importantes de substâncias bioativas em sua composição, apresentando as mais diversas atividades farmacológicas, servindo para o desenvolvimento de um grande número de produtos naturais de interesse comercial (GOVINDARAJAN; RAJESWARY; BENELLI, 2016).

Os inseticidas vegetais estão sendo uma alternativa de abordagem promissora, podendo ser obtidos com a utilização de óleos vegetais, óleos essenciais, oleoresinas e outros extratos (PAVELA, 2015).

Os extratos vegetais podem agir como larvicidas, ovicidas, inibidores do crescimento, desreguladores do desenvolvimento, repelentes, atraentes e estimulantes de oviposição (KABIR *et al.*, 2013). Apresentam diferentes modos de ação sobre os insetos, podendo reduzir a alimentação, motilidade, inibição da síntese de quitina, inibição do crescimento, provocar deformação das pupas e redução da fecundidade dos insetos (RIBEIRO, 2010).

Esses extratos apresentam compostos estruturalmente diferentes, dificultando a sua separação e estão relacionados à defesa autoecológica da planta. Quando utilizados na forma complexa atuam de forma sinérgica e são mais efetivos do que na forma de substâncias isoladas, o que pode diminuir ou retardar a chance de resistência dessas populações (ISMAN, 2000; OKUMU; KNOLS; FILLINGER, 2007; PAVELA, 2015).

3.2.1 Alternativas de manejo do vetor

Outros métodos podem ser utilizados para o controle de *Aedes* como o manejo ambiental, campanhas educacionais e controle genético, porém três métodos são os mais utilizados: controle mecânico baseado no emprego de técnicas para extinguir os criadouros e o vetor; controle biológico, que compreende no uso de patógenos ou predadores com potencial para diminuir a população vetorial; controle químico que utiliza o emprego de produtos químicos capazes de matar larvas e insetos adultos (BRAGA; VALE, 2007).

O manejo ambiental, o qual está condicionado às questões sociais, visa à eliminação dos potenciais criadouros do vetor e, os mecanismos de eliminação podem ser através das coletas e destinos adequados de lixo, instalações de telas em janelas e portas e drenagem de água. Vale ressaltar, que a exclusão social, ocupação desordenada e não planejada do espaço urbano, e carência ou ausência de saneamento básico para uma grande parcela da população, são exemplos de alertas para o controle de insetos, que se atenuados, poderão impedir o contato do homem com o vetor e dessa forma reduzir número de casos de doenças (WERMELINGER; CARVALHO, 2016).

O controle genético é feito pelo uso do próprio vetor, modificado geneticamente, o qual transmite aos seus descendentes a nova carga genética ao se reproduzirem. Em um modelo desenvolvido pela empresa britânica Oxitec, mosquitos machos são submetidos à radiação gama e em seguida, liberados no ambiente que ao copularem com fêmeas selvagens, transmitem todo o elemento genético para seus filhotes, tornando-os inviáveis pois morrem no estado larval, levando a diminuição da população do vetor (OSTERA; GOSTIN, 2011). Em 2011, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), permitiu a liberação de mosquitos dessa linhagem para realização de testes no município de Juazeiro- Bahia (SANTOS, 2018).

Alguns autores alertam para os riscos da liberação dos mosquitos transgênicos no ambiente, o que possivelmente acarretará impactos negativos e significativos à biodiversidade, os quais poderão alterar a cadeia alimentar (MARRELLI, 2009; OLIVEIRA; CARVALHO; CAPURRO, 2011; OSTERA; GOSTIN, 2011).

Uma abordagem complementar originada na Austrália e que não envolve modificações genéticas é o uso da cepa de bactéria simbiótica *Wolbachia* para infectar mosquitos *A. aegypti*. Tendo em vista que a mesma exerce um efeito de simbiose com o vetor, ela interfere na possibilidade de disseminação de vírus em humanos. No Brasil esse método faz parte do projeto World Mosquito Program Brasil (WMPBrasil) da Fiocruz em parceria com o

Ministério da Saúde, atualmente, a atuação é realizada no Rio de Janeiro (RJ), Niterói (RJ), Campo Grande (MS), Belo Horizonte (MG) e Petrolina (PE) (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2022).

No controle mecânico é feita a utilização de práticas que eliminam o vetor e os criadouros, reduzindo o contato do homem com o vetor. Dentre essas práticas temos a drenagem de reservatórios, instalações de telas em portas e janelas, roupas de proteção, remoção da água estagnada e destinação adequada de pneus velhos e latas que servem como criadouros de mosquito (ZARA *et al.*, 2016).

O controle biológico é feito utilizando predadores ou patógenos que apresentem potencial atividade para a redução do vetor. Tem-se utilizado peixes e invertebrados aquáticos, que comem as larvas e pupas, e os patógenos que liberam toxinas, como bactérias, fungos e parasitas, dentre eles o mais empregado tem sido o *Bacillus thuringiensis* var. israelenses (Bti), que libera endotoxinas proteicas que são ativadas quando chegam ao intestino médio dos mosquitos, causando degradação do intestino interrompendo a secreção normal e favorecendo a germinação de esporos que acarretará em uma intoxicação e na morte da larva (GARCEZ *et al.*, 2013).

O controle químico é uma das principais estratégias utilizadas e vem sendo utilizado desde a descoberta dos inseticidas sintéticos. Na década de 40 os inseticidas de origem natural foram substituídos pelos sintéticos, utilizando compostos das classes dos organoclorados, principalmente o DDT (diclorodifenil-tricloroetano), porém devido a sua falta de seletividade, seu uso causou grande impacto negativo ao meio ambiente (SILVA, 2017).

O uso indiscriminado dos organoclorados mostrou a necessidade do surgimento de novos inseticidas sintéticos, que apresentassem maior seletividade, de modo que não destruíssem os inimigos naturais dos insetos-alvos. Frente a essa nova perspectiva surge os organofosforados, carbamatos e piretroides, compostos que apresentam meia-vida curta e conferem certa estabilidade no meio ambiente (LUNA *et al.*, 2004).

A necessidade de aplicação de dosagens cada vez maiores desses produtos e do uso por longos períodos, tem levado ao surgimento de populações de insetos resistentes, pois acabam desenvolvendo mecanismos de defesa para a sua sobrevivência e ao surgimento de efeitos tóxicos em humanos e animais, ocasionando a redução da eficácia desses agentes (FERREIRA; SILVA-FILHA, 2013).

3.3 *Aedes aegypti*: Principal vetor das arboviroses

Aedes aegypti é um mosquito de hábito diurno, principalmente no início da manhã e no final da tarde; tem preferência por ambientes urbanos e intradomiciliares por possuírem facilidade de proliferação nesses locais, visto que o vetor se desenvolve principalmente em água limpa, parada de preferência em recipientes artificiais; e alimenta-se principalmente de sangue humano (SANTOS, *et al.*, 2017).

A proliferação do mosquito é feita pela postura de ovos pela fêmea em coleções de água parada onde posteriormente eles eclodem originando as larvas. O tempo decorrido entre a eclosão do ovo e o mosquito adulto é cerca de 10 dias, sendo influenciado por fatores como a temperatura, que acelera esse processo. O ovo do mosquito sobrevive por até um ano fora da água, aguardando condições ambientais favoráveis para se desenvolve (DIAS, *et al.*, 2010).

3.3.1 Ciclo de vida

O ciclo do arbovírus ocorre em três fases aquáticas: ovo, larva e pupa, e a fase terrestre: adulta. O início desse ciclo ocorre durante o repasto sanguíneo do vetor (Fêmea), que ao sugar o sangue do indivíduo infectado, adquire o vírus e promove sua propagação, como podemos observar na Figura 4 (CARVALHO, MOREIRA, 2017).

Figura 4 - Ciclo biológico do *Aedes aegypti*.



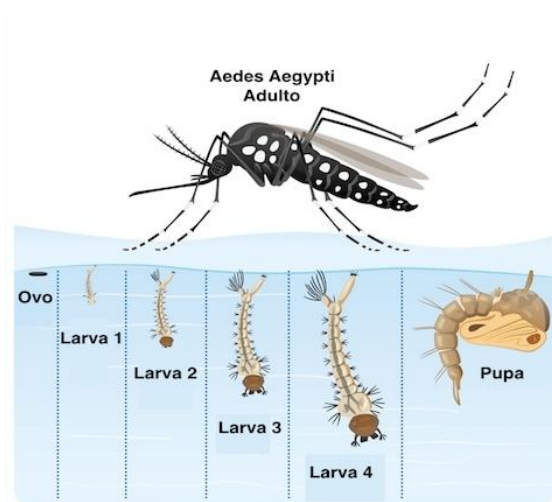
Fonte: Universidade Federal do Maranhão, 2016.

O mosquito vive em média 30 dias, segundo Anjolette e Marcoris (2016) as fêmeas podem liberar cerca de 150 a 200 ovos quando férteis. Ao ser infectado o mosquito vai depositar novos vetores infectantes em forma de ovo, onde seu desenvolvimento pode ser influenciado por fatores intrínsecos da espécie e fatores ambientais que variam de acordo com a região. O ciclo de vida (Figura 5) pode possuir padrões diferentes, com isso pode haver

uma variação em cada uma das etapas de acordo com a região que for analisada e com o tipo de água em que ele se proliferou (BESERRA, CASTRO-JUNIOR, 2008; CASTRO -JUNIOR *et al.*, 2013).

Os ovos são pequenos, elípticos, sua cor varia, inicialmente apresenta uma coloração clara e com o tempo escurece, essa é uma das fases de mais resistência do vetor, mantendo-se viável por vários meses até entrar em contato com a água, ocorrendo sua eclosão e levando dois a três dias em média para se transformar em larva (CARVALHO, MOREIRA, 2017).

Figura 5 - Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*.



Fonte: CCD, 2018.

As larvas apresentam um aspecto vermiforme, composto de cerdas e dividido em cabeça, tórax e abdômen. A cabeça envolve um par de antenas, olhos compostos e aparelho bucal do tipo mastigador-raspador. À frente da cabeça encontram-se as escovas orais ou palatais, que quando em movimento promovem correntes hídricas na água que trazem para a boca das larvas pequenas partículas para que possam se alimentar (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; ALMEIDA, 2011).

O tórax apresenta-se globoso e mais largo que a cabeça, o abdome é cilíndrico, mais estreito, possui oito segmentos aparentes e, mais dois que são reduzidos e modificados em ânus e genitália externa. No oitavo segmento, está localizado o sifão respiratório, que se caracteriza como curto, grosso e escuro (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; HARBACH, 2013).

O tempo de desenvolvimento na fase larval pode variar de acordo com o tipo de água e a temperatura. Nesse estágio as larvas se alimentam através de materiais orgânicos dispersos na água até transformarem-se em pupa, a variação na quantidade de alimentos, também influencia nessa transformação (BESERRA *et al.*, 2009; SERPA, 2014).

Na fase de pupa, apresentam o corpo dividido em cefalotórax e abdômen, ambos providos de cerdas e finalizando em paletas natatórias que auxiliam no mecanismo de locomoção. A cabeça e o tórax são unidos, constituindo assim o cefalotórax, que dá à pupa aparência de uma vírgula, quando vista de lado. No cefalotórax existem duas estruturas tubulares chamadas de trombetas respiratórias, onde se abrem os únicos espiráculos, os quais cortam a superfície da água permitindo a respiração da pupa (FORATTINI, 2002; ALMEIDA, 2011).

Após transformar-se em pupa, entra na fase de curta duração do ciclo, durando cerca de em média dois dias. Nessa etapa ocorre a transformação do sexo, onde macho vai se transformar primeiro que a fêmea. Na fase adulta ocorre o acasalamento e o início do ciclo gonotrofico (SERPA, 2014).

Ainda na fase adulta há uma diferença nas características dos mosquitos, a alimentação é inicialmente realizada por néctar vegetal, tanto na fêmea como no macho. Porém quando ocorre o acasalamento para dar continuidade ao ciclo gonotrofico a fêmea torna-se hematógrafa, e necessita do repasto sanguíneo, podendo vir a se contaminar com o vírus, caso tenha contato com um indivíduo infectado. Além disso, a fêmea consegue fazer ingestões múltiplas, aumentando assim a transmissão da doença (ZARA *et al.*, 2016; TERRA *et al.*, 2017).

Na forma adulta tanto a fêmea como o macho podem apresentar-se de cor preta, com machas brancas ou prateadas, podendo ainda apresentar variações em sua cor (CARVALHO SOUZA, 2017). Eles medem de 3 a 6 mm de comprimento, apresentam corpo com escamas. Seu corpo é nitidamente dividido em cabeça, tórax e abdômen (BESERRA, CASTRO-JUNIOR, 2008).

Na região da cabeça algumas características diferenciam machos e fêmeas, entre os olhos está presente um par de antenas e logo abaixo dessas, dois palpos, os machos exibem palpos mais longos e nas fêmeas são curtos, as antenas são plumosas nos machos e pilosas nas fêmeas. Ainda na região da cabeça, encontra-se um probóscide (conjunto de peças bucais, que são do tipo sugador), que nas fêmeas está adaptado à perfuração dos tegumentos para a realização do repasto sanguíneo (FORATTINI, 2002; ALMEIDA, 2011; LEITE; ASSOCIADO, 2011).

O tórax é dividido em protórax, mesotórax e metatórax, três pares de patas, dois orifícios respiratórios e um par de asas membranosas ligadas ao mesotórax. Estas asas são compridas, estreitas e com nervuras cobertas de escamas (RUEDA, 2008; ALMEIDA, 2011).

O abdômen é longo, delgado e apresenta oito segmentos. Na extremidade do último seguimento existem mais dois modificados onde encontram-se os orifícios genital e anal. A genitália feminina é menos complexa, quando comparada a dos mosquitos machos, sendo a masculina saliente e de importância para a sistemática (ALMEIDA, 2011).

3.4 Arboviroses emergentes no Brasil

As arboviroses são doenças causadas por vírus e transmitidas pela saliva contaminada de artrópodes hematófagos durante o repasto sanguíneo. Cinco famílias de arbovírus são causadoras de doenças em humanos, sendo elas Bunyaviridae, Togaviridae (vírus Chikungunya), Flaviviridae (vírus da Dengue, Zika e Febre Amarela), Reoviridae e Rhabdoviridae (AVELINO-SILVA; RAMOS, 2017).

Segundo o Ministério da Saúde, por meio da Portaria de Consolidação nº 4, de 28 de setembro de 2017, que unifica as normas sobre os sistemas e os subsistemas do Sistema Único de Saúde, as doenças: dengue, chikungunya e zika são de notificação compulsória e estão presentes na Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública, sendo consideradas um importante problema de saúde pública.

A emergência de arboviroses em locais antes indenes representa um potencial desafio para a Saúde Pública no Brasil, principalmente pelo potencial de dispersão, capacidade de adaptação a novos ambientes e hospedeiros, possibilidade de causar epidemias extensas e pela ocorrência de grande número de casos graves, com acometimento neurológico, articular e hemorrágico, além da inexistência de vacinas disponíveis como método profilático e de antivirais efetivos para o tratamento (LIMA-CAMARA, 2016; DONALISIO; FREITAS; VON ZUBEN, 2017).

3.4. 1 Vírus Dengue

A dengue é uma doença infecciosa, de origem viral, transmitida pela fêmea do mosquito do gênero *Aedes*. Existem quatro tipos distintos de vírus dengue, denominados vírus dengue tipo 1, 2, 3 e 4 ou, simplesmente, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (BRAGA; VALLE 2007). É um vírus esférico e envelopado, com diâmetro aproximado de 50 nm, contendo três proteínas estruturais (capsídeo C, membrana M e envelope E) e o RNA genômico (BRAGA; VALLE 2007).

Após picar uma pessoa infectada com um dos quatro sorotipos do vírus, a fêmea pode transmitir o vírus para outras pessoas. Uma mesma pessoa pode apresentar a doença até

quatro vezes ao longo da sua vida. A coexistência de diferentes sorotipos em uma mesma região aumenta a chance de se ter complicações como a febre hemorrágica da dengue (CASTRO-JUNIOR *et al.*, 2013).

Os programas de combate à dengue têm como principal foco o controle entomológico, através de métodos que incluem a eliminação ou controle de habitats, a aplicação de adulticidas e larvicidas, bem como o uso de agentes biológicos (BRASIL, 2009).

Dados epidemiológicos

Os dados publicados pelo Ministério da Saúde dos últimos dez anos, é possível observar que no ano de 2015 o Brasil atingiu o recorde de casos prováveis da doença com 1.688.688 casos, no ano de 2017 foram registrados 249.056 casos, representando uma redução de 595,69% dos casos, no ano subsequente diminuição de 99,33%%, porém em 2019, até a data de 24/08, o número de casos registrados representou um crescimento sete vezes maior que o total do ano anterior, sendo registrados 205.791 casos prováveis (BRASIL, 2016a; BRASIL, 2015a; BRASIL, 2017).

Até a semana epidemiológica 24 de 2022 ocorreram 1.172.882 casos prováveis de dengue (taxa de incidência de 549,8 casos por 100 mil hab.) no Brasil, sendo a Região Centro-Oeste com maior taxa de incidência de dengue, com 1.629,9 casos/100 mil hab., seguida das Regiões: Sul (983,9 casos/100 mil hab.), Sudeste (440,7 casos/100 mil hab.), Nordeste (284,8 casos/100 mil hab.) e Norte (223,2 casos/100 mil hab.) (BRASIL, 2022).

3.4.2 Vírus Zika

O vírus zika (ZIKV) pertence à família *Flaviviridae*, o gênero *Flavivirus*, foi isolado pela primeira vez em macaco Rhesus, em 1947, na Floresta Zika, em Uganda (DICK, KITCHEN, SHADOW, 1952). No Brasil, os primeiros casos humanos autóctones do vírus foram no ano de 2015, sendo transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti*, porém outras espécies de *Aedes* já foram confirmadas como transmissoras em diferentes locais do mundo (HEUKELBACH *et al.*, 2016).

Como todos os flavivírus, o ZIKV é envelopado e possui um capsídeo icosaédrico (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). A principal forma de infecção é pela picada de fêmeas infectadas do gênero *Aedes*, mas existem outras formas de transmissão como, transmissão vertical (da mãe para o filho, intrauterina), a transmissão através de transfusão de hemoderivados e através de relação sexual (ESPINOZA, 2017).

Dados epidemiológicos

Em 2015, dezoito estados tiveram casos confirmados, sendo notificados 17.765 casos, destes 6.784 foram confirmados, 1.926 descartados e 9.055 ficaram sob investigação. No mesmo ano foi notificado um total de 2.782 casos suspeitos de microcefalia relacionada à infecção pelo vírus Zika, identificados em 618 municípios distribuídos em 20 Unidades da Federação (BRASIL, 2015a).

No ano seguinte o número de casos prováveis foi doze vezes maior que 2015, distribuídos em 2.280 municípios, tendo sido confirmados 126.395 (59,7%) casos e oito óbitos pelo vírus. Em 2017, foram registrados 17.593 casos prováveis de febre pelo vírus Zika no país, destes, 8.703 (50,2%) foram confirmados (BRASIL, 2016a; BRASIL, 2017).

Em 2018, houve uma diminuição de 54% dos casos comparados a 2017, sendo registrados 8.024 casos prováveis no país, destes, 3.625 (45,2%) casos foram confirmados. Em 2022, segundo dados retirados do Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde ocorreram 5.699 casos prováveis até a semana epidemiológica 21, correspondendo a uma taxa de incidência de 2,7 caso por 100 mil hab. no País (BRASIL, 2018; BRASIL, 2022).

3.4.3 Vírus Chikungunya

A Febre do Chikungunya é causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV), pertencente à família Togaviridae e ao gênero Alphavirus (KUCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012). O vírus é envelopado, com capsídeo de simetria icosaédrica, tamanho de 60 a 70 nm de diâmetro, possui uma molécula de RNA positivo de cadeia simples, com codificação de quatro proteínas não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4) e três proteínas estruturais (C, E1, E2). O nucleocapsídeo é composto por monômeros da proteína C (MASON; HADDOW, 1957).

O CHIKV é transmitido mais comumente pela picada do mosquito *Aedes* infectado, entretanto, existe a transmissão vertical da mãe para o feto, ou por transfusão sanguínea (MADARIAGA *et al.*, 2016). No hospedeiro vertebrado o vírus é capaz de se replicar em menos de oito horas pós-infecção, em temperatura corporal normal (37°C), estabelecendo tropismo pelo tecido subcutâneo e fibroblastos (SOURISSEAU *et al.*, 2007; TENG *et al.*, 2011).

Dados epidemiológicos

O primeiro registro autóctone em território brasileiro ocorreu em 2014, na cidade do Oiapoque, no Amapá. Em 2015, foram registrados no país 38.332 casos prováveis de febre de chikungunya, distribuídos em 696 municípios e confirmação de 6 óbitos por febre de chikungunya, nos estados da Bahia, Sergipe, São Paulo e Pernambuco (BRASIL, 2015a).

No ano seguinte o número de casos prováveis foi aproximadamente 7 vezes maior (277.882) com uma taxa de incidência de 128,9 casos/100 mil hab., em 2017, houve diminuição de 33,53% dos casos prováveis (184.694) quando comparados ao ano anterior. O número de casos continuou tendo baixa em 2018, representando uma queda de 52,23% (BRASIL, 2016a; BRASIL, 2017; BRASIL, 2018).

Até a semana epidemiológica 24 de 2022 ocorreram 122.075 casos prováveis de chikungunya (taxa de incidência de 57,2 casos por 100 mil hab.) no Brasil. A Região Nordeste apresentou a maior incidência (175,7 casos/100 mil hab.), seguida das Regiões Centro-Oeste (28,8 casos/100 mil hab.) e Norte (26,6 casos/100 mil hab.) (BRASIL, 2022).

3.5 Emulsões e Nanoemulsões

A palavra emulsão deriva do latim *emulgeo*, que significa mungir, aplicando-se, de um modo geral, a todas as preparações de aspecto leitoso com as características de um sistema disperso de duas fases líquidas (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995). Sistemas emulsionados podem ser classificados de acordo com sua estabilidade termodinâmica e tamanho de gotículas (MISHRA, 2016).

As emulsões são dispersões compostas de duas fases líquidas imiscíveis que são misturadas usando cisalhamento mecânico e surfactante (KALE; DEORE, 2017). A fase dispersa é denominada fase interna e a fase dispersante é a fase externa ou fase continua (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007).

Três componentes principais constituem as emulsões: a fase aquosa, a fase oleosa e um sistema adequado de emulsificantes para manter as fases dispersas. A classificação das emulsões é feita de acordo com a natureza da fase externa e de acordo com a hidrofília ou lipofília da fase dispersante (CORDEIRO, 2012). Os sistemas emulsionados que apresentam fase dispersa oleosa e fase dispersante aquosa classificam-se como emulsões do tipo O/A (óleo em água) ao mesmo tempo em que, fase dispersa aquosa e fase dispersante oleosa classificam-se como emulsões A/O (água em óleo) (LIMA *et al.*, 2008).

As emulsões do tipo O/A possuem ótima capacidade de solubilização de substâncias e têm sido usadas para aumentar a estabilidade, a solubilidade e a biodisponibilidade de fármacos, pois permitem a incorporação de vários tipos de compostos na fase interna oleosa, na região interfacial ou na fase externa aquosa (OLIVEIRA et.al., 2004).

Com base no tamanho da gota, as emulsões são tipicamente categorizadas como macroemulsões (diâmetros de gotas maiores que 1 μm), nanoemulsões (com tamanho de gotas tipicamente entre 20 nm e 500 nm) e microemulsões (diâmetros de gotas na faixa entre 10 e 50 nm) (GAZOLU-RUSANOVA, *et al.*, 2020).

As emulsões são termodinamicamente instáveis e, portanto, tendem a quebrar ao longo do tempo devido a vários mecanismos físico-químicos, por esse motivo, os estabilizadores são incluídos nas formulações de emulsão para melhorar sua estabilidade em longo prazo. As propriedades físico-químicas dos componentes da formulação podem influenciar na obtenção da emulsão e na estabilidade do sistema. Quando não estáveis, as emulsões podem apresentar os seguintes fenômenos de instabilidade física:

Cremação (creaming): processo em que as gotículas tendem a se separar da fase externa da emulsão, emergindo ou sedimentando, de acordo com a diferença de densidade entre as duas fases (FRANZOL; REZENDE, 2015). A emulsão resultante terá duas porções uma contendo maior volume de fase externa e outro maior volume de fase interna (TOPAN, 2012).

Floculação: processo onde ocorre a agregação reversível das gotículas, com manutenção do filme interfacial, formando uma rede bidimensional, sem coalescência (TADROS, 2004; TOPAN, 2012).

Coalescência: Induzido pelo afinamento e ruptura do filme entre as gotículas, o processo ocorre quando duas ou mais gotículas da fase dispersa aproximam-se para a formação de uma única gotícula. Esse fenômeno é irreversível e pode resultar na separação das fases da emulsão (TOPAN, 2012).

Inversão de fase: pode ocorrer pelo grande aumento da fase dispersa, ordem de adição dos componentes da emulsão ou mesmo pela variação da temperatura (NAZARZADEH; ANTHONYPILLAI; SAJJADI, 2013).

Amadurecimento de Ostwald (Ostwald ripening): crescimento das gotas devido a solubilidade da fase oleosa, fazendo com que as gotas menores se dissolvam e as moléculas se reprecipitem nas gotas maiores (NAZARZADEH; ANTHONYPILLAI; SAJJADI, 2013).

As emulsões são estabilizadas pela adição de agentes emulsificantes que têm por função reduzir a tensão interfacial do sistema, decorrida da diferença de polaridade das fases interna e externa da preparação. De acordo com a hidrofília ou lipofília da fase dispersante, ou seja, a fase externa, esses sistemas podem ser classificados em emulsão água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A) (FRANZOL; REZENDE, 2015; KALE; DEORE, 2017).

Os emulsificantes são um dos estabilizadores mais importantes usados em qualquer formulação de emulsão. Além de sua capacidade de estabilizar emulsões, a natureza do emulsificante usado também determina a facilidade de formação de emulsões e os atributos funcionais do produto final. Consequentemente, a seleção de um emulsificante apropriado é uma das decisões mais importantes na formulação de produtos à base de emulsão (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018).

Os emulsionantes se dividem em emulsionantes aniônicos, catiônicos, não-iônicos e anfóteros. Os emulsionantes aniônicos contem como grupos polares aniônicos mais comuns os carboxilato, sulfato e o fosfato. A maioria dos emulsionantes aniônicos é produzida com cadeia carbônica entre 12-18 carbonos, pois nesta condição a solubilidade da porção oleosa é mais adequada (DALTIM, 2012). Como exemplos tem-se o estearato de sódio, lauril sulfato de sódio e cetil fosfato de potássio.

Os tensoativos catiônicos são compostos orgânicos que se dissociam em água e cuja parte polar apresenta carga positiva. Apresentam um ou mais grupamentos ionizáveis, fornecendo íons de carga positiva em solução aquosa (SILVA *et al*, 2015). Como exemplo tem-se o cloreto de estearil dimetil benzalcônico.

Os emulsionantes não-iônicos não se dissociam em íons em solução aquosa e, por isso, são compatíveis com qualquer outro tipo de emulsionante, sendo muito utilizados em formulações complexas como coemulsionante ou emulsionante secundário. Os mais comuns são os etoxilados, nos quais o grupo hidrofílico é formado por uma cadeia de moléculas de óxido de eteno polimerizada, fixada a uma parte apolar, como o monoestearato de sorbitan, monoestearato de glicerina e polissorbato (DALTIM, 2012).

Os tensoativos anfóteros são os que apresentam na mesma molécula um sítio positivo e um sítio negativo, onde a carga vai depender do pH do meio, em meios com pH abaixo de 4, atuam como tensoativos catiônicos, em pH entre 4 e 9 como tensoativos não iônicos, em meio com pH entre 9 e 10 tensoativos aniônicos, como exemplo do cocoamido propil betaína (SILVA, 2008).

3.5.1 Nanoemulsões

As nanoemulsões são sistemas dispersos entre dois líquidos imiscíveis que possuem gotículas em escala nanométrica, variando de 20 a 500 nm (GAZOLU-RUSANOVA *et al.*, 2020), são termodinamicamente instáveis, mas cineticamente estáveis em decorrência no diâmetro médio de suas gotículas, pois a frequência de choque entre elas é menor, permitindo que o sistema se mantenha disperso (JAISWAL, DUDHE, SHARMA, 2015).

Por serem sistemas cineticamente estáveis, fenômenos de instabilidade como floculação, cremagem e sedimentação, ocorrem com menor frequência, pois o movimento browniano supera fenômenos induzidos pela força da gravidade. A maturação de Ostwald é o principal mecanismo de instabilidade destes sistemas, por isso, as moléculas da fase dispersa devem ser essencialmente insolúveis na fase contínua para evitar tal fenômeno (SOLANS *et al.*, 2005).

A aparência, textura, propriedades reológicas e estabilidade das nanoemulsões são positivamente influenciadas pelo tamanho da gota (ASWATHANARAYAN, VITTAL, 2019). Podem apresentar-se transparentes ou translúcidas quando apresentam baixa concentração de gotículas e tamanho de gotícula menor que 200nm e aparência leitosa acima de 200nm e maior concentração de gotículas (TADROS, 2004; CAPEK, 2004; JAFARI, HE, BHANDARI, 2006).

O processamento das nanoemulsões é simples e de baixo custo, fato este têm gerado grande interesse em diversas áreas devido sua ampla gama de aplicações, incluindo o ramo alimentício (CHAUDHARY *et al.*, 2020), farmacêutico (ZHANG; ZHONG, 2020), petroquímicos (YANG *et al.*, 2014) cosméticos (GHARIBZAHEDI; MOHAMMADNABI *et al.*, 2016) e pesticidas (ZHANG *et al.*, 2020).

As nanoemulsões não se formam espontaneamente, sendo necessário o fornecimento de energia para o sistema. Elas podem ser preparadas por métodos de baixa energia ou alta energia de emulsificação (SOLÉ *et al.*, 2010).

Os métodos de baixa energia mais conhecidos e amplamente empregados são o método de inversão de fase pela temperatura, método da emulsificação espontânea e o método do ponto de inversão da emulsão. Eles utilizam propriedades físico-químicas do sistema emulsionado e utilizam a inversão espontânea na curvatura do tensoativo para a obtenção de glóbulos em escala nanométricas (CAMARGO, 2008).

Os métodos que utilizam alta energia para a emulsificação são baseados na geração de energia mecânica por meio da alta pressão de cisalhamento, de forma que a alta energia é

capaz de deformar e quebrar as gotículas da fase interna, formando glóbulos menores. Nessa técnica pode-se utilizar homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores, sonicação ou ultrassom (FERNANDEZ *et al*, 2004).

O Sonicador de Ponteira Ultrassônico transforma energia elétrica em energia mecânica, gerando ciclos de tensão e compressão dentro do líquido, formando microbolhas através do processo de cavitação, o que resulta na homogeneização de líquidos imiscíveis. A potência pode ser ajustada de 20 a 99%, variando de 0 a 99 minutos (CIENLAB, 2022).

Uma das vantagens de se utilizar os métodos que utilizam alta energia de emulsificação é o melhor controle da granulometria e a maior possibilidade de escolha dos constituintes da formulação (SONNEVILLE-AUBRUN; SIMONNET; L'ALLORET, 2004).

As nanoemulsões apresentam vantagens como a alta capacidade de solubilização tanto para ativos hidrofílicos quanto hidrofóbicos, pela presença do emulsificante na interface da gotícula. A melhora da solubilidade pode levar ao aumento da biodisponibilidade do ativo, diminuir a toxicidade e aumentar o efeito terapêutico (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; RAI *et al.*, 2018).

As nanoemulsões podem ainda melhorar a taxa de utilização de pesticidas, prolongando o período de controle, evitando a degradação dos ingredientes ativos, e aumentando a absorção do alvo, fornecendo, assim, maneiras eficazes, seguras no uso desses produtos (FENG *et al.*, 2020).

3.5.2 Estabilidade e Controle da Forma Farmacêutica

O estudo de estabilidade fornece dados para prever a estabilidade do produto e tempo de vida útil. A estabilidade de um sistema nanoemulsionado requer conhecimento quanto a composição, estrutura e suas propriedades, sendo as principais características relacionadas a gotícula e suas características físico químicas.

As características das gotas podem ser avaliadas quanto ao tamanho, composição, concentração, potencial zeta, polidispersividade e tensão interfacial. As propriedades físico químicas são avaliadas pelas propriedades ópticas, reológicas, pela separação gravitacional e agregação de gotículas e estabilidade química (SNEHA, KUMAR, 2022).

O potencial Zeta é uma medida de estabilidade eletrostática com uma carga positiva ou negativa. Quanto maior a carga de superfície do material, a nanoemulsão é mais estável. No caso de baixa carga superficial, as gotículas tendem a gravitar uma em direção à outra e

aumentar seu tamanho, o que causa uma diminuição na estabilidade da nanoemulsão (AHMADI, JAFARIZADEH-MALMIRI, 2020).

A polidispersidade é definida como a razão entre o desvio padrão e o tamanho médio das gotículas, implicando a uniformidade do tamanho das gotículas dentro de uma formulação. Para um tamanho de gota uniforme, a polidispersidade na formulação deve ser menor (JADHAV *et al.*, 2020).

As características como aspecto, cor, odor, sabor e sensação de tato, são parâmetros a serem avaliados que devem ser definidos dependendo das características do produto em estudo. Na avaliação físico-química, as análises são importantes para pesquisar alterações na estrutura da formulação que nem sempre são perceptíveis visualmente (ANVISA, 2004).

A análise do pH é um parâmetro fundamental para determinar a estabilidade das nanoemulsões, tendo em vista que variações do pH indicam a ocorrência de reações que degradam o óleo (MASMOUDI *et al.*, 2005).

O teste de centrifugação produz estresse na amostra simulando um aumento na força de gravidade, resultando em um aumento da mobilidade das gotículas, antecipando possíveis instabilidades como precipitação, separação de fases, formação de *caking*, coalescência entre outras, observados visualmente após o processo (ANVISA, 2004).

3.6 Técnicas de Caracterização

3.6.1 Cromatografia Gasosa

A cromatografia é um método físico-químico de análise empregado tanto na separação de compostos químicos como na identificação e quantificação das espécies separadas. A cromatografia gasosa é utilizada para a separação e quantificação de compostos voláteis ou semivoláteis com características semelhantes em misturas complexas. É a técnica mais utilizada na determinação do perfil de ácidos graxos dos óleos vegetais. Por possuírem baixa volatilidade, os ácidos graxos passam por uma etapa de derivatização, para que os metil-ésteres mais voláteis possam ser detectados (GUNSTONE, 2004; SOLÍS- FUENTES *et al.*, 2010; WALIA *et al.*, 2014).

Os compostos a serem separados são arrastados por um gás inerte (fase móvel), através da fase estacionária, sem alterar sua estrutura e conduzi-la ao detector com o mínimo de interferência possível. Os gases mais utilizados são o hélio (He), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e argônio (Ar). A função da fase estacionária na coluna é separar componentes diferentes através de processos físicos e químicos, levando a uma saída pela coluna em um

tempo diferente (tempo de retenção), ela pode ser um material líquido ou sólido (PERES, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Os detectores têm a função de converter o analito eluído da coluna em sinal eletrônico, o qual é enviado para o sistema de dados. A grandeza do sinal é representada em função do tempo e apresentada na forma de um cromatograma (NASCIMENTO *et al.*, 2018). O detector por ionização de chama é o mais utilizado na análise de ácidos graxos (GUNSTONE, 2004), ele detecta a formação de íons pela combustão da amostra na presença de H_2 e O_2 , originando uma corrente elétrica no coletor gerando um sinal (PENTEADO; MAGALHÃES; MASINI, 2008).

3.6.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho

Espectroscopia de Absorção no Infravermelho é a ciência que estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria (SKOOG *et al.*, 2002), sendo um dos seus objetivos principais a identificação das moléculas (MERCÊ *et al.*, 2001). A espectroscopia de absorção no infravermelho estuda a transição das vibrações moleculares normais.

A região do infravermelho (IV) estende-se dos 3×10^{11} Hz até aproximadamente os 4×10^{14} Hz e é subdividida em três regiões: o IV-próximo (próximo da luz visível: 4000 a 12820 cm^{-1}), o IV-médio (400 a 4000 cm^{-1}) e o IV-distante (10 a 400 cm^{-1}) (LIMA, e BAKKER, 2011).

A maior parte dos estudos em IV refere-se à região média (MIR), onde se localizam as frequências vibracionais fundamentais, que correspondem às transições vibracionais entre o nível de energia vibracional fundamental e o primeiro nível vibracional excitado. A região de 400 a 1800 cm^{-1} é conhecida como a região da impressão digital do espectro IV, pois é nessa região que aparecem a maior parte das frequências vibracionais fundamentais (KAWANO, 2017).

As vibrações podem ser do tipo estiramento de ligação, deformação angular e torção. A vibração normal de estiramento pode ser simétrica ou assimétrica, enquanto que a deformação angular pode ocorrer no plano, como do tipo tesoura e rotação e fora do plano, como as deformações do tipo balanço e torção (KAWANO, 2017).

A radiação no infravermelho atravessa a amostra a ser analisada, a radiação transmitida é comparada com aquela transmitida na ausência de amostra. O espectrômetro registra o resultado na forma de uma banda de absorção, fornecendo evidências da presença

de vários grupos funcionais na estrutura orgânica devido à interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em um processo de vibração molecular. A radiação no infravermelho faz com que átomos e grupos de átomos de compostos orgânicos vibrem com amplitude aumentada ao redor das ligações covalentes que os ligam (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 2000).

Cada pico num espectro de infravermelho corresponde a um grupo funcional particular, eventos como desaparecimento, surgimento ou deslocamento de bandas características fornecem indicativos de interações entre o fármaco e outras substâncias (GIL *et al.*, 2007).

A refletância total atenuada opera medindo as mudanças que ocorrem em um feixe interno de infravermelho totalmente refletido quando o raio entra em contato com uma amostra. Em regiões do espectro de infravermelho onde a amostra absorve energia, o sinal é atenuado. O sinal atenuado volta para o feixe de infravermelho e, em seguida, sai pela extremidade oposta do cristal e é transmitido para o detector do espectrofotômetro (PERISSINATO, 2016).

A espectroscopia no infravermelho tem sido usada devido à confiabilidade nos dados gerados em relação à caracterização, identificação e quantificação da estrutura da amostra analisada. Além disso, uma das suas características é permitir análises utilizando amostras em diferentes estados físicos como sólidos, líquidos e gasosos (SKOOG *et al.*, 2002; SHAI, 2010).

As vantagens desta técnica sobre outros métodos incluem a rapidez na aquisição dos espectros, melhor relação sinal-ruído, alta resolução espectral, além de apresentar boa reprodutibilidade (SMITH, 1999).

3.6.3 Análise Térmica

A análise térmica compreende um conjunto de técnicas, cada uma com a habilidade de avaliar uma propriedade física específica. A termogravimetria/ termogravimetria derivada (TG/DTG), a análise térmica diferencial (DTA) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) são as técnicas termoanalíticas mais difundidas e empregadas para o desenvolvimento de diferentes estudos e aplicações (IONASHIRO, 2004; DENARI; CAVALHEIRO, 2012).

Os métodos térmicos podem ser empregados para diferentes aplicações, como: determinação de constantes térmicas; mudança de fases e equilíbrio de fases; mudanças

estruturais; estabilidade térmica; decomposição térmica; reatividade química; caracterização de materiais; análises qualitativas; análises quantitativas de misturas; controle de qualidade – pureza; estudos cinéticos; estudos termodinâmicos; efeitos de solvatação e hidratação (DENARI; CAVALHEIRO, 2012).

A termogravimetria (TG) é uma técnica em que a variação da massa da amostra, perda ou ganho, é resultante de uma transformação física ou química em função do tempo ou da temperatura enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de aquecimento (MANSUR, 2007; MOTHÉ E AZEVEDO, 2009).

Por meio da TG é possível avaliar os fenômenos químicos e físicos (GIOLITO, 1988; ARAÚJO, 2003; PEREIRA *et al.*, 2009), além de possibilitarem a obtenção de informações de natureza qualitativa e/ou quantitativa como estabilidade e composição de amostras, composição de algum composto intermediário que pode ter sido formado e ainda a composição de resíduos (FLEMMING; PICKER-FREYER, 2008; MOTHÉ; AZEVEDO, 2009).

Na Análise Térmica Diferencial (do inglês *Differential Thermal Analysis*) as variações de temperatura na amostra são devidas às transições entálpicas ou reações endotérmicas ou exotérmicas (MOTHÉ; AZEVEDO, 2009; PINTO, 2017).

As curvas DTA representam os registros de diferença de temperatura (ΔT) em função da temperatura (T) ou do tempo (t), de modo que os eventos são apresentados na forma de picos, caracterizando eventos exotérmicos e os descendentes endotérmicos (SILVA, PAOLA, MATOS, 2007).

A técnica pode ser utilizada na identificação qualitativa ou quantitativa de compostos inorgânicos e orgânicos, tais como argilas, metais, minerais, gorduras, óleos, materiais poliméricos, carvão, madeira e outras substâncias (MOTHÉ; AZEVEDO, 2009).

A Calorimetria Exploratória Diferencial (do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) é uma técnica derivada da DTA, que permite a detecção qualitativa e quantitativa de todos os processos em que requer produção de energia (transformação de fase endotérmica ou exotérmica). A diferença entre DSC e DTA é que a primeira é um método calorimétrico no qual são medidas diferenças de energia. Na DTA, são registradas diferenças em temperatura (DENARI; CAVALHEIRO, 2012).

A Calorimetria Exploratória Diferencial é utilizada para medir a diferença de fluxo de calor entre uma substância e um material de referência em função de um programa de

aquecimento ou resfriamento, de tal maneira que a temperatura das duas é mantida cristalina (SILVA *et al.*, 2007; MOTHE; AZEVEDO, 2009; OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011).

Na área farmacêutica essa técnica é utilizada na caracterização térmica e determinação da pureza de fármacos, estudos de compatibilidade entre os constituintes da formulação e identificação de polimorfismo com determinação das entalpias de cada forma cristalina (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011).

Frente ao que foi exposto é notória a importância dos processos de caracterização e padronização de uma matéria-prima para o desenvolvimento de uma formulação com alto padrão de qualidade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo faz parte de um projeto cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número A3DC8A5, em atendimento ao previsto na Lei 13.123, de 2015 (BRASIL, 2015b). Para a identificação botânica HUAM12072 (herbário da Universidade Federal do Amazonas), foi coletada uma amostra da espécie do local indicado pelo fornecedor de onde vem à matéria-prima.

4.1 Obtenção da matéria-prima

As sementes do fruto *Euterpe oleracea* foram obtidas na cidade de Itacoatiara-AM, Km.9, 3.00S e 58.45W, em fevereiro de 2018, já despulpadas do fornecedor local (Figura 6). A lavagem para retirada de resíduos da polpa da semente foi feita em água corrente, em seguida foram acondicionadas em cestos plásticos, com circulação de ar, permanecendo em temperatura ambiente até completa secagem. A amostra antes de ser triturada foi submetida à secagem em estufa (ETHIK TECHNOLOGY®) a temperatura de 35°C, por um período de 4 horas, retirada das fibras que recobrem a semente, posteriormente submetidas a moagem em moinho de facas (SL 31 – SOLAB®), mesh 10, a fim de facilitar o processo extrativo.

Figura 6 - Sementes de *E. oleracea* descartadas pelo fornecedor local em Itacoatiara - AM.



Fonte: Dados da pesquisa.

4.2 Métodos de extração

Foram avaliados dois métodos extrativos, por soxhlet e ultrassom, em ambas as metodologias o solvente de escolha foi o Hexano.

Na metodologia por ultrassom sem aquecimento, foi realizado planejamento fatorial do tipo 3^2 , com dois fatores em três níveis avaliando os parâmetros de: tempo de extração e a relação massa/solvente (Tabela 1), em ciclos ininterruptos, adaptado da metodologia de Silva e colaboradores, 2015.

Tabela 1 - Planejamento fatorial para extração do óleo da semente de *E. oleracea* por Ultrassom.

Nr.	Nível	
	Proporção (massa/solvente)	Tempo (min)
F1	+ [1/2]	+ [60]
F2	+ [1/2]	0 [90]
F3	+ [1/2]	- [120]
F4	0 [1/4]	+ [60]
F5	0 [1/4]	0 [90]
F6	0 [1/4]	- [120]
F7	- [1/6]	0 [60]
F8	- [1/6]	0 [90]
F9	- [1/6]	0 [120]

Fonte: Dados da pesquisa

Na metodologia por soxhlet foi avaliado apenas o tempo de extração, adaptado da metodologia de Meyer, 2013 (Tabela 2).

Tabela 2 - Extração do óleo da semente de *E. oleracea* por Soxhlet.

Nr.	Nível	
	Proporção (massa/solvente)	Tempo (h)
F1	[1/6]	[6]
F2	[1/6]	[12]
F3	[1/6]	[24]
F4	[1/6]	[42]

Fonte: Dados da pesquisa

O rendimento para ambos os métodos, foi calculado conforme a equação a baixo:

$$\text{Eq. 1 } R (\%) = (M \div Bm) \times 100$$

Onde:

M = massa do óleo extraída (mL)

Bm= biomassa vegetal (g).

4.3 Caracterização físico-química do óleo

4.3.1 Densidade de Massa e Densidade relativa

Densidade de massa (ρ) de uma substância é a razão de sua massa por seu volume a 20°C. A densidade de massa da substância (ρ_t) em uma determinada temperatura (t) é calculada a partir de sua densidade relativa d_t^t pela fórmula abaixo, expressa em g/mL ou kg/L (BRASIL, 2019).

$$\text{Eq. 2 } \rho_t = d_{(água)} \times d_t^t + 0,0012$$

A densidade relativa de uma substância é a razão de sua massa pela massa de igual volume de água, ambas a 20 °C (d_{20}^{20}) ou por massa de igual volume de água a 4 °C (d_4^{20}):

$$\text{Eq. 3 } d_4^{20} = 0,998234 \times d_{20}^{20}$$

Foi utilizado um picnômetro limpo e seco, com capacidade de 5 mL, previamente calibrado. A amostra foi transferida para o picnômetro e efetuada a pesagem. O peso da amostra foi obtido através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. Foi realizado o ajuste de temperatura de acordo com o preconizado na farmacopéia.

4.3.2 Índice de Refração

O índice de refração é característico para cada tipo de óleo, dentro de certos limites. Está relacionado com o grau de saturação das ligações, mas é afetado por outros fatores tais como: teor de ácidos graxos livres, oxidação e tratamento térmico. Este método é aplicável a todos os óleos normais e gorduras líquidas.

O refratômetro de Abbe modelo 2WAJ, marca ATTO[®], foi previamente calibrado com água, a 20°C, com temperatura ajustada por meio de um banho de água com termostato controlado e circulação de água.

A amostra foi previamente aquecida, para que estivesse no estado líquido no momento da análise. Foi colocado duas gotas da amostra no prisma e realizada a leitura (LUTZ, 2008).

4.3.3 Umidade

O método por análise termogravimétrica foi realizado utilizando uma termobalança modelo TGA 60 Shimadzu®, na faixa de temperatura entre 27 e 600°C, sob atmosfera dinâmica de ar (50 mL/min), razão de aquecimento 10°C/min e cadinho de platina contendo massa de amostra de 5 mg. A calibração do instrumento foi verificada antes dos ensaios empregando-se um padrão de oxalato de cálcio monoidratado, conforme norma ASTM E1582-93 (The American Society for Testing and Materials, 1993) (ARAÚJO, 2003; STORPIRTIS *et al.*, 2011).

No método termogravimétrico, as percentagens de umidade foram determinadas considerando os valores percentuais extraídos diretamente das curvas termogravimétricas. O teor de umidade foi obtido a partir da primeira etapa de perda de massa entre 27 e 105°C.

4.3.4 Índice de Acidez

O índice de acidez foi realizado de acordo com o método proposto pelo Instituto Adolf Lutz (2008).

Foram pesados 2 g da amostra e dissolvidos em 25 mL de uma solução éter-alcool (2:1). Adicionaram-se 2 gotas de fenolftaleína a 1%, com posterior titulação com a mistura de hidróxido de sódio 0,1M, até o aparecimento da cor rósea persistente por 30 seg.

$$\text{Eq. 4 } I_a = (V \times f \times N \times 5,61) \div m$$

Onde:

V = n° de mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M gasto na titulação.

f = fator da solução de hidróxido de sódio.

m = n° de g da amostra.

4.3.5 Índice de Saponificação

O índice de saponificação (I_s) exprime, em miligramas, a quantidade de hidróxido de potássio necessária para neutralizar os ácidos livres e saponificar os ésteres existentes em 1 g de substância. O I_s fornece indícios de adulterações da matéria graxa com substâncias insaponificáveis (BRASIL, 2019).

O índice de saponificação foi determinado segundo o método descrito pela 6ª edição da Farmacopéia Brasileira (2019), utilizando 2,0 g de amostra.

$$\text{Eq. 5 } I_s = 28,05 (n_1 - n_2) \div m$$

Onde:

n_1 = volume de HCl gasto na titulação do branco (mL)

n_2 = volume de HCl gasto na titulação da amostra (mL)

m = massa de amostra em gramas.

4.3.6 Análise Estatística

Os valores foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão, utilizados quando necessário, os testes t de Student e ANOVA (análise da variância) seguido por teste de Turkey, onde os valores de $p < 0,05$ serão considerados significantes.

4. 4 Espectroscopia por absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro na região do infravermelho foi obtido utilizando-se o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de seleneto de zinco. A amostra analisada foi transferida diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR, sendo o resultado obtido da média de 10 varreduras, de 4000 a 650 cm^{-1} , na resolução de 4 cm^{-1} .

4. 5 Estudos de Análise Térmica

A análise termogravimétrica TG foi realizada em termobalança, modelo TGA Q60, da marca Shimadzu®, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min^{-1} , sendo a massa da amostra de cerca de 3 mg (± 0.4 mg) de óleo de açaí, acondicionadas em cadinho de alumina, na faixa de temperatura de 25-600°C, na razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹. O oxalato de cálcio foi utilizado para calibrar a escala de temperatura e a perda de massa.

A curva DSC foi obtida utilizando Calorímetro Shimadzu® DSC-60 interligado ao software Shimadzu® TA-60WS com atmosfera de nitrogênio de 50 mL.min^{-1} e razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, na faixa de temperatura de 25-300°C. A amostra foi colocada em

porta-amostra de alumina hermeticamente fechada com massa de 3 mg ($\pm 0,2$ mg). Lítio e zinco foram utilizados para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia.

4. 6 Perfil fitoquímico

A identificação dos constituintes químicos do óleo da semente do açaí foi analisada com um Cromatógrafo a gás acoplado a um Espectrômetro de Massas (Shimadzu GC-MS 17A/ QP5050), equipado com coluna capilar Factor Four-VB-5ms (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 μ m de espessura de filme), utilizando hélio como gás de arraste a uma vazão de 1 mL/min e pressão de 5,8 psi. A programação da temperatura do forno foi de 70 °C (4 min.), a 280 °C (15 min.) e posteriormente de 4 °C/min. até 290 °C com uma temperatura do injetor a 280 °C, interface a 280 °C e fonte de íons a 220 °C. Injetou-se 1 μ L de solução da amostra em hexano a uma razão de *split* 1:5. Os espectros de massa foram obtidos na faixa de varredura de 40-500 u.m.a e uma energia de impacto de elétrons de 70 eV. A identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação com os valores tabelados por Adams (2007) e os dados da biblioteca (Nist 11).

4.7 Doseamento de Ácidos Graxos Essenciais

As análises foram realizadas em um cromatógrafo à gás Master, detentor de ionização de chama HP5890, utilizando uma coluna capilar CarboWAX® 60m x 0,25 μ m x 1 μ c. O gás de arraste foi o hidrogênio com fluxo de 2mL.min⁻¹, split 1:20, temperatura do injetor de 180°C e temperatura do detector de 200°C. A temperatura da coluna foi de 160°C em processo isotérmico com volume de injeção de 1 μ L.

A identificação qualitativa dos ésteres dos ácidos graxos foi realizada através da comparação entre os cromatogramas do padrão de ésteres de ácidos graxos da Supelco® (contendo uma mistura de 37 ácidos graxos).

Esterificação dos ésteres dos ácidos graxos:

Os triacilgliceróis do óleo foram esterificados seguindo a metodologia da Hartman e Lago (1973). O reagente de esterificação foi preparado contendo 2g de cloreto de amônio, 60 mL de metanol e 3 mL de ácido sulfúrico concentrado, refluxado por 15 minutos.

Transesterificação:

Foram pesados 0,5g do óleo da semente do açaí, adicionados 5 mL de solução de hidróxido de sódio 0,5N em metanol e refluxados por 5 minutos e em seguida adicionado 15

mL do reagente de esterificação e refluxados por mais 3 minutos. Após resfriar, a mistura foi transferida para um funil de separação e adicionado 5 mL de pentano e 10 mL de água saturada com cloreto de sódio.

O funil foi agitado vigorosamente por alguns segundos e deixado em repouso para separação completa das duas fases e remoção da fase inferior (água, cloreto de sódio, excesso de álcool, glicerol e hidróxido de sódio). A fase superior foi transferida para um recipiente e submetido a análise em CG.

4. 8 Avaliação do potencial citotóxico *in vitro*

4.8.1 Cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram mantidas em garrafas de polipropileno, contendo meio *Dulbeco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco by Life Technologies) e 50 µg/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco by Life Technologies), em estufa umidificada a 37° C e 5% de CO₂. O crescimento celular foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio ótico invertido e a troca do meio de cultivo ocorreu sempre que o limite de confluência das células foi alcançado, ou quando houve necessidade de repor nutrientes. Para a manutenção das linhagens, foi utilizada solução de tripsina EDTA a 0,25% (Gibco by Life Technologies) para destacar as células das garrafas de cultura.

4.8.2 Avaliação da citotoxicidade pelo método Alamar Blue®

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada em diferentes linhagens tumorais humanas: hepatocarcinoma humano (HEP-G2), carcinoma de color retal humano (HCT116), melanoma murino (B16F10), carcinoma escamocelular oral (CAL27) e uma linhagem de fibroblastos humanos (MRC5).

O ensaio de Alamar Blue® foi realizado segundo metodologia descrita por Ahmed, Gogal e Walsh (1994). As células foram semeadas na concentração de 5×10^3 células/poço em microplacas de 96 poços. A fim de determinar os valores de CI₅₀ (índice de citotoxicidade que causa a morte celular de 50%), as células foram tratadas com o óleo da semente de *E. oleracea* 50 µg/mL (triplicata). O grupo controle recebeu 0,02% de dimetilsulfóxido (DMSO) estéril. A doxorrubicina foi usada como controle positivo para todas as linhagens tumorais. Após 72 horas de tratamento, 10 µL da solução de Alamar Blue® 0,4% foi

adicionado em cada poço da placa e após 2h de exposição à fluorescência foi medida em leitor de microplaca (DTX800 Beckman e Coulter). A determinação do valor de CI_{50} foi realizada por teste de regressão não-linear através do software GraphPad Prism 6.0.

4.9 Preparo da Emulsão

Foram preparadas emulsões simples à base do óleo de *E. oleracea* para a realização do ensaio de atividade larvícida, pupícida e toxicidade aguda.

As emulsões foram preparadas no dia dos testes em que foram utilizadas, armazenadas em frascos de vidro transparente, fechados hermeticamente, sendo preparado apenas um lote de bancada para cada concentração de óleo que foi utilizada.

Para os testes de atividade larvícida as emulsões continham o óleo nas concentrações a serem testadas, que variou de 0,45 a 6,8 $mg.mL^{-1}$, 0,4 mL de tween 80 que foi utilizado como tensoativo e água q.s.p 1mL.

Para os testes de atividade pupícida as emulsões continham o óleo nas concentrações a serem testadas, no intervalo de 1,7 - 13,6 $mg.mL^{-1}$, 0,4 mL de tween 80 que foi utilizado como tensoativo e água q.s.p 1mL.

Para o teste de toxicidade aguda foi utilizado 2000 $mg.kg^{-1}$ de animal do óleo de *E. oleracea* e 0,4 mL de tween 80 que foi utilizado como tensoativo e água q.s.p 1mL.

4.10 Ensaios inseticidas

4.10.1 Atividade larvícida

Para avaliação da atividade larvícida do óleo, foram utilizadas larvas de *Aedes aegypti* entre o terceiro e quarto instar (4 a 5 dias de vida) oriundas de uma colônia de terceira geração, estabelecida no Laboratório de Pesquisa de Toxicologia do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), a partir de ovos da linhagem *Rockefeller*. Para a realização dos ensaios biológicos, foi utilizada a metodologia adaptada de World Health Organization (1970).

Os experimentos foram conduzidos em sala climatizada, com temperatura média de 27°C e umidade média de 70%. Para o ensaio larvícida foram utilizadas 30 larvas por repetição, totalizando 120 larvas por tratamento. As larvas foram coletadas com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* e postas em recipientes semi acrílico (6,5 cm de altura x 5,0 cm de largura). As larvas foram expostas à emulsão contendo óleo de açaí na faixa de concentração

de 0,45 – 6,8 mg/mL, 0,4 mL tween 80 e água q.s.p para o volume de 1mL. No grupo controle foi utilizada a mesma concentração de tween 80 e água destilada. As observações da mortalidade das larvas foram feitas em sete intervalos na faixa de 30min a 24h, após o início do experimento.

4.10.2 Atividade pupicida

Para avaliação da atividade pupicida do óleo, as pupas de *Aedes aegypti* foram coletadas até 14 horas após o estágio oriundas de uma colônia de terceira geração, estabelecida no Laboratório de Pesquisa de Toxicologia do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), a partir de ovos da linhagem *Rockefeller*. Para a realização dos ensaios biológicos, foi utilizada a metodologia adaptada de World Health Organization (1970).

Os experimentos foram conduzidos em sala climatizada, com temperatura média de 27°C e umidade média de 70%. Para o ensaio pupicida foram utilizadas 30 pupas por repetição, totalizando 120 pupas por tratamento. As pupas foram coletadas com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* e postas em recipientes semi acrílico (6,5 cm de altura x 5,0 cm de largura). As pupas foram expostas à emulsão contendo óleo de açaí nas concentrações no intervalo de 1,7 - 13,6 mg mL⁻¹, 0,4 mL tween 80 e água q.s.p para o volume de 1mL. No grupo controle foi utilizada a mesma concentração de tween 80 e água destilada. As observações da mortalidade das pupas foram feitas em sete intervalos na faixa de 30min a 24h, após o início do experimento.

4.10.3 Análises estatísticas para o ensaio larvicida e pupicida sobre *Aedes aegypti*

Os percentuais de mortalidade de larvas e pupas foram submetidos ao teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade e a relação entre a mortalidade e o tempo de exposição, foi obtida a partir da análise de regressão linear.

4.11 Toxicidade aguda (Dose Letal 50)

Os testes foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob protocolo de nº 0069/2019. Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Farmacologia e Cancerologia

Experimental do Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

O teste de toxicidade oral aguda foi realizado segundo o protocolo experimental Guideline 423 (OECD 423; 2001) com doses sequenciais, seguindo a proposta da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.11.1 Animais

Foram utilizadas fêmeas nulíparas de camundongos albinos *Mus musculus*, pesando entre 30 e 45 gramas e com idades entre 90 e 120 dias, oriundas do Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE. Os grupos experimentais de camundongos continham três animais por grupo.

4.11.2 Protocolo Experimental

Para avaliação da toxicidade aguda e determinação da dose letal 50 (DL50) foi utilizada a metodologia preconizada pela Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (Organization for Economic Co-operation and Development-OECD), adotando-se o guia OECD 423/2001, o qual recomenda a utilização de fêmeas adultas de camundongos albinos *Mus musculus*. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno, com três animais por grupos, com condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/12 h escuro) e temperatura de 25 ± 2 °C. A alimentação foi suspensa por, no mínimo 4 horas, antes do experimento e a água liberada *ad libitum*, a alimentação foi reintegrada após 3 horas da administração.

Inicialmente três animais foram submetidos à administração da dose máxima preconizada de 2000mg kg^{-1} do óleo de açaí solubilizado com Polysorbate (Tween 80) e água destilada, caso fosse observado morte após a administração, essa dose seria reduzida para 300mg/kg , e sequencialmente para 50 e 5mg kg^{-1} caso necessário. A administração foi realizada por gavagem e a observação individual nas duas primeiras horas após receberem a dose inicial do tratamento, e periodicamente durante 14 dias. Após um mês, foi repetido o teste de dose máxima, para confirmação dos resultados. O manejo e cuidado com os animais seguiram os princípios éticos da experimentação animal segundo critérios estabelecidos pelo CEUA.

4.11.3 Acompanhamento, análise bioquímica e histopatológica

Após a administração da dose por via oral, os animais foram acompanhados nas primeiras 2 horas, periodicamente nas primeiras 24 horas e diariamente por 14 dias. Cada animal foi marcado de forma diferente para posterior acompanhamento. As marcações foram realizadas com uma caneta marcadora permanente correspondente aos números ordinais de 1 a 3. Os animais foram observados quanto às diversas reações comportamentais relacionadas com o Sistema Nervoso Central (SNC) (efeitos estimulantes e depressores) e com o Sistema Nervoso Autônomo (SNA), seguindo os parâmetros preconizados por Malone (1977).

A massa corporal de cada animal e os parâmetros fisiológicos (consumo de ração, água e produção de excretas) foram acompanhados diariamente. Ao fim do período de observação todos os animais sobreviventes foram eutanasiados e autopsiados. Foram coletadas amostras de sangue para realização dos parâmetros bioquímicos e hematológicos e os órgãos (fígado, baço, rins e pulmão), foram lavados e fixados em formaldeído a 10% durante 24 horas, e posteriormente lavados com água destilada e processados em concentrações crescentes de álcool (70, 80, 90 e 100 %), embebidos em parafina e corados pela técnica de hematoxilina-eosina subsequentemente foram analisados em microscopia.

4.11.4 Análises estatísticas para os ensaios da avaliação toxicológica aguda

Os dados bioquímicos foram avaliados utilizando a ANOVA e teste de Tukey, onde os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4.12 Estudo de compatibilidade frente a excipientes

Foram preparadas misturas binárias na proporção de 1:1(m:m) do óleo da semente de *E. oleracea* e dos excipientes Monooleato de sorbitano (Span 80) e Polissorbato 80 (Tween 80), os quais após homogeneização foram analisados por análise termogravimétrica e por Espectroscopia por absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier conforme metodologia descrita nos itens **4.4 e 4.5**.

4.13 Planejamento e desenvolvimento das formulações

4.13.1 EHL

A determinação do EHL ocorreu baseada na metodologia proposta por Griffin (1979), que consistiu na preparação de emulsões seriadas do óleo da semente de *E. oleracea*, onde foi

montado um experimento completo. As emulsões foram compostas pelo óleo e por um par de tensoativos com EHL conhecido, combinados em proporções variáveis, de modo a originarem valores definidos de EHL.

O calculo do EHL ocorreu pela equação:

$$\text{Eq. 6 } \text{EHLf} = (\text{EHLA} \times 0,01 \times A) + (\text{EHLB} \times 0,01 \times B)$$

Onde:

EHLf = EHL final da emulsão;

EHLA= EHL do tensoativo hidrofílico;

EHLB= EHL do tensoativo lipofílico;

A = é a quantidade, em porcentagem, utilizada do tensoativo hidrofílico,

B= é a quantidade, em porcentagem, utilizada do tensoativo lipofílico;

A + B= deve ser igual a 100%.

Os tensoativos utilizados foram o Monooleato de Sorbitano (Tego® SMO V – Span 80), de EHL 4,3 e Polissorbato 80 (Tween® 80), de EHL 15,0, os quais somados representam 10% da formulação, variando-se apenas a proporção destes nessa concentração. O óleo foi mantido na concentração de 10% e a água em 80% da formulação. As proporções de cada componente da formulação, além de suas variações estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Determinação do EHL do óleo da semente de *E. oleracea*.

	Óleo (%m/m)	Span 80 (%)	Tween 80 (%)	Água(%)
1	10	90	10	80
2	10	80	20	80
3	10	70	30	80
4	10	60	40	80
5	10	50	50	80
6	10	40	60	80
7	10	30	70	80
8	10	20	80	80
9	10	10	90	80

Fonte: Dados da pesquisa

As nanoemulsões foram preparadas pelo método de inversão de fases, no qual ocorreu aquecimento das fases aquosa e oleosa separadamente, até $75^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, onde a fase aquosa foi vertida lentamente sobre a fase oleosa e mantidas por 4 minutos, a uma potência de 40% em aparelho ultrasonicador (Ecosonics®).

4.13.2 Análise macroscópica

A análise macroscópica foi avaliada no T0 (24h após o preparo), observando aspecto, cor e odor das formulações (RIBEIRO *et al.*, 2015) e fenômenos de instabilidade de nanoemulsões creme ou separação de fases.

4.13.3 Centrifugação

As amostras foram avaliadas no T0 (24h após o preparo), submetidas a centrifugação a 3.500 rpm durante 30 minutos. A fim de avaliar a instabilidade da nanoemulsão (creme ou separação de fases) observadas visualmente (MOHAMADI SAANI; ABDOLALIZADEH; ZEINALI HERIS, 2019).

O valor de EHL da emulsão mais estável corresponde ao do óleo em ensaio.

4.13.4 Planejamento fatorial quali quantitativo das formulações

Foi elaborado um planejamento fatorial, do tipo 3^2 , com dois fatores em três níveis, para obtenção de diferentes formulações com o intuito de avaliar a influência dos parâmetros farmacotécnicos das nanoemulsões obtidas. As variáveis independentes selecionadas foram tempo e potência. As respostas dependentes selecionadas foram: potencial zeta, tamanho de gotícula e índice de polidispersão. A Tabela 4 apresenta os fatores estudados e seus respectivos níveis.

Tabela 4 - Matriz codificada de Planejamento fatorial 3^2 para estudar a influência do tempo e potência no preparo de nanoemulsões

Nr.	Nível	
	Potência (%)	Tempo (min)
F1	+ [55]	+ [8]
F2	+ [55]	0 [6]
F3	+ [55]	- [4]
F4	0 [50]	+ [8]
F5	0 [50]	0 [6]
F6	0 [50]	- [4]
F7	- [45]	+ [8]
F8	- [45]	+ [6]
F9	- [45]	+ [4]

Fonte: Dados da pesquisa

A análise estatística dos dados experimentais foi realizada por análise de variância (ANOVA) usando o software Statistica®.

As formulações foram obtidas com a concentração de 1% do óleo da semente de *E. oleracea*, baseado nos resultados dos ensaios inseticidas, 1% de tensoativos, escolhido baseado na melhor proporção após a análise do EHL (item 4.13.1) e 98% de água miliq, para um total de 10mL de formulação.

Foram realizadas análises macroscópicas e de centrifugação conforme descrito nos itens 4.13.2 e 4.13.3.

4.13.5 Medições de potencial Zeta, Índice de polidispersão e Tamanho de gotícula

As análises de tamanho das gotículas, índice de polidispersão e potencial zeta, foram avaliados após 23 dias (T23). O tamanho das gotículas e o índice de polidispersão foram medidos por espalhamento dinâmico da luz, enquanto o potencial zeta foi medido por mobilidade eletroforética. As nanoemulsões foram diluídas com água miliq (1:5 v/v) antes da análise para evitar múltiplos efeitos de espalhamento. As medições foram realizadas em um Zetasizer (ZEN3690, Malvern Instruments®) usando ângulo de espalhamento de 90 °.

Após essas análises, as 3 melhores formulações seguiram para o teste de estabilidade acelerada.

4.14 Estudo de estabilidade acelerada da nanoemulsão á base do óleo da semente de *E. oleracea*

Foi feito um novo lote das nanoemulsões, consideradas estáveis após os testes preliminares, as quais foram acondicionadas em frascos de vidro hermeticamente fechados e submetidas aos testes de estabilidade acelerada.

O tamanho de gotícula, índice de polidispersividade e a determinação do potencial zeta foram utilizados como parâmetros avaliativos da estabilidade acelerada (RIBEIRO *et al.*, 2015).

As formulações foram avaliadas inicialmente no t0 (24 horas após a manipulação) t7, t15, t30, t45 dias após exposição a 40 ±2°C, conforme RDC N° 59, de 17 de dezembro de 2010, que dispõe sobre os procedimentos e requisitos técnicos para a notificação e o registro de produtos saneantes (BRASIL, 2010a).

Foram realizadas também as seguintes análises no T0: análise macroscópica (item 4.13.2) e análise de pH realizadas com pHmetro previamente calibrado em soluções padrão de pH conhecido (4,0 e 7,0). As medidas foram realizadas em temperatura ambiente, inserindo o aparelho diretamente na amostra, em triplicata (BRASIL, 2008).

4.15 Atividade larvícida da nanoemulsão contendo óleo da semente de *E. oleracea* frente *Aedes aegypti*

A atividade larvícida da nanoemulsão foi avaliada seguindo a mesma metodologia descrita no item 4.10.

A concentração da nanoemulsão foi escolhida baseada no resultado da atividade pupicida, considerando que a emulsão na concentração de 10,5mg de óleo, matou 100% das pupas, de modo que a nanoemulsão teria atividade tanto larvícida quanto pupicida.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram retiradas as fibras das sementes antes de serem trituradas em moinho de facas, representando um rendimento de 88% de semente sem fibra, após esse processo foi triturada em moinho de facas, tendo um rendimento de 80,26% de semente tritura em relação a amostra sem fibra. A amostra triturada foi usada para o processo de extração.

5.1 Extração

Foram avaliados dois métodos extrativos para a obtenção do óleo da semente do açaí, para cada metodologia foram determinados os parâmetros que seriam avaliados, o hexano foi o solvente de escolha, devido as suas características químicas.

Para a método extrativo usando o ultrassom foi realizado planejamento fatorial do tipo 3^2 , o resultado pode ser observado na Tabela 5. Os dados foram avaliados segundo a ANOVA, e teste de Tukey, ao nível de confiança de 95%. No tempo de 60 min, o melhor rendimento foi na proporção (massa/solvente) de 1:6, no tempo de 90 min, não houve diferença estatística no rendimento das proporções (massa/solvente) de 1:4 e 1:6, sendo escolhida a razão de 1:4, visando a menor quantidade de solvente utilizado no processo, no tempo de 120 min, também não houve diferença estatística no rendimento das proporções (massa/solvente) de 1:4 e 1:6, sendo escolhida a razão de 1:4, visando a menor quantidade de solvente utilizado no processo.

Baseado nos resultados estatísticos e visando otimizar o processo extrativo, foi escolhido como melhor método o experimento 5, que utiliza a proporção (massa/solvente) de 1:4, no tempo de 90 minutos, considerando para essa escolha o tempo de extração que é intermediário e menor quantidade de solvente utilizada no processo.

Tabela 5 - Rendimento obtido do óleo da semente de *E. oleracea* por ultrassom.

Extração por Ultrassom			
Experimento	Proporção (massa/solvente)	Tempo (min)	Rendimento (%) Média ± DP
1	1:2	60	0,40 ± 0,01
2	1:2	90	0,59 ± 0,02
3	1:2	120	0,61 ± 0,02
4	1:4	60	1,21 ± 0,01
5	1:4	90	1,84 ± 0,85
6	1:4	120	1,65 ± 0,14
7	1:6	60	1,74 ± 0,02
8	1:6	90	2,25 ± 0,08
9	1:6	120	2,00 ± 0,34

Legenda: ANOVA, e teste de Tukey, ao nível de confiança de 5% de probabilidade.

Fonte: Dados da pesquisa

Para o método de soxhlet foi avaliado apenas uma proporção (massa/solvente) e quatro tempos de extração diferentes, conforme Tabela 6.

Tabela 6 - Rendimento obtido do óleo da semente de *E. oleracea* por Soxhlet.

Extração por Soxhlet			
Experimento	Proporção (massa/solvente)	Tempo (h)	Rendimento (%)
1	1:6	6	0,27
2	1:6	12	0,28
3	1:6	24	0,64
4	1:6	42	1,50

Fonte: Dados da pesquisa

O resultado obtido no rendimento do óleo no presente estudo vem a corroborar com o estudo realizado pela Embrapa Amazônia Oriental (DOMINGUES; MATTIETTO; OLIVEIRA, 2017), onde foi avaliado o teor de lipídeos em caroços de *E. oleracea* de 20 genótipos provenientes do Banco Ativo de Germoplasma, com extração realizada por soxhlet, os teores de lipídeos variaram de 0,69% a 3,61%, com média de 1,74%.

A variação de percentual de rendimento dentro de uma mesma espécie pode ocorrer por fatores como clima, localização geográfica da produção, condições de plantio, estágio de

maturação dos frutos e a variabilidade do material genético (DOMINGUES; MATTIETTO; OLIVEIRA, 2017).

O percentual de óleo obtido quando comparado a outras oleaginosas não é tão elevado, porém deve-se considerar que é originário de um resíduo gerado diariamente e que é desperdiçado em toneladas, só o estado do Amazonas em 2018 produziu 69 mil toneladas do fruto (CAVALCANTE, 2019).

O método por ultrassom foi escolhido considerando o maior rendimento dentro do menor tempo de extração, mostrando que a metodologia de extração empregada foi apropriada e o rendimento obtido dentro do esperado.

5.2 Caracterização físico-química do óleo da semente do açaí

Os parâmetros físico-químicos avaliados estão listados na Tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros físico-químicos do óleo da semente de *E. oleracea* extraído por Ultrassom.

Parâmetros	Amostra	Valores de Referência
Densidade Relativa	0,88	-
Densidade de Massa (g.mL ⁻¹)	0,88	-
Índice de Refração	1,44	1,4508 (Okada <i>et al.</i> , 2011)
Umidade (%)	4,98	-
Índice de Acidez (mgNaOH.g ⁻¹)	1,28	< 4 (Brasil, 2005b)
Índice de Saponificação (mgKOH.g ⁻¹)	94,47	186,1 (Okada <i>et al.</i> , 2011)

Fonte: Próprio Autor

O óleo da semente do açaí extraído pela metodologia de ultrassom, apresentou coloração amarelada e consistência líquida a temperatura ambiente, classificando-o segundo a ANVISA (Brasil, 2005b) como óleo vegetal, pois apresenta-se na forma líquida à temperatura de 25°C.

Valores de referência para densidade relativa e densidade de massa não foram encontrados, porém em um estudo realizado por Meyer (2013) com óleo da semente da espécie *E. edulis*, obteve-se índice de densidade relativa de 0,92, diferindo do resultado encontrado no presente estudo (0,8813), que foi mais próximo ao resultado descrito por Silva e Rogez (2013), em estudo realizado com o óleo da polpa da mesma espécie, obtendo valor de 0,893.

O índice de refração é um parâmetro físico usado como critério na avaliação da qualidade de óleos e manteigas vegetais. O valor resultante desta análise representa o poder de

refringência do óleo, aumentando conforme o comprimento da cadeia carbônica e o grau de instauração dos ácidos graxos constituintes na amostra. Fatores como grau de oxidação, tratamento térmico e teor de ácidos graxos livres, devem ser levados em consideração na avaliação desses resultados, pois podem levar a alterações do mesmo (LUTZ, 2008; COSTA *et al.*, 2015; CARVALHO, 2017).

O índice de refração foi de 1,444, valor bem próximo ao relatado por Okada e colaboradores (2011) que foi de 1,4508. Silva e Rogez (2013) avaliaram as características físico-químicas do óleo da polpa da mesma espécie, e obtiveram índice de refração de 1,481, considerando que a polpa tem percentual maior de ácidos graxos insaturados que o óleo da semente, o valor encontrado está dentro do esperado.

A determinação da umidade foi feita por termogravimetria, onde por meio da curva TG pode-se observar uma perda de massa gradativa que ocorre da temperatura ambiente até 100°C, em termos de massa foi perdido 0,255mg, correspondente a 4,98%.

A ANVISA por meio da resolução nº 270 de 2005, recomenda valores abaixo de 4 mgKOH/g para acidez de óleos vegetais. Este índice avalia o grau de deterioração pela medida de ácidos graxos livres. O óleo avaliado no presente estudo apresentou valor de 1,285 mgKOH.g⁻¹, valor dentro do preconizado pela ANVISA, resultando em um óleo de boa qualidade, fato que pode ser atribuído a qualidade da matéria-prima, processo de extração e armazenamento adequado.

Após o período de armazenagem de um ano, foi realizada novamente esta análise. A amostra foi armazenada em frascos de vidro, sob refrigeração constante, na temperatura de 6 - 10 °C. O índice de acidez apresentou o valor de 8,344 mg NaOH/g, acima do recomendado, fato que pode ser atribuído ao tempo de armazenagem até a realização do ensaio. O valor elevado do índice de acidez sugere um processo de hidrólise acentuada dos ésteres constituintes da matéria graxa, que podem estar relacionados ao tipo de processo extrativo, conservação inadequada, tempo de armazenagem, fotólise e outros processos de ação catalítica (BRASIL, 2005b).

O índice de saponificação é inversamente proporcional ao peso molecular médio dos ácidos graxos presentes na amostra. No presente estudo apresentou valor abaixo do descrito na literatura por Okada e colaboradores (2011). Alguns fatores relacionados a época de coleta do material vegetal e a variações climáticas, podem interferir na composição da matéria prima, já que o percentual no perfil de ácidos graxos também foi diferente quando comparado a Okada e colaboradores (2011).

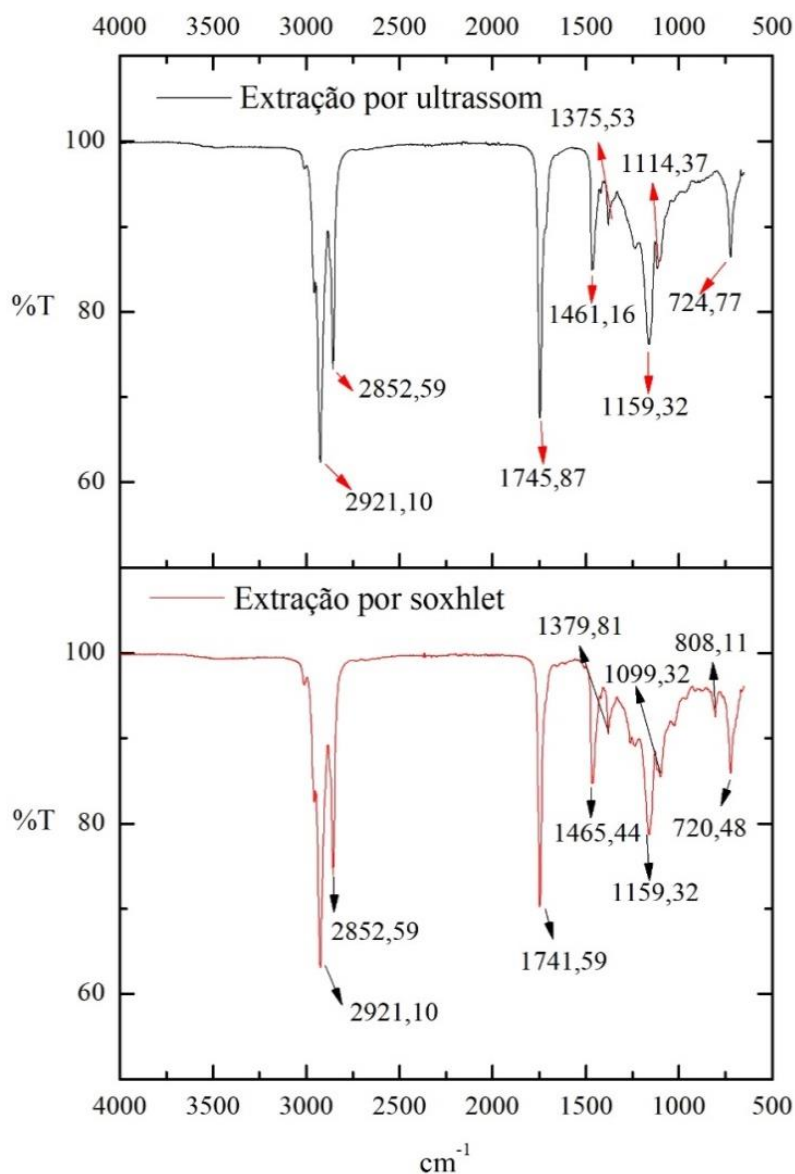
5.3 Espectroscopia por absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 7 apresenta o espectro do óleo da semente de *E. oleracea*, obtido por dois métodos extrativos, ultrassom e soxhlet. Pode-se observar estiramentos na região de 2921,10 cm^{-1} e 2852,59 cm^{-1} (ambas as extrações), referentes a deformação axial C–H característica de alcanos, onde a forte absorção indica que vários grupos metilas estão presentes na molécula.

As vibrações de deformação angular simétrica e assimétrica de grupos metilenos C–H, podem ser observados na região de 1379,81 cm^{-1} , 1464,44 cm^{-1} (soxhlet) e 1375,53 cm^{-1} e 1461,16 cm^{-1} (ultrassom).

A banda de deformação angular simétrica no plano do grupo metileno, apresenta estiramentos de maior intensidade na região de 1379,81 cm^{-1} (soxhlet) e 1375,53 cm^{-1} (ultrassom) em consequência da proximidade com a carbonila. A banda de deformação angular assimétrica no plano está na região de 720,48 cm^{-1} (soxhlet) e 724,77 cm^{-1} (ultrassom), caracterizando alcanos de cadeia linear de sete ou mais átomos de carbono.

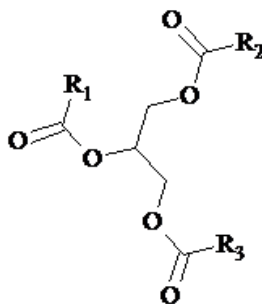
Figura 7 - Infravermelho do óleo da semente de *E. oleracea* por diferentes métodos de extração.



Fonte: Dados da pesquisa

O estiramento com pico forte na região de 1741,59 cm^{-1} (soxhlet) e 1745,87 cm^{-1} (ultrassom) é característico da ligação dupla carbono-oxigênio. As vibrações de deformação axial de C–O, podem ser visualizadas nos estiramentos da região de 1099,38 cm^{-1} (soxhlet) e 1159,32 cm^{-1} ; 1114,37 cm^{-1} (ultrassom), concordantes para a ligação éster presente na estrutura geral de um triglicerídeo (Figura 8), mostrando que os lipídeos estão na forma de triglicerídeos e não na forma livre.

Figura 8 - Estrutura molecular de um triglicerídeo.



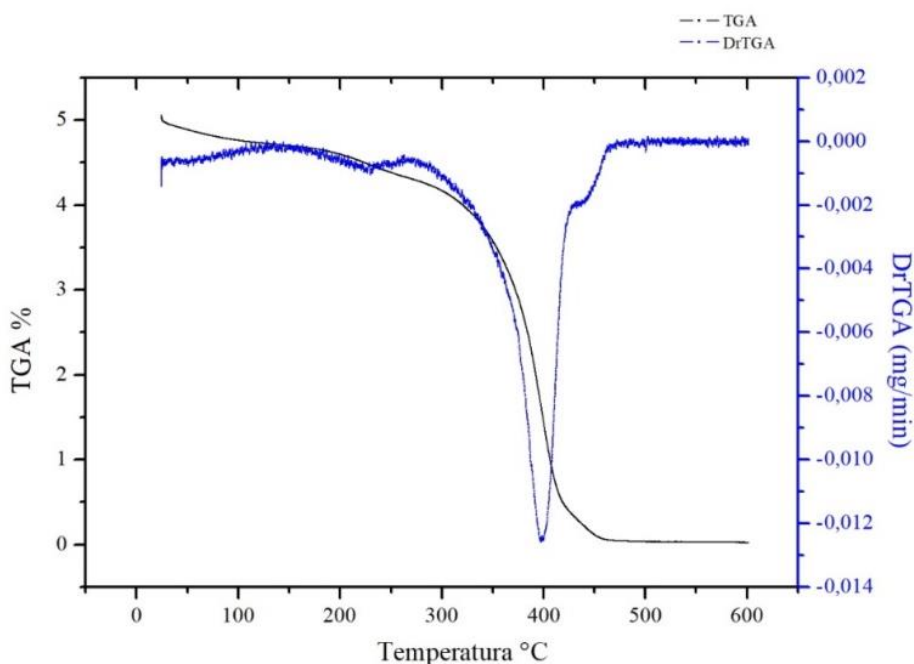
Fonte: Dados da pesquisa

5.4 Estudos de Análise Térmica

As técnicas termoanalíticas fornecem informações sobre a estabilidade dos produtos analisados perante seu comportamento térmico, contribuindo no controle da qualidade de óleos e gorduras vegetais (TOMASSETTI, CAMPANELLA, SAMMARTINI, 1991).

A DTG é a primeira derivada da curva TG, onde as variações de massa da curva TG são representadas por meio de picos que determinam às áreas proporcionais a essas variações. Na Figura 9, a curva DTG mostra três eventos, o primeiro evento está relacionado a perda de água ou compostos voláteis, até a temperatura de 105°C, com perda de 4,981% de massa. O primeiro evento de degradação inicia-se na temperatura de 155°C a 265°C com perda de 7,003% de massa. O segundo evento de degradação mostra um pico endotérmico de 275,59°C a 473,40°C com perda de massa de 82,887%. Dessa forma, podemos considerar que o óleo da semente de açaí é estável até a temperatura de 155°C.

Figura 9 - Curva TG e DTG do óleo da semente de *E. oleracea*.

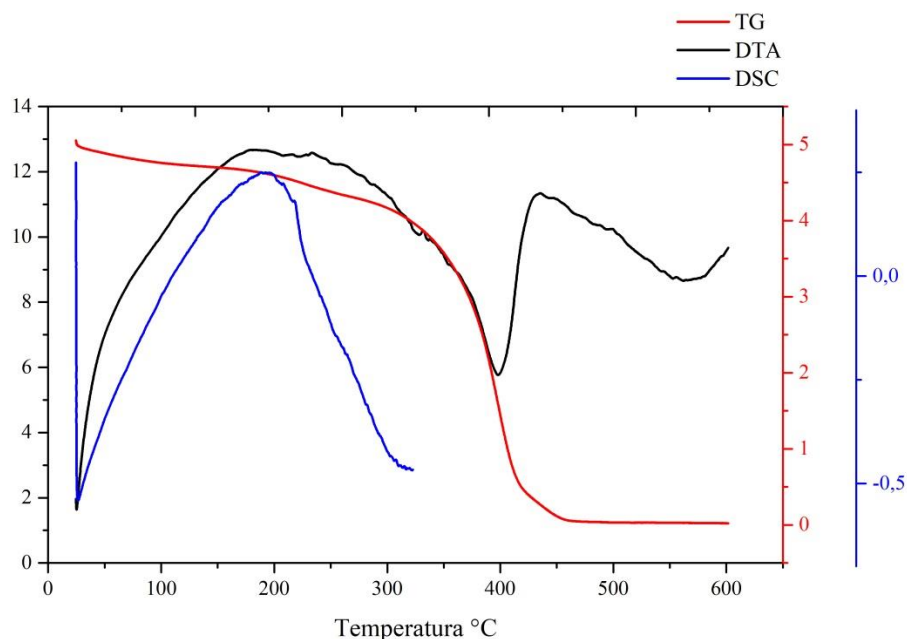


Fonte: Dados da pesquisa

A curva DTA representa a ΔH em função da temperatura, representados na forma de picos. Os picos ascendentes caracterizam os eventos exotérmicos e os descendentes os endotérmicos, o óleo da semente de açaí apresentou um pico descendente caracterizando um evento endotérmico com *Tonset* em 343,80°C e *Tendset* em 421,50°C com pico em 398,08°C, $\Delta H = -414,80 \text{ J.g}^{-1}$, conforme pode ser visto na Figura 10, esse evento provavelmente corresponde à degradação dos ácidos graxos saturados e insaturados, devido a oxidação quase que completa da amostra.

A curva DSC apresentou pico endotérmico em 30,79°C, com temperatura inicial de 21,71°C e temperatura final de 116,03°C, tendo absorvido $-103,71 \text{ J.g}^{-1}$ de energia, característico de perda de água e compostos voláteis, conforme pode ser observado na Figura 10.

Figura 10 - Curva TG, DTA e DSC do óleo da semente de *E. oleracea*.



Fonte: Dados da pesquisa

Pereira (2015) avaliou o perfil térmico do óleo extraído da polpa da espécie *E. oleracea*, obtido de uma empresa da cidade de São Paulo, verificando na curva DTG um único pico descendente resultado da perda de massa, que ocorreu durante o intervalo de temperatura de 241,71°C a 481,14°C, com 99,545%. Na curva DSC foi observado dois eventos endotérmico, o primeiro está na faixa de 300- 410°C, com $\Delta H = 6,74 \text{ J.g}^{-1}$ e o segundo está na faixa de 433-426°C, com $\Delta H = 0,24 \text{ J.g}^{-1}$.

Segundo Santos e colaboradores (2002), a estabilidade térmica dos óleos tem relação direta com a sua estrutura química, onde óleos com ácidos graxos saturados são mais estáveis do que os insaturados, no entanto os óleos vegetais possuem uma composição química complexa, incluindo produtos de oxidação lipídica, ácidos graxos livres, compostos fenólicos, glicéridos e não glicéridos presentes em diferentes porcentagens, desta forma, à decomposição de lipídios provavelmente ocorrem ao mesmo tempo em que ocorre com outros compostos durante cada etapa (VECCHIO *et al.*, 2009).

5.5 Perfil Fitoquímico

Na análise química foram identificadas um total de nove substâncias, sendo as majoritárias representadas pelos picos 6 (37,27%), 5 (25,61%) e 3 (12,86%) conforme pode ser observado na Tabela 8.

Tabela 8 - Composição química do óleo da semente de *E. oleracea*.

Constituintes do óleo	Pico	Constituintes (%) ^a	IRL ^b	IK ^c
2,4-decadienal	1	7,99	1220	1212
Ácido dodecanoico	2	7,61	1416	1400
Ácido tetradecanoico	3	12,86	1552	1500
Ácido hexadecanoico, éster metílico	4	0,38	1646	1570
Acido n-hexadecanoico	5	25,61	1679	1959
(Z) 6-pentadecenol	6	37,27	1668	1672
Ácido 6-octadecanoico	7	1,41	1815	1800
Trans- geranilgeraniol	8	0,38	2972	1961
Acetato de 6-nitroolest-5-en-3-beta-il	9	6,50	26428	
Total (%)		100		

Fonte: Dados da pesquisa

Legenda:^aSubstâncias listadas por ordem de eluição em coluna capilar *Factor Four*/VF-5ms; ^bÍndices de retenção com coluna capilar *Factor Four*/VF-5ms; ^cÍndices de Kovats em coluna capilar DB-5 (ADAMS, 2007).

Alguns desses compostos são descritos no trabalho de Castro (2019), em um estudo com as sementes de *E. oleracea* para a produção de biocombustível, como o ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico, ácido hexadecanoico e ácido hexadecanoico éster metílico.

5.6 Doseamento do perfil de Ácidos Graxos por Cromatografia Gasosa

A Tabela 9 apresenta o perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos presentes no óleo da semente da espécie *E. oleracea*.

O resultado obtido neste estudo indica que o óleo extraído da semente de *Euterpe oleracea* apresenta média de 71% de ácidos graxos insaturados e 28% de saturados, o que dá a ele a consistência líquida a temperatura ambiente (27°C). O ácido linoléico (18:2) mostrou-se majoritário no óleo da semente de açaí, representando valor médio de 38,65%. Dentre os ácidos graxos saturados, o ácido palmítico (16:0) foi o que apresentou maior média, com 24,01% da composição total.

Tabela 9 - Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos presentes no óleo da semente de *E. oleracea*.

Ácido graxo	Percentual (%)	Área	Retenção (min)
C16:0	24,014	4048,372	8,10
C16:1	0,642	108,166	8,93
C17:0	0,304	51,324	10,97
C18:0	3,496	589,432	15,07
C18:1	29,201	4922,785	16,40
C18:2	38,652	6516,174	19,42
C18:3	2,866	483,142	24,27
C20:0	0,500	84,300	28,80
C20:1	0,325	54,808	31,17

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: 16:0 ácido palmítico; 16:1 ácido palmitoleico; 17:0 ácido margárico; 18:0 ácido esteárico; 18:1 ácido oléico; 18:2 ácido linoléico; 18:3 ácido linolênico; 20:0 ácido araquídico; 20:1 ácido gadoléico.

O perfil de ácidos graxos presente no óleo da semente de *E. oleracea* é comparado ao óleo de espécies do mesmo gênero, segundo dados da literatura, de acordo com a Tabela 10. Okada e colaboradores (2011) analisaram o perfil de ácidos graxos do óleo da semente de *E. oleracea*, e apresentou percentuais diferentes ao obtido no presente estudo, tendo como ácido graxo majoritário o ácido oleico (18:1).

O ácido graxo insaturado majoritário presente no óleo da polpa das espécies *E. oleracea*, *E. precatoria* e *E. edulis*, como mostra a Tabela 10 foi o ácido oléico (18:1), o que difere do perfil encontrado no óleo da semente de *E. oleracea*. Comparando o perfil do óleo da semente da espécie *E. edulis*, com o resultado obtido no presente estudo, percebe-se a semelhança entre eles, tendo como majoritário o ácido linoleico (18:2), dentre os ácidos graxos saturados.

O ácido palmítico (16:0) apresentou maior percentual dentre os ácidos graxos saturados no óleo da semente de *E. oleracea*, resultado muito próximo ao encontrado no óleo da polpa das espécies *E. oleracea* e *E. edulis*, e semente de *E. edulis* e *E. oleracea*, conforme os dados da literatura apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Comparação da composição de ácidos graxos do óleo da semente de *E. oleracea* com espécies do mesmo gênero.

Espécie	Parte usada	12:0	14:0	16:0	16:1	17:0	17:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:0	24:0
<i>Euterpe oleracea</i> (dados do autor)	Semente	-	-	24,01	0,64	0,30	-	3,49	29,20	38,65	2,86	0,50	0,32	-	-
<i>Euterpe oleracea</i> OKADA <i>et al.</i> , 2011	Semente	2,9	4,6	16,1	-	-	-	3,2	51,3	18,2	-	2,3	1,5	-	-
<i>Euterpe oleracea</i> SILVA e ROGEZ., 2013.	Polpa	0,03	0,08	21,69	3,53	0,07	-	-	64,19	9,55	0,70	0,09		0,07	-
<i>Euterpe precatória</i> YUYAMA <i>et al.</i> , 2011.	Polpa	-	-	-	0,20	-	-	6,3	74,6	2,0	1,0	-	-	-	-
<i>Euterpe edulis</i> MEYER, 2013.	Semente	-	2,25	21,84	-	-	-	4,69	23,21	44,50	3,51	-	-	-	-
<i>Euterpe edulis</i> SCHIRMANN, 2009	Polpa	-	0,1	23,9	1,6	0,1	0,1	3,3	48,2	21,4	0,9	0,2	0,1	0,1	0,1

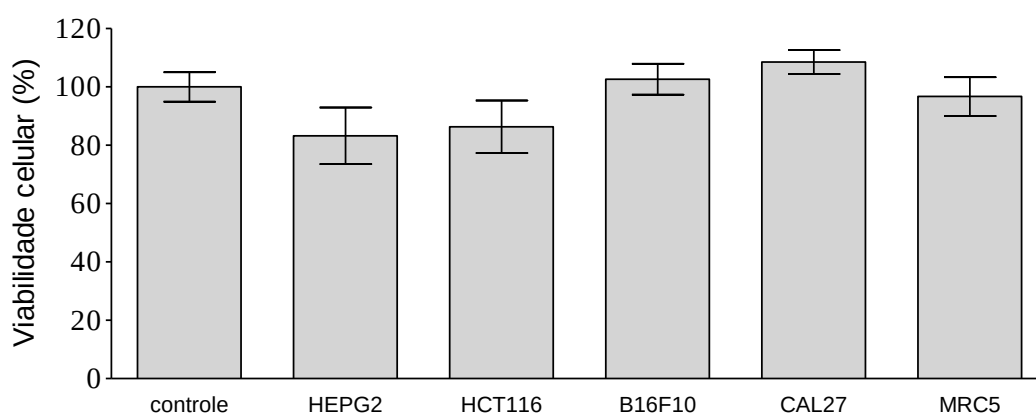
Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: 12:0 ácido láurico; 14:0 ácido mirístico; 16:0 ácido palmítico; 16:1 ácido palmitoleico; 17:0 ácido margárico; 17:1 ácido margarolêico; 18:0 ácido esteárico; 18:1 ácido oléico; 18:2 ácido linoléico; 18:3 ácido linolênico; 20:0 ácido araquídico; 20:1 ácido gadoléico; 22:0 ácido behênico; 24:0 ácido lignocérico.

5.7 Avaliação do potencial citotóxico *in vitro*

A avaliação do potencial citotóxico *in vitro* do óleo da semente de *E. oleracea* foi avaliado utilizando células as células HEP-G2 (hepatocarcinoma humano), HCT-116 (carcinoma do color retal humano), B16F10 (melanoma murinho), CAL27 (carcinoma escamocelular oral) e MRC-5 (fibroblasto humano) conforme mostra o Figura 11.

Figura 11 - Efeito de óleo de açaí na viabilidade de células HEPG2, HCT-116, B16F10, CAL27 e MRC-5 determinado pelo método de Alamar Blue após 72 horas de tratamento.



Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: Os dados apresentam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle por ANOVA seguido por teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.

Dentre os resultados observados podemos concluir que a concentração de 50µg do óleo de *E. oleracea* para a células MRC-5 apresentou resultado não citotóxico, dentre as células tumorais HEPG2, HCT116, B16F10 e CAL27 não apresentou morte celular significativa.

5.8 Ensaios inseticidas

5.8.1 Atividade Larvicida

Para a avaliação da atividade larvicida, foi utilizada uma emulsão a base de óleo da semente de *Euterpe oleraceae*. A emulsão apresentou efeito tóxico para as larvas de *Aedes aegypti* tendo o índice de mortalidade proporcional ao tempo de exposição. Conforme pode ser observado na Tabela 11, com 8 horas de exposição na concentração de 3,5 mg mL⁻¹ obteve-se mortalidade acima de 50% e na concentração de 6,8 mg mL⁻¹ no mesmo período de observação foi de 78,33%, diferindo estatisticamente entre si as duas concentrações. Ao final do teste, após 24 horas de exposição, as concentrações de 1,7 mg mL⁻¹, 3,5 mg mL⁻¹ e 6,8 mg mL⁻¹ não apresentam diferença estatística significativa quanto a porcentagem de mortalidade das larvas, porém a de 6,8 mg mL⁻¹ teve um índice de 100% de mortalidade, sendo desta forma mais ativa que as demais. O grupo controle não apresentou mortalidade durante todo o experimento.

Tabela 11 - Percentual de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti*, expostas a emulsões contendo diferentes concentrações do óleo da semente de *E. oleracea*, em relação ao tempo de exposição.

Concentrações (mg.mL ⁻¹)	Mortalidade (%) ¹					
	1 h	2 h	4 h	8 h	16 h	24 h
6,8	8,33 ^a	22,49 ^a	42,49 ^a	78,33 ^a	90,83 ^a	100,00 ^a
3,5	3,33 ^b	11,66 ^b	19,99 ^b	51,66 ^b	78,33 ^a	89,99 ^a
1,7	0,00 ^b	0,00 ^c	6,66 ^c	35,05 ^{bc}	50,83 ^b	82,49 ^a
0,9	2,49 ^b	3,33 ^{bc}	3,33 ^c	22,49 ^c	23,33 ^c	29,99 ^b
0,45	0,00 ^b	1,66 ^c	1,66 ^c	14,16 ^{cd}	14,99 ^{cd}	18,33 ^{bc}
Controle	0,00 ^b	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^c

Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: 1. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Na CL₅₀ e CL₉₀ da emulsão a base do óleo da semente do açaí (Tabela 12), pode-se observar que a medida que aumenta o tempo de exposição das larvas a emulsão contendo o óleo da semente de açaí, diminui a concentração letal da mesma. No tempo de 8 horas de

exposição a CL_{50} foi de 2,68 mg mL⁻¹ (2,44 – 2,97 mg mL⁻¹), ao final do teste, após 24 horas a CL_{50} foi de 1,01 mg mL⁻¹ (0,95 – 1,08 mg mL⁻¹) e a CL_{90} de 2,96 mg mL⁻¹ (2,72 – 3,26 mg mL⁻¹).

Tabela 12 - Concentração letal 50 e 90 de emulsões contendo diferentes concentrações do óleo da semente de *E. oleracea* frente a larvas de *Aedes aegypti*, nos tempos de exposição de 8, 16 e 24.

Tempo (h)	Concentração Letal (CL)(mg mL ⁻¹)			
	CL ₅₀	Intervalo de confiança	CL ₉₀	Intervalo de confiança
8	2,68	2,44 – 2,97	19,48	15,53 – 25,58
16	1,60	1,49 – 1,71	6,67	5,91 – 7,67
24	1,01	0,95 – 1,08	2,96	2,72 – 3,26

Fonte: Dados da pesquisa

Rahuman, Venkatesan e Gopalakrishnan (2008) avaliaram os ácidos oléico e linoléico isolados de *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad quanto a sua atividade larvicida, os resultados mostraram alta mortalidade de larvas de quarto instar de *Aedes aegypti* (CL_{50} de 8,80, 18,20 e CL_{90} 35,39 e 96,33 ppm), *Anopheles stephensi* Liston e *Culex quinquefasciatus* Say, dado que vem corroborar com os resultados deste trabalho, pois os ácidos graxos em maior concentração no óleo da semente de *E. oleracea* são ácido oléico e linoléico (29,201 e 38,652% respectivamente).

Varios estudos vem sendo realizados a fim de avaliar a atividade larvicida de compostos de origem vegetal. Luz e colaboradores (2020), realizaram um levantamento bibliográfico dos últimos seis anos, onde 337 óleos essenciais de 225 espécies de plantas foram testados contra larvas de *Aedes aegypti*, a parte da planta mais utilizada foram as folhas e menos de 10% das espécies tiveram o óleo essencial avaliado quanto a sua segurança.

Apenas sete trabalhos foram realizado com sementes de plantas e desses, apenas três de plantas de origem brasileira (Luz *et al*, 2020). Dias e Moraes (2014) observaram que óleos extraídos de folhas ou partes aéreas muitas vezes tem um efeito larvicida maior, porém os óleos obtidos de sementes são mais ativos.

No estudo de Baz e colaboradores (2022) apenas os óleos das espécies *Camellia sinensis* e *Foeniculum vulgare* na concentração de 1000ppm (1000mg.L⁻¹) apresentaram 100% de mortalidade das larvas em 24h. Os óleos essenciais de *P. purusanum* e *P. alatipetiolatum* na concentração de 200ppm (200mg.L⁻¹) causaram a morte de 100% de larvas (CL_{50} de 33,74 a 62,33 ppm) de *A. aegypti* e *A. albopictus*, respectivamente (Oliveira, 2020).

5.8.2 Atividade Pupicida

A atividade pupicida foi avaliada durante 24h, nas primeiras 4 horas de exposição na concentração de 10,5 mg.mL⁻¹ obteve-se mortalidade acima de 60% e na concentração de 13,6 mg.mL⁻¹ no mesmo período de observação foi de 95,83%, diferindo estatisticamente entre si as duas concentrações. Ao final do teste, após 24 horas de exposição, as concentrações de 3,5 mg.mL⁻¹, 6,8 mg.mL⁻¹ e 10,5 mg.mL⁻¹ e 13,6 mg.mL⁻¹, não apresentam diferença significativa quanto a porcentagem de mortalidade das larvas, porém as concentrações de 10,5 e 13,6 mg.mL⁻¹ tiveram um índice de 100% de mortalidade, sendo as concentrações mais efetivas, conforme pode ser observado na Tabela 13, porém com a concentração de 10,5 mg.mL⁻¹ além de ter 100% de mortalidade se utiliza uma concentração menor de óleo, obtendo o mesmo resultado que na concentração maior.

Tabela 13 - Percentual de mortalidade das pupas de *Aedes aegypti*, expostas a emulsões contendo diferentes concentrações do óleo da semente de *Euterpe oleracea*, em relação ao tempo de exposição.

Concentrações (mg.mL ⁻¹)	Mortalidade (%) ¹					
	1 h	2 h	4 h	8 h	16 h	24 h
13,6	15,83 ^a	34,16 ^a	95,83 ^a	100,00 ^a	100,00 ^a	100,00 ^a
10,5	8,33 ^b	27,49 ^a	63,33 ^b	92,50 ^{ab}	100,00 ^a	100,00 ^a
6,8	2,49 ^c	11,66 ^b	36,66 ^{bc}	60,83 ^{bc}	84,99 ^{ab}	95,83 ^a
3,5	0,00 ^c	8,32 ^b	36,66 ^{bc}	56,66 ^c	67,50 ^{ab}	84,16 ^a
1,7	0,00 ^c	0,00 ^c	14,16 ^{cd}	33,32 ^{cd}	56,66 ^b	69,16 ^a
Controle	0,00 ^c	0,00 ^c	0,83 ^d	0,83 ^d	0,83 ^c	14,99 ^b

Fonte: Dados da pesquisa

1. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Na CL₅₀ e CL₉₀ da emulsão a base do óleo da semente do açaí (Tabela 14), pode-se observar que a medida que aumenta o tempo de exposição das pupas a emulsão contendo o óleo da semente de açaí, diminui a concentração letal da mesma. No tempo de 8 horas de exposição a CL₅₀ foi de 3,03 mg.mL⁻¹ (2,80 – 3,26 mg.mL⁻¹), ao final do teste, após 24 horas a CL₅₀ foi de 1,13 mg.mL⁻¹ (0,95 – 1,30 mg.mL⁻¹) e a CL₉₀ de 3,90 mg.mL⁻¹ (3,58 – 4,29 mg.mL⁻¹).

Tabela 14 - Concentração letal 50 e 90 de emulsões contendo diferentes concentrações do óleo da semente de *E. oleracea* frente a pupas de *Aedes aegypti*, nos tempos de exposição de 1, 2, 4, 8, 16 e 24.

Tempo (h)	Concentração Letal (CL) (mg.mL ⁻¹)			
	CL ₅₀	Intervalo de confiança	CL ₉₀	Intervalo de confiança
1	26,47	21,98 – 35,83	62,45	43,90 – 111,96
2	21,14	18,42 – 25,24	86,03	63,55 – 128,62
4	5,87	5,51 – 6,24	21,83	19,35 – 25,13
8	3,03	2,80 – 3,26	11,07	10,08 – 12,32
16	1,73	1,53 – 1,91	6,36	5,83 – 7,02
24	1,13	0,95 – 1,30	3,90	3,58 – 4,29

Fonte: Dados da pesquisa

Fernandes e colaboradores (2021) avaliaram a atividade pupicida (*Aedes aegypti*) da fração hexânica do extrato de *Helicteres velutina* que foi de 85% e 100% de mortalidade das pupas nas concentrações de 0,15 mg.mL⁻¹ e 0,20 mg.mL⁻¹, respectivamente, após 24 h de exposição. As CL₅₀ e CL₉₀ da fração hexânica foram 0,12 mg.mL⁻¹ e 0,14 mg.mL⁻¹.

Kaura e colaboradores (2019) avaliaram a atividade pupicida (*Aedes* spp.) dos óleos de *Eucalyptus globulus* e *Azadirachta indica* em várias concentrações, apenas o óleo de *Eucalyptus globulus* apresentou atividade com mortalidade de 100% na concentração de 1000ppm (100 µL). Os óleos essenciais de *P. purusanum* e *P. alatipetiolatum* na concentração de 200 ppm (200mg.L⁻¹) causaram a morte de 89 e 94% de pupas (CL₅₀ de 66,17 a 91,39 ppm) de *A. aegypti* e *A. albopictus*, respectivamente (Oliveira, 2020).

5.9 Toxicidade Aguda

O teste de toxicidade aguda é utilizado para classificar apropriadamente substâncias de acordo com o seu potencial de toxicidade ou letalidade, além de fornecer informações seguras sobre os efeitos tóxicos produzidos por um determinado agente químico, a natureza desses efeitos e as doses seguras de exposição (VALADARES, 2006).

A resolução nº 34, de 16 de agosto de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), indica a realização de estudos de toxicidade pré-clínica para a produção de inseticidas, recomendando entre outros animais, a utilização de camundongos para a aquisição

de dados toxicológicos envolvendo a toxicidade aguda e estudos histopatológicos de órgãos desses animais.

No ensaio de toxicidade aguda a dose teste de 2.000 mg.kg^{-1} não levou nenhum dos animais a apresentarem mortalidade ou morbidade nas primeiras 24 horas após a exposição ao produto e nem durante o estudo.

Os sinais clínicos observados após a exposição dos animais a dose de 2.000 mg.Kg^{-1} foram observados em relação a um grupo controle (GT), onde os animais receberam apenas 0,4 mL tween 80 e água q.s.p para o volume de 1mL. Os resultados foram tabulados segundo Malone (1977) e Cruz e colaboradores (2017) e estão demonstrados nas Tabela 15 e 16. Observou-se que os efeitos mais pronunciados foram no Sistema Nervoso Central (SNC), principalmente desencadeando atividade estimulante, com os sinais clínicos de maior intensidade agitação e agressividade, com menor intensidade aumento da frequência respiratória, ereção de cauda, movimento estereotipado e postura em garra, sendo esses sinais apresentados tanto no grupo controle, como nos grupos tratados.

O efeito depressor observado foi de fotofobia, porém com intensidade moderada, quanto ao Sistema Nervoso Autônomo (SNA), observou-se com maior intensidade reação de fuga, e de intensidade moderada a baixa, defecação aumentada, diurese, contorções e excreção. Em relação a outros comportamentos os de intensidade moderada foram autolimpeza e escalar, sendo esses sinais apresentados tanto no grupo controle, como nos grupos tratados. Não foi constatada morte em nenhum grupo testado, estando classificado como um extrato não tóxico.

Tabela 15 - Sinais clínicos do Sistema Nervoso Central após administração por via oral da emulsão à base do óleo da semente do açaí em camundongo *Mus musculus*.

Ações/Parâmetros	Grupo Controle			Grupo Tratado 1			Grupo Tratado 2		
	30 min	1h	2h	30 min	1h	2h	30 min	1h	2h
1. Sistema Nervoso Central									
1.1 Efeitos estimulantes									
Agitação	+++	+++	++	+	++	+	+++	++	++
Agressividade	+++	++	-	++	++	+	++	+	+
Aumento da frequência Respiratória	++	++	+	++	+		++	++	+
Convulsões	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ereção de cauda	++	++	+	+	++	+	++	+	+
Exoftalmia	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Expansão do pavilhão auricular	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Marcha em Monobloco	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movimento Circular	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movimento de vibrissas	++	++		+	+	-	-	-	+
Movimento estereotipado	++	++		+++	++	-	-	+	++
Ondulação de cauda	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piloereção	+	-	-	-	-	-	+	+	-
Postura de Ataque	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Postura em garra	++	++		+	++	+	++	++	++
Salto	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taquicardia	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Tremores finos/grosseiros	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.2 Efeitos Depressores									
Abaixamento do trem posterior	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Analgesia	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anestesia	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catatonía	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fotofobia	++	++	+	+	+	-	++	++	+
Hipnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inversão de marcha	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda do reflexo auricular	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda do reflexo corneal	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prostração	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Ptoze palpebral	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reflexo do endireitamento	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Repota do endireitamento	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sedação	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Adaptada de Malone (1977); Cruz *et al* (2017).

Legenda: Resultado negativo (-), Resultado positivo (+), Resultado positivo moderado (++) e Resultado positivo intenso (+++)

Tabela 16 - Sinais clínicos do Sistema Nervoso Autônomo e taxa de mortalidade após administração por via oral da emulsão à base do óleo da semente do açaí em camundongo *Mus musculus*.

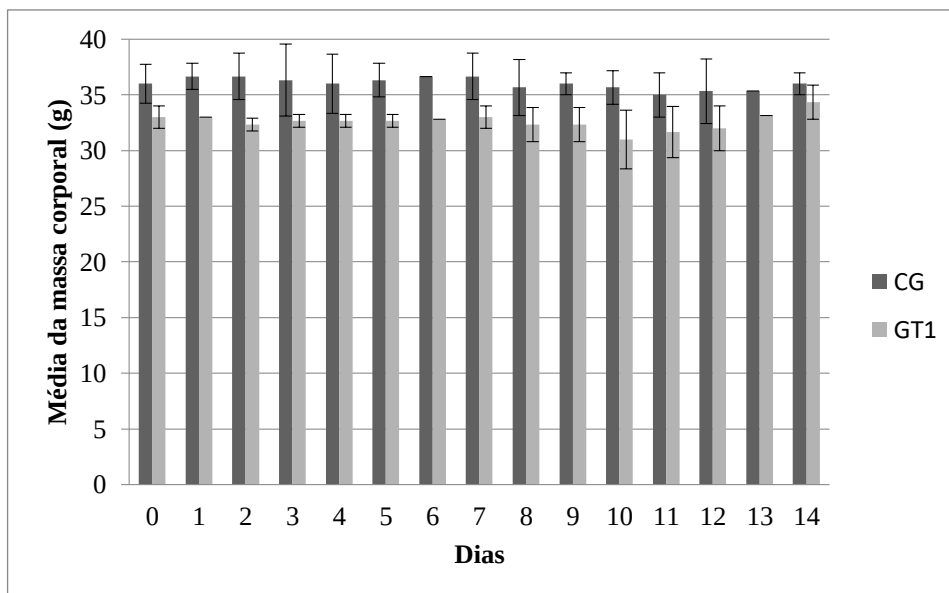
Ações/Parâmetros	Grupo Controle			Grupo Tratado 1			Grupo Tratado 2		
	30 min	1h	2h	30 min	1h	2h	30 min	1h	2h
1. Sistema Nervoso Autônomo									
Cianose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Constipação	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Contorções	+	+	-	-	-	-	-	-	++
Defecação aumentada	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Diarréia	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Distensão abdominal	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diurese	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Espasmos musculares	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Excreção	-	-	-	+	+	-	++	-	+
Força para agarrar	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Hipertrofia testicular	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lacrimejamento	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palidez	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Postura estática	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reação de fuga	+++	+++	-	++	++	+	+++	+	++
Refluxo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Respiração forçada	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salivação	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tono muscular	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2. Outros Comportamentos									
Abdução das patas do trem posterior	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ambulação	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Autolimpeza	-	-	-	++	++	+	+	+	++
Bocejo excessivo	++	-	-	-	-	+	-	-	-
Contorções abdominais	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Escalar	-	-	-	++	+	+	++	++	+
Esteriotipia	+	++	-	-	-	-	-	-	-
Limpeza	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Pedalar	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacudir a cabeça	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vocalização	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3. Mortalidade (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: Adaptada de Malone (1977); Cruz *et al* (2017).

Legenda: Resultado negativo (-), Resultado positivo (+), Resultado positivo moderado (++) e Resultado positivo intenso (+++).

A massa dos animais foi acompanhada durante 15 dias após a ingestão das doses. Como pode ser visto nas Figuras 12 e 13, foi observado que não houve grandes alterações na média das massas dos Grupos Controle (GC), Grupo Tratado1 (GT1) e Grupo Tratado2 (GT2), durante o teste.

Figura 12 - Médias da massa corporal do GC e GT1 utilizados no teste de Toxicidade Aguda.

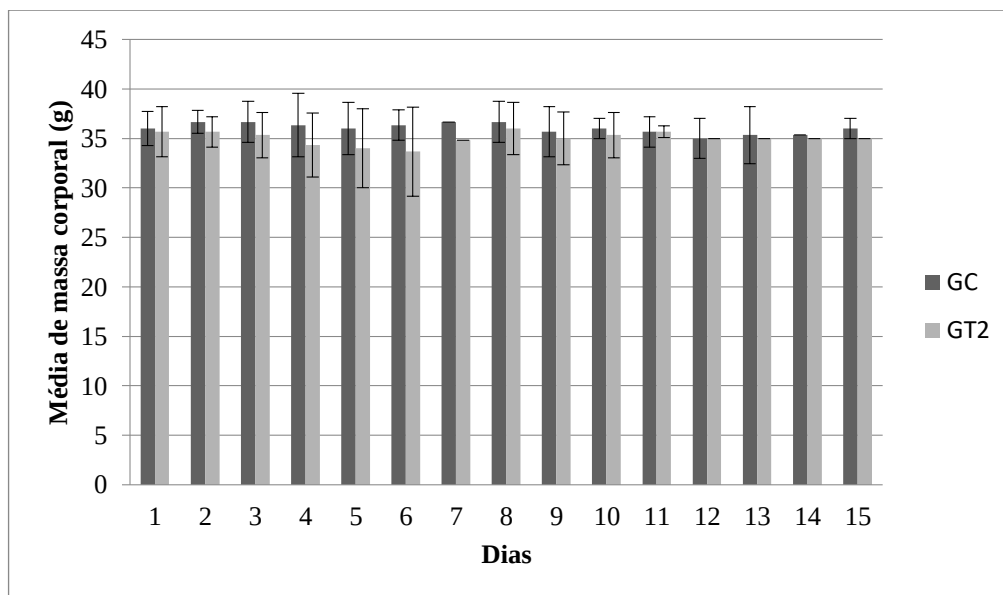


Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: GC: Grupo Controle; GT1: Grupo Tratado 1.

Como pode ser visto na Figura 13, o GT2 até o quinto dia, apresentou uma perda de peso maior que o GC, esse fato pode estar relacionado aos sinais clínicos apresentados por esse grupo, como defecação aumentada e diurese, além dos efeitos estimulantes relacionados ao SNC, observados na Tabela 8. Passado o quinto dia, apresenta ganho de peso e ao final do décimo quinto dia, o peso está próximo ao do início do experimento.

Figura 13 - Médias da massa corporal do GC e GT2 utilizados no teste de Toxicidade Aguda.

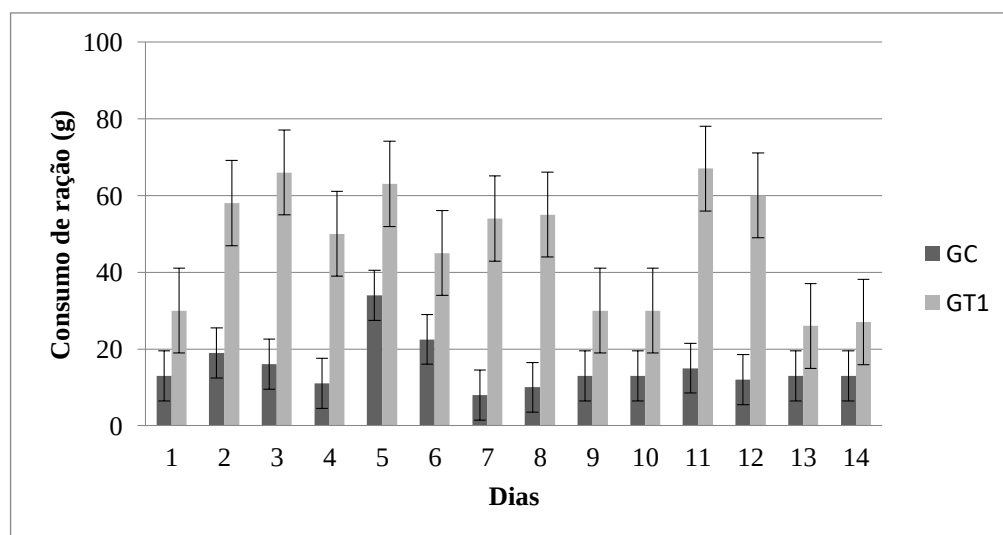


Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: GC: Grupo Controle; GT2: Grupo Tratado 2.

O consumo de ração do Grupo Tratado 1 (GT1) foi maior em relação ao Grupo Controle (GC), conforme Figura 14, a média em gramas do consumo de ração mais o desvio padrão do GC foi de $15,17 \pm 6,52$ g e do GT1 foi de $47,21 \pm 15,54$ g. O consumo do Grupo Tratado 2 (GT2) também foi maior que o GC, conforme Figura 15, a média em gramas do consumo de ração mais o desvio padrão do GT2 foi de $22,14 \pm 11,07$ g. Esse fato pode estar relacionado ao efeito estimulante provocado pelo princípio ativo, porém no GT2 os sinais clínicos relacionados a excreção foram mais intensos.

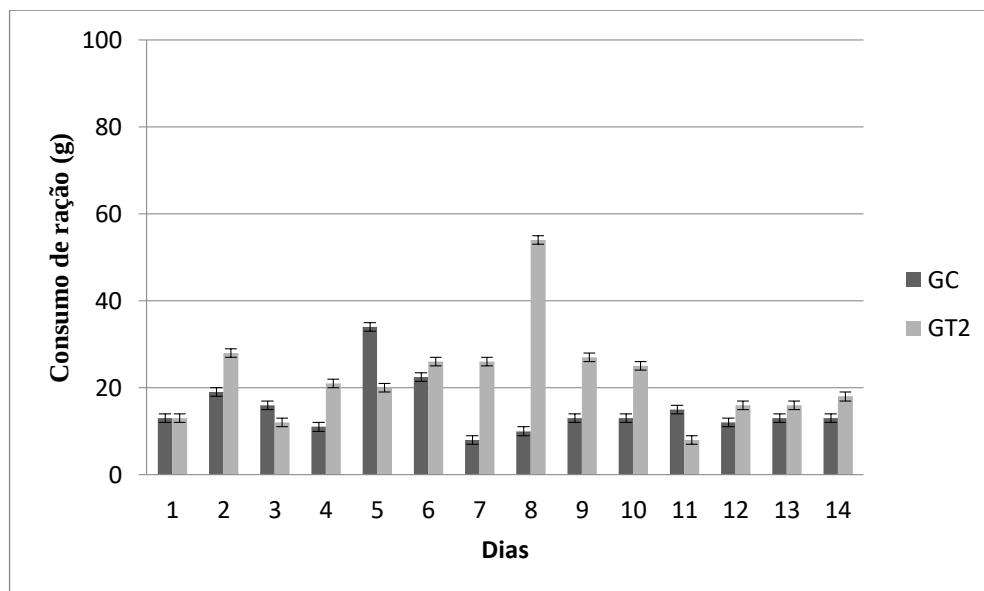
Figura 14 - Consumo de ração do GC e GT1 utilizados no teste de Toxicidade Aguda.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: GC: Grupo Controle; GT1: Grupo Tratado 1.

Figura 15 - Consumo de ração do GC e GT2 utilizados no teste de Toxicidade Aguda.

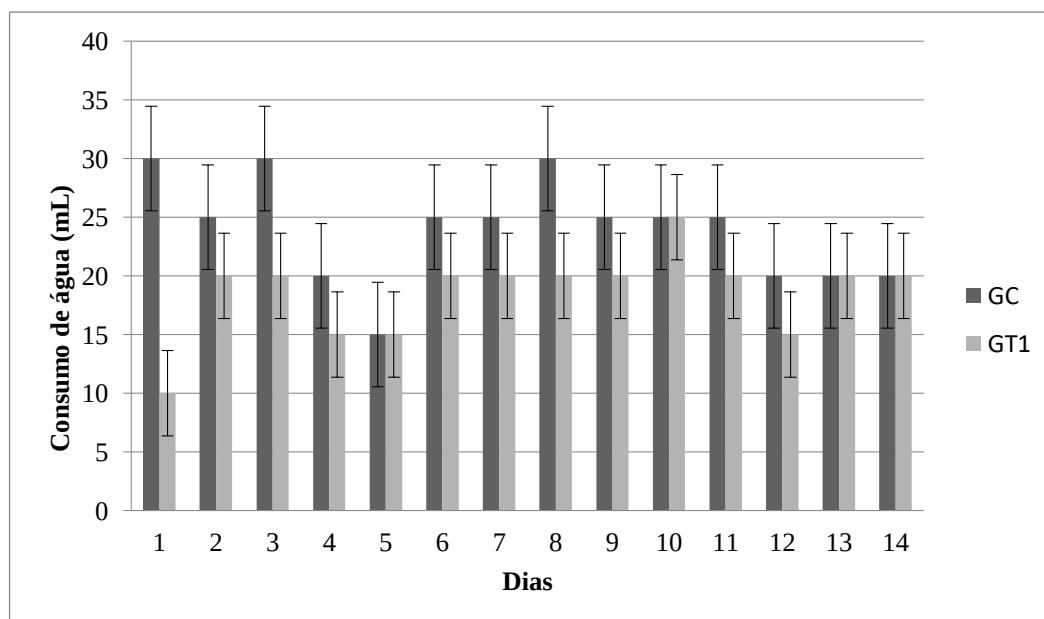


Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: GC: Grupo Controle; GT2: Grupo Tratado 2.

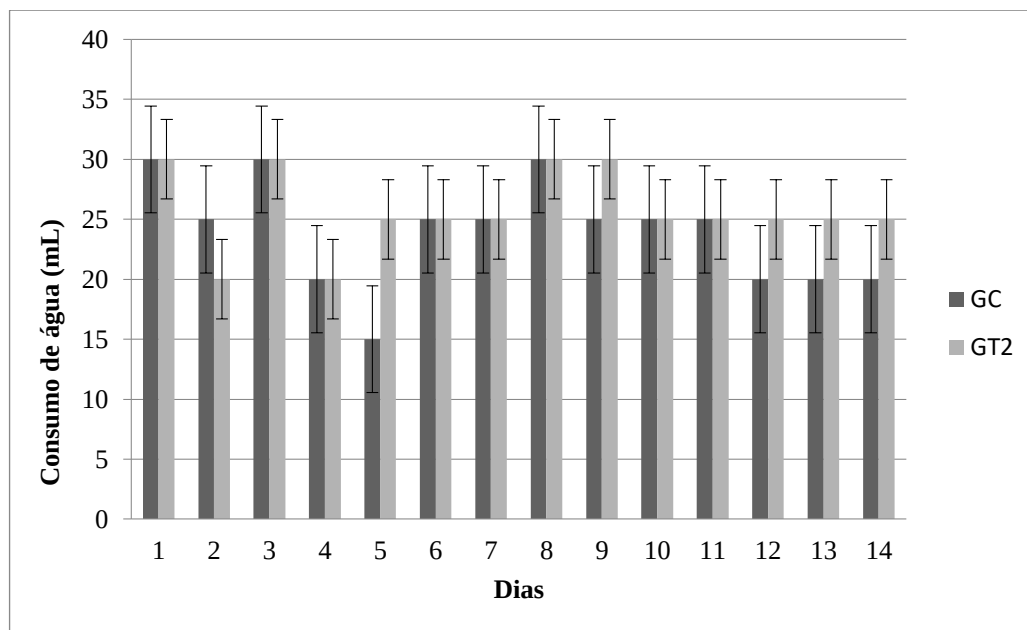
O consumo de água dos Grupos Controle, GT1 e GT2 pode ser observado nas Figuras 16 e 17, respectivamente. A média do consumo de água mais o desvio padrão do GC foi de $23,92 \pm 4,46$ mL, do GT1 foi de $18,57 \pm 3,63$ mL e do GT2 de $25,71 \pm 3,31$ mL.

Figura 16 - Consumo de água do GC e GT1 utilizados no teste de Toxicidade Aguda.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: GC: Grupo Controle; GT1: Grupo Tratado 1.

Figura 17 - Consumo de água do GC e GT2 utilizados no teste de Toxicidade Aguda.

Legenda: GC: Grupo Controle; GT1: Grupo Tratado 1.

Fonte: Dados da pesquisa.

Passados os 15 dias de observação os animais foram sacrificados por overdose de anestésicos e retirados fígado, baço, rins e pulmão, que em seguida foram pesados e levados para análise histológica. Com a determinação das massas foram calculadas as médias $\pm$ Desvio Padrão (DP) dos animais dos grupos CT, G1 e G2, os valores estão demonstrados na Tabela 17 e pode-se observar que não houve diferença estatística entre os grupos.

Tabela 17 - Média $\pm$ Desvio Padrão das massas dos órgãos avaliados dos Grupos Controle e Tratados, no teste de toxicidade aguda.

Órgãos (g)	Grupo Controle	Grupo Tratado 1	Grupo Tratado 2
Pulmão	0,334 $\pm$ 0,111	0,263 $\pm$ 0,073	0,270 $\pm$ 0,046
Rim	0,438 $\pm$ 0,018	0,410 $\pm$ 0,022	0,455 $\pm$ 0,0315
Fígado	2,111 $\pm$ 0,181	2,109 $\pm$ 0,216	2,175 $\pm$ 0,085
Baço	0,212 $\pm$ 0,029	0,234 $\pm$ 0,100	0,284 $\pm$ 0,046

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: Valores representam a média $\pm$ d.p. (n = 3/grupo). (p<0,05) (ANOVA).

Foi realizada também a análise histológica dos órgãos, onde não foram observadas diferenças entre os Grupos Tratados 1 e 2 e o Grupo Controle. A avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos pode ser observada na Tabela 18.

Tabela 18 - Efeito do óleo da semente de *E. oleracea* (2.000 mg.kg⁻¹), por via oral sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos de camundongos *Mus musculus* fêmeas.

Parâmetros	Grupo Controle	Grupo Tratado 1	Grupo Tratado 2
Uréia (mL.dL ⁻¹)	18,53 ± 1,28	15,33 ± 3,05	21,16 ± 2,21
Creatinina (mg.dL ⁻¹)	0,43 ± 0,15	0,43 ± 0,07	0,52 ± 0,13
TGO (U.L ⁻¹)	20,26 ± 5,37	14,16 ± 5,10	18,70 ± 2,80
TGP (U.L ⁻¹)	17,46 ± 2,73	18,40 ± 2,70	21,26 ± 4,34
Hemácias (k.µL ⁻¹)	5,59 ± 0,21	5,21 ± 0,16	4,94 ± 0,35
Hemoglobinas (g.dL ⁻¹)	17,06 ± 0,50	15,73 ± 0,80	14,63 ± 1,19
Hematocrito (%)	51,33 ± 1,52	47,33 ± 2,51	44,00 ± 3,60
VCM (fL)	92,36 ± 1,81	90,40 ± 0,45	90,06 ± 1,30
HCM (pg)	30,16 ± 0,05	30,10 ± 0,10	29,70 ± 0,60
CHCM (g.dL ⁻¹)	33,16 ± 0,15	33,16 ± 0,15	33,06 ± 0,11
Leucócitos (mm ³)	6200 ± 1587,45	7066 ± 305,50	6866 ± 472,58
Segmentados (mm ³)	36,66 ± 5,50	39,33 ± 2,08	42,00 ± 2,64
Eosinófilos (mm ³)	4,33 ± 1,52	3,00 ± 1,00	2,60 ± 2,08
Linf. Típicos (mm ³)	53,66 ± 3,05	55,33 ± 3,21	51,33 ± 1,52
Monócitos (mm ³)	2,00 ± 1,00	2,30 ± 1,52	4,00 ± 1,00
Plaquetas (mm ³)	273000 ± 89145,94	180000 ± 18248,28	172333 ± 9609,02

Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: Valores representam a média ± desvio padrão da média (n = 3/grupo). VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. (p<0,05). (ANOVA, seguido de análise de Tukey).

Nenhuma diferença clínica foi registrada no perfil bioquímico dos animais dos Grupos Tratados 1 e 2 quando comparados ao Controle. No perfil hematológico foi observada diferença estatística do Grupo Tratado 2 em relação ao controle nos parâmetros hemoglobina e hematócrito, fato que pode estar relacionado as condições fisiológicas do animal, pois quando observado os dados brutos, percebe-se que a diferença se deu em apenas um indivíduo deste grupo.

O óleo da semente de *Euterpe oleracea* pode ser considerado de baixa toxicidade aguda de acordo com o método de classes recomendado pela OECD 423 (OECD, 2001) e enquadra-se na classe 5 (DL₅₀ superior a 2.000 mg.kg⁻¹), pois não foram registrados sinais de toxicidade geral como alterações no consumo de água e ração, no peso corpóreo e nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, também não foram observados óbitos durante todo período experimental. A OECD recomenda que, a próxima dose a ser testada seria a de 5.000 mg.Kg⁻¹; entretanto, só se faz necessário em casos que justifiquem a sua necessidade.

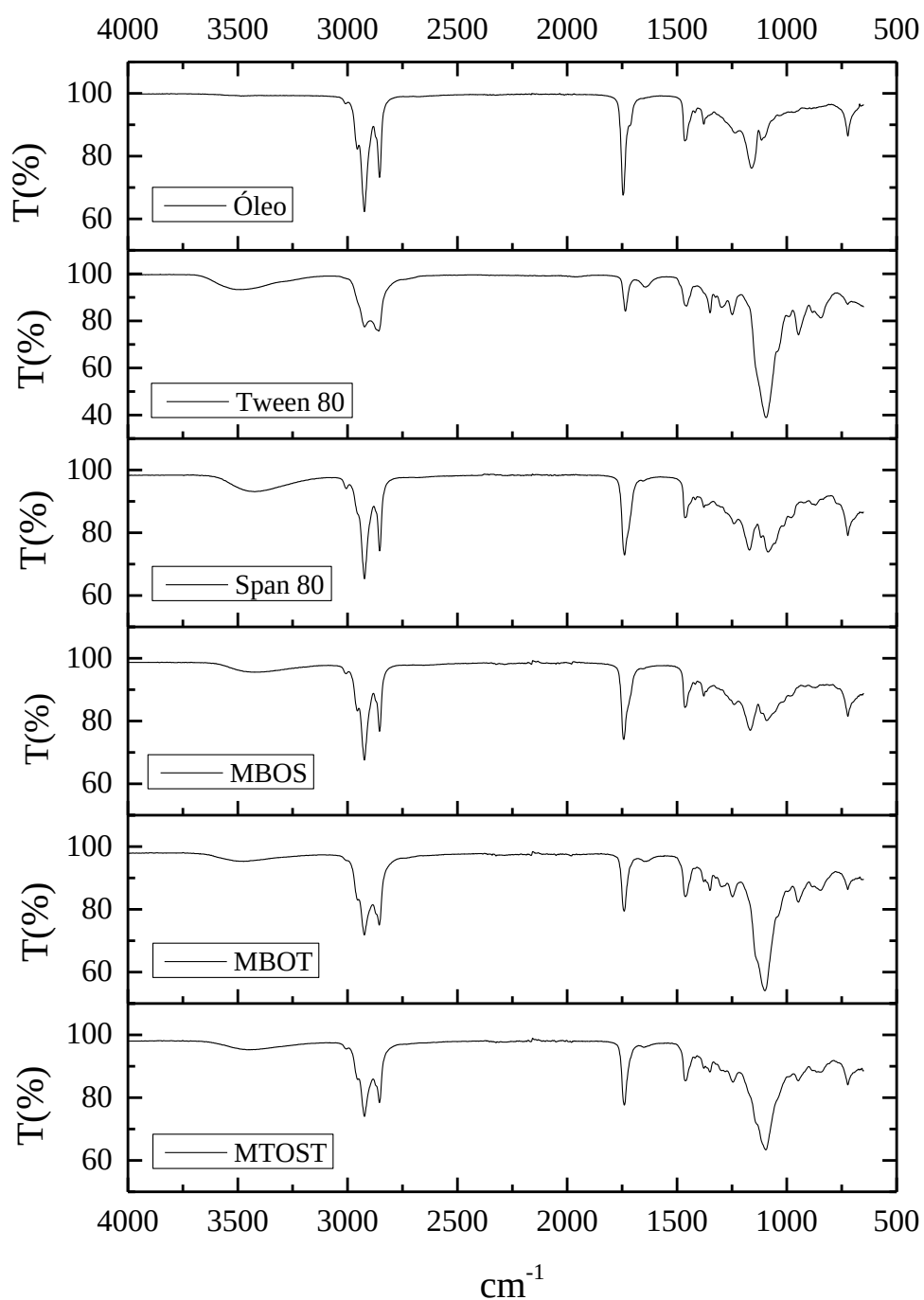
5.10 Estudo de compatibilidade frente a excipientes

Os tensoativos monooleato de sorbitano (Span 80) e polissorbato 80 (Tween 80) foram escolhidos baseados em suas características químicas e por serem comumente utilizados em escala laboratorial.

Foram preparadas misturas binárias na proporção de 1:1(m:m) do óleo da semente de *E. oleracea* e dos excipientes Span 80, identificada de MB_OS e Tween 80, identificada de MB_OT e uma mistura terciária identificada de MT_OST. As misturas foram analisadas por análise termogravimétrica e por espectroscopia por absorção na região do infravermelho com transformada de fourier (FTIR).

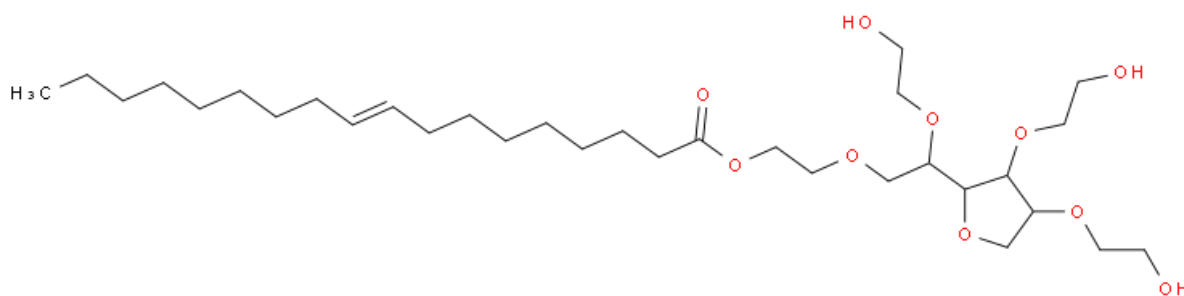
Na Figura 18, vemos os gráficos na região do Infravermelho referente às misturas físicas dos tensoativos com o óleo da semente de açaí e nas Figuras 19 e 20 a estrutura molecular dos tensoativos Span 80 e Tween 80.

Figura 18 - Estudo de compatibilidade das misturas físicas óleo- excipiente no FTIR

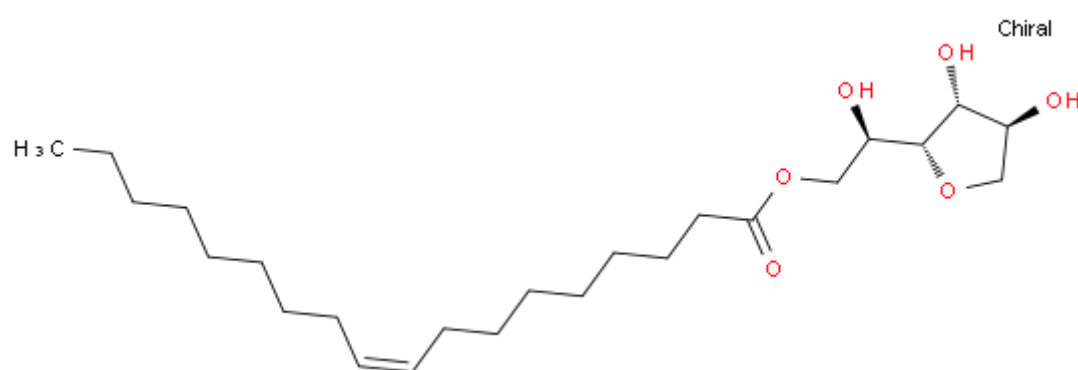


Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: MBOS: Mistura Binária Óleo e Span80; MBOT: Mistura Binária Óleo e Tween 80; MTOST: Mistura terciária Óleo, Span 80 e Tween 80.

Figura 19 - Estrutura molecular do Tween 80

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 20 - Estrutura molecular do Span 80

Fonte: Dados da pesquisa

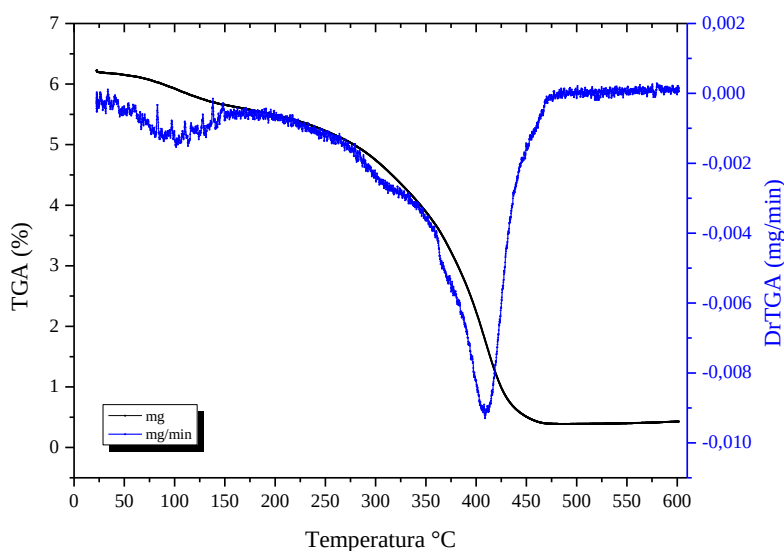
No gráfico referente a mistura binária óleo e Tween 80 (MB_OT), pode-se observar a presença das bandas relacionada aos grupos funcionais presentes nas moléculas de Tween 80 e do óleo. Estiramento com pico forte na região de $1747,12\text{ cm}^{-1}$ característico da ligação dupla C=O, vibrações de deformação axial de C–O na região de $1101,98\text{ cm}^{-1}$; concordantes para a ligação éster presente tanto na estrutura geral do triglicerídeo como do Tween 80, da ligação O–H na região de $3495,29\text{ cm}^{-1}$ e na região de $1465,51\text{ cm}^{-1}$ referente à ligação éter presente da estrutura do Tween 80.

No gráfico referente a mistura binária óleo e Span 80 (MB_OS), pode-se observar a presença das bandas relacionada aos grupos funcionais presentes nas moléculas de Span 80 e do óleo. Estiramento com pico forte na região de $1745,87\text{ cm}^{-1}$ característico da ligação dupla C=O, vibrações de deformação axial de C–O na região de $1159,32\text{ cm}^{-1}$; $1114,37\text{ cm}^{-1}$, concordantes para a ligação éster presente tanto na estrutura geral do triglicerídeo como do Span 80, da ligação O–H na região de $3461,53\text{ cm}^{-1}$ e na região de $1461,89\text{ cm}^{-1}$ referente à ligação éter presente da estrutura do Span 80.

No gráfico referente a mistura terciária óleo e Span 80 e Tween 80 (MT_OST), pode-se observar a presença das bandas relacionada aos grupos funcionais presentes nas moléculas de Span 80, Tween 80 e do óleo. Estiramento com pico forte na região de $1749,39\text{cm}^{-1}$ característico da ligação dupla C=O, vibrações de deformação axial de C–O na região de $1095,40\text{cm}^{-1}$ concordante para a ligação éster presente tanto na estrutura geral do triglicerídeo como dos tensoativos Span 80 e Tween 80, da ligação O–H na região de $3455,28\text{cm}^{-1}$ e na região de $1461,23\text{cm}^{-1}$ referente à ligação éter presente da estrutura do Span 80 e Tween 80. Dessa forma podemos concluir que os constituintes da mistura são compatíveis.

A análise termogravimétrica da mistura físicas óleo e Span 80 (Figura 21) tem o primeiro evento térmico a $75,94^\circ\text{C}$ terminando em $125,74^\circ\text{C}$ com perda de 6,31% de massa relacionado a perda de água da mistura, o segundo evento indicando degradação da amostra inicia em $359,64^\circ\text{C}$ terminando em $434,06^\circ\text{C}$ com perda de 85,745%.

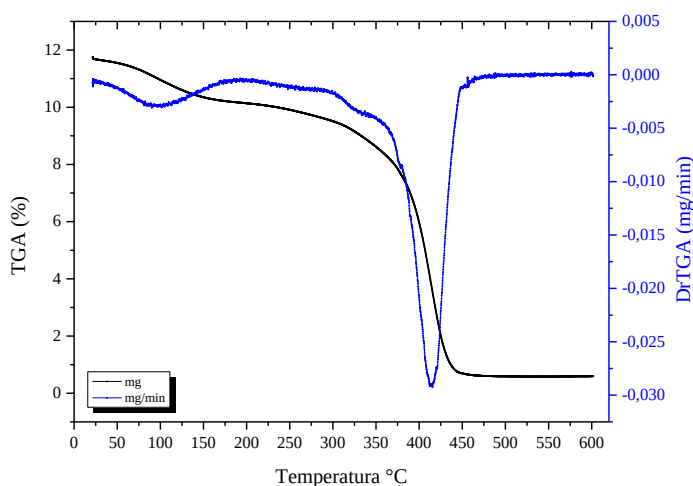
Figura 21 - Curva TG e DTG da mistura binária óleo e Span 80



Fonte: Dados da pesquisa

Na mistura física óleo e Tween80 (Figura 22) o primeiro evento térmico inicia a $72,77^\circ\text{C}$ terminando em $137,38^\circ\text{C}$, com perda de massa de 21,96% relacionado a perda de água da mistura. O segundo evento inicia a $386,95^\circ\text{C}$ e termina em $413,32^\circ\text{C}$ com perda de massa de 105,19% indicando degradação da amostra.

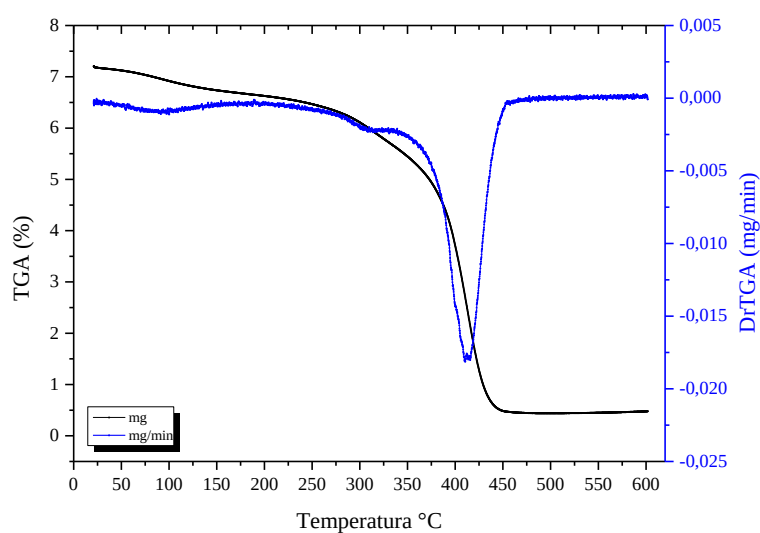
Figura 22 - Curva TG e DTG da mistura binária óleo e Tween 80.



Fonte: Dados da pesquisa

A mistura terciária (Figura 23) apresentou dois eventos térmicos o primeiro inicia na temperatura de 96,88°C, terminando em 123,86°C, com perda de massa de 7,91% relacionado a perda de água da mistura e o segundo evento tem início na temperatura de 356,78°C terminando em 433,21°C, com perda de massa de 86,94% o que indica degradação da amostra.

Figura 23 - Curva TG e DTG da mistura terciária óleo, Tween 80 e Span 80



Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 19 – Dados termoanalíticos das misturas físicas.

Parâmetros Termodinâmicos	Óleo semente <i>E. oleracea</i>	Span80	Tween80	MB_OS	MB_OT	MT_OST
Tonset /°C	275,59	314,04	343,81	359,64	386,95	356,78
Tpico /°C	389,92	354,23	370,13	386,64	392,33	385,30
Tendset /°C	418,32	415,13	413,47	434,06	413,32	433,21

Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: MB_OS: Mistura binária óleo e span80; MB_OT: Mistura binária óleo e tween80; MT_OST: Mistura terciária óleo, span80 e tween 80.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 19), conclui-se que os tensoativos não influenciaram na estabilidade térmica do óleo da semente de açaí, pois verificou-se que a degradação das misturas binárias e terciária ocorreu em temperaturas acima da temperatura de degradação do óleo da semente de *E. oleracea*.

5.11 Planejamento e desenvolvimento das formulações

A determinação do EHL do óleo da semente de *E. oleracea* ocorreu através do desenvolvimento de formulações com tensoativos de EHL conhecidos. Os tensoativos de baixo EHL formam uma emulsão do tipo água em óleo, enquanto os tensoativos de alto EHL formam uma emulsão do tipo óleo em água.

A combinação de tensoativos melhora a estabilidade da nanoemulsão, pois a diferença entre o tamanho dos grupos principais das moléculas promove efeito sinérgico entre eles, formando um revestimento protetor ao redor das gotículas, facilitando a quebra das mesmas durante o processo de homogeneização, reduzindo a tendência de agregação entre elas, além de melhorar a dispersibilidade e solubilidade da fase contínua (KOMAICO; McCLEMENTS, 2016; CHONG *et al*, 2018; KOROLEVA, NAGOVITSINA, YURTOV, 2018).

A seleção dos tensoativos deu-se em razão das características lipofílicas do Span 80 e hidrofílicas do Tween 80 além de possibilitar a formação de gotículas menores que outros polissorbatos da mesma classe. Quando combinados esses tensoativos, diminuem a pressão de Laplace, reduzindo a tensão interfacial, possibilitando utilizar menos energia no processo de emulsificação (KARAMI, KHOSHKAM, HAMIDI, 2019; KOMAICO; McCLEMENTS, 2016).

Os tensoativos escolhidos foram misturados em proporções variáveis, de modo a originarem valores definidos e escalonados de EHL, conforme pode ser observado na Tabela

20.

Tabela 20 - Características macroscópicas e análise de centrifugação das formulações desenvolvidas para determinar o EHL.

Experimento	EHL	Características macroscópicas	Análise de Centrifugação
1	5,37	Homogênea	Creaming
2	6,44	Homogênea	Não separou fase
3	7,51	Homogênea	Creaming
4	8,58	Homogênea	Creaming
5	9,65	Homogênea	Creaming
6	10,72	Creaming	-
7	11,79	Separação de fases	-
8	12,86	Creaming	-
9	13,93	Separação de fases	-

Fonte: Dados da pesquisa

As formulações preparadas foram mantidas em repouso por 24h a temperatura ambiente, em recipiente de vidro e hermeticamente fechado, conforme pode ser observado na Figura 24. Decorridas 24h, procedeu-se a observação macroscópica e teste de centrifugação dos experimentos.

Figura 24 - Formulações para cálculo do EHL após 24h.



Fonte: Dados da pesquisa

Não foi observado alterações de cor e odor nas formulações. Os experimentos 7 e 9 apresentaram separação de fase, onde podemos observar a presença do óleo da parte superior, devido a sua densidade ser menor que a densidade da água. Esse processo é resultado da coalescência que resulta em uma desestabilização de sistemas emulsionados. O início do processo se dá pela fusão de uma ou mais gotas, formando gotas maiores, levando a separação completa de fases, processo facilitado pela diferença de densidade entre as fases, pois as gotas tenderão a se concentrar no fundo ou no topo do recipiente (HO, *et al.*, 2022; LANGEVIN, 2019).

Nos experimentos 6 e 8 ocorreu a formação de creaming, fenômeno que ocorre quando gotículas dispersas separam-se pela influência da gravidade e formam uma camada de emulsão mais concentrada, nesse caso na superfície da fase contínua, devido a baixa densidade do óleo. A fase dispersa permanece no estado de glóbulos, de modo que se agitada as gotículas eram redispersas (AULTON; TAYLOR, 2016).

Os experimento 1,2,3,4 e 5 seguiram para o teste de centrifugação por estarem macroscopicamente estáveis. Após o teste observou-se a formação de creaming nos experimento 1,3,4 e 5 processo acelerado por força mecânica. Baseado nos resultados apresentados na tabela 20 o óleo da semente de açaí apresentou EHL de 6,44, referente ao experimento 2 que se manteve estável, apresentando 80% de Span 80 e 20% de Tween 80 na formulação.

5.11.1 Planejamento fatorial quali-quantitativo

As nanoemulsões possuem maior potencial de ação, estabilidade da formulação, dispersão em água, baixo custo e causam menor dano ao meio ambiente, principalmente no caso de vetores que possuem parte do seu ciclo ou ambiente vivo em contato com a água, fazendo com que nanoformulações de óleos sejam muito eficientes e altamente ecológicas. (ECHEVERRÍA; ALBUQUERQUE, 2019).

Para o planejamento fatorial das nanoemulsões, usou-se a concentração de 10,5 mg. mL⁻¹ de óleo de semente de açaí, pois nessa concentração já obtivemos 100% de mortalidade de pupas, no insaio inseticida. A porcentagem de tensoativo foi mantida, baseada no resultado do teste de EHL do óleo.

A técnica de alta energia utilizada na obtenção de nanoemulsões é um método capaz de vencer a pressão de Laplace, através de forças capazes de romper as gotas da fase dispersa em gotículas menores, de forma que a diferença entre as pressões externa e interna da gota seja superada (PÁEZ-HERNÁNDEZ, MONDRAGÓN-CORTEZ, ESPINOSA-ANDREWS 2019).

A ultrasonicação é uma técnica de alta energia, rápida e eficiente, onde as gotículas são quebradas por ondas de alta frequência através de vibrações mecânicas e de cavitação, de modo que as gotículas colapsam-se umas as outras, alcançando o tamanho de glóbulos menores, além de promover melhor uniformidade do tamanho de partícula e diminuição no tamanho das partículas (ESPINOSA-ANDREWS; PÁEZ-HERNÁNDEZ, 2020).

As formulações foram avaliadas macroscopicamente no T_0 e no T_{23} , onde não foi observado alteração de cor e odor ou qualquer indicativo de instabilidade, as mesmas foram então classificadas no T_0 da mais transparente para mais leitosa, de forma que os experimentos podem ser ordenados da seguinte forma $2 > 5 > 1 > 4 > 6 > 3 > 8 > 7 > 9$.

A fim de verificar a estabilidade das formulações, as mesmas foram avaliadas pelos testes de Índice de polidispersão (PDI), Tamanho de gotícula e Potencial Zeta no 23º dias de preparo (T_{23}), os resultados podem ser observados na Tabela 21.

Tabela 21 - Potencial Zeta, Tamanho de gotícula e PDI avaliados no T_{23} .

Experimento			Zeta (mV) Média ± DP	Tamanho (nm) Média ± DP	Intensidade - Tamanho (%)	PDI Média ± DP
1	+ [55]	+ [8]	-44,9 ± 1,46	206,2 ± 14,99	97,96 ± 1,83	0,245 ± 0,01
2	+ [55]	0 [6]	-36,6 ± 1,92	144,8 ± 9,23	88,43 ± 0,80	0,253 ± 0
3	+ [55]	- [4]	-29,3 ± 0,30	243,7 ± 22,06	92,33 ± 13,27	0,252 ± 0
4	0 [50]	+ [8]	-40,4 ± 1,91	192,7 ± 37,52	93,96 ± 4,36	0,244 ± 0,01
5	0 [50]	0 [6]	-40,1 ± 0,26	213,0 ± 13,72	100 ± 0	0,202 ± 0
6	0 [50]	- [4]	-48,3 ± 1,17	180,2 ± 13,15	90,9 ± 0,98	0,240 ± 0,01
7	- [45]	+ [8]	-48,2 ± 0,41	178,2 ± 14,42	93,63 ± 1,65	0,231 ± 0
8	- [45]	+ [6]	-39,3 ± 0,35	212,3 ± 8,17	97,96 ± 1,01	0,232 ± 0,01
9	- [45]	+ [4]	-45,7 ± 1,10	241,4 ± 13,82	96,53 ± 4,53	0,236 ± 0,01

Fonte: Dados da pesquisa.

O potencial zeta (ζ) é uma propriedade física medida pelo potencial eletrostático no plano de cisalhamento, definido como a distância a partir da superfície da partícula. Na superfície de uma partícula existem duas camadas de cargas, uma fortemente ligada ao núcleo camada de Stern e outra mais difusa (camada de Goy-Chapman) que se distribui em torno da primeira. Quando uma partícula se move, as cargas se movem com a partícula enquanto outras se separam da camada difusa. A força necessária para remover as partículas da camada difusa é o potencial zeta, que é medido em mV (PIORKOWSKI, MCCLEMENTS, 2014; MCCLEMENTS 2016).

O potencial zeta é usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões. Um valor de potencial zeta $> \pm 30$ mV é importante para a estabilidade físico-química das emulsões uma vez que as forças repulsivas tendem a evitar fenômenos de floculação, precipitação e até mesmo separação de fases, aumentando assim a probabilidade de agregação (FRONZA, CAMPOS, TEIXEIRA, 2004). Considerando o valor de potencial

zeta das formulações no T_{23} , apenas o experimento 3 apresentou valor menor que -30 mV, o que pode ser um indicativo de instabilidade da formulação, as demais formulações apresentaram potencial zeta dentro do esperado.

As formulações apresentaram valor de potencial zeta negativo o que pode estar relacionado a interações com os tensoativos não iônicos utilizados, o que pode ter resultado na adsorção de íons hidroxilas na interface óleo/água provenientes das ligações de hidrogênio da água com os grupamentos químicos presentes no Tween 80 e na composição do óleo da semente de *E. oleracea*, tornando a carga superficial da gotícula de nanoemulsão mais negativa (PIRES, MOURA, 2017).

Contente e colaboradores (2020) descrevem valores de potencial zeta maior que -30 mV em formulações com óleo do fruto de *E. oleracea* e variações dos tensoativos álcool cetosteárilico etoxilado 20OE e o óleo de rícino hidrogenado e etoxilado. Oliveira e colaboradores (2016) desenvolveram nanoemulsões com óleo de *Pterodon emarginatus* Vogel e variações de Tween 80 e Span 80 como tensoativos, obtendo valores de potencial zeta maior que -30 mV após 60 dias de preparo, dados que corroboram com os resultados apresentados na pesquisa.

O índice de polidispersidade (PDI) é usado como um fator para determinar a estabilidade da nanoemulsão, sendo uma medida de distribuição do tamanho das gotículas, em uma faixa de 0,1 a 1. Quando o resultado está próximo a zero, significa que a população da amostra é mais homogênea, proporcionando uma alta estabilidade cinética do sistema, valores entre 0,1 e 0,2 indicam uma distribuição estreita e índices acima de 0,5 uma distribuição mais ampla e baixa estabilidade (AGRAWAL, MADDIKERI, PANDIT, 2017).

A avaliação PDI no T_{23} variou de 0,202 a 0,253, estando dentro da faixa que indica uma estreita distribuição entre elas, indicando formulações estáveis. Quanto menor o tamanho de partícula e o índice de polidispersidade, mais estável será o sistema (KIM; PARK; LIM, 2015). De acordo com Walker, Decker, McClements (2015), a estabilidade das gotículas depende de fatores como tamanho inicial da gotícula, concentração de tensoativo e método de obtenção.

O tamanho da gotícula interfere significativamente na estabilidade do sistema formado, se há aumento no tamanho pode haver coalescência, se há diminuição pode favorecer a ocorrência do amadurecimento de Ostwald por meio da difusão do conteúdo lipofílico de gotículas menores para as maiores através da fase externa do sistema emulsionado, o que causa o crescimento da gotícula (CAPEK, 2004), as quais podem ser

evitadas, segundo alguns autores (JANG *et al.*, 2019) pela adição de trigliceróis na fase oleosa.

O tamanho de gotícula das nanoemulsões no T₂₃ variou de 144,8 a 243,7nm. As nanoemulsões apresentam tamanho de gotícula que varia de 20 a 500nm, sendo que nanoemulsão com uma faixa de tamanho de 50 a 200 nm forma uma solução transparente, e um tamanho de até 500 nm dá uma aparência leitosa ou turva (JAFARI, HE, BHANDARI, 2006; GAZOLU-RUSANOVA *et al.*, 2020).

A formulação referente ao experimento 2 com tamanho de gotícula de 144,8 no T₂₃ foi a que apresentou coloração mais transparente em relação a todas as outras, o que corrobora com a literatura, que relaciona tamanho de gotícula com características aparente das nanoemulsões.

Os resultados das variáveis dependentes PDI, Potencial Zeta e Tamanho de Gotícula no T₂₃ foram avaliados estatisticamente por ANOVA e não houve diferença estatística entre os resultados, como podemos observar nas Tabelas 22, 23 e 24.

Tabela 22 - Análise estatística da variação de potência e tempo no comportamento do PDI da nanoemulsão.

Fator	SS	Df	MS	F	p
Fator A: potência (L)	0,000294	1	0,000294	0,898599	0,413092
Fator A: potência (Q)	0,000044	1	0,000044	0,133126	0,739417
Fator B: tempo (L)	0,000323	1	0,000323	0,986218	0,393871
Fator B: tempo (Q)	0,000228	1	0,000228	0,695514	0,465487
Fator A (L) x Fator B (L)	0,000020	1	0,000020	0,061893	0,819587
Erro	0,000982	3	0,000327		
Total SS	0,001890	8			

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: SS: Soma dos quadrados; Df: graus de liberdade; MS: quadrados médios.

Tabela 23 - Análise estatística da variação de potência e tempo no comportamento do Tamanho de gotícula da nanoemulsão.

Fator	SS	Df	MS	F	p
Fator A: potência (L)	2116,882	1	2116,882	1,596599	0,295650
Fator A: potência (Q)	279,267	1	279,267	0,210630	0,677484
Fator B: tempo (L)	144,060	1	144,060	0,108653	0,763357
Fator B: tempo (Q)	319,202	1	319,202	0,240749	0,657314
Fator A (L) x Fator B (L)	1095,610	1	195,610	0,826333	0,430354
Erro	3977,608	3	1325,869		
Total SS	7932,629	8			

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: SS: Soma dos quadrados; Df: graus de liberdade; MS: quadrados médios.

Tabela 24 - Análise estatística da variação de potência e tempo no comportamento do Potencial Zeta da nanoemulsão.

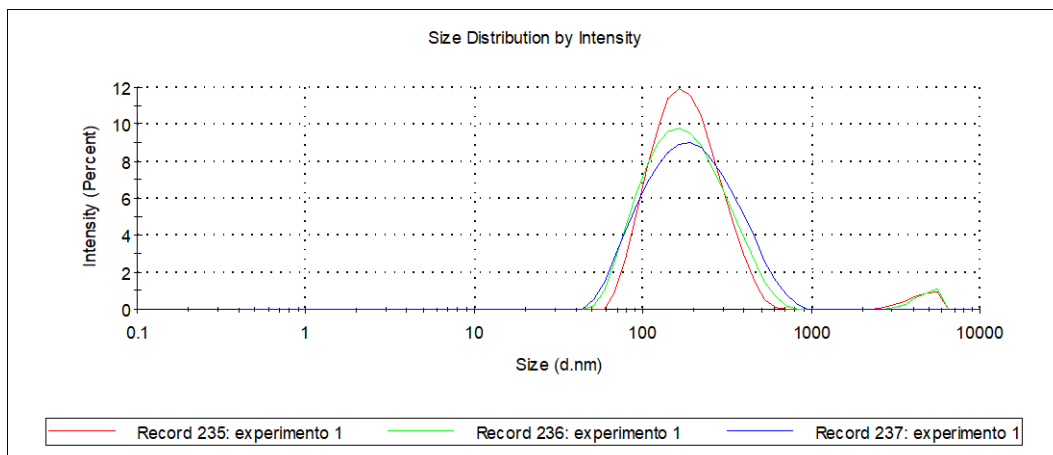
Fator	SS	df	MS	F	p
Fator A: potência (L)	41,0817	1	41,0817	1,716936	0,281381
Fator A: potência (Q)	101,2939	1	101,2939	4,233400	0,131809
Fator B: tempo (L)	0,6667	1	0,6667	0,027862	0,878050
Fator B: tempo (Q)	0,8022	1	0,8022	0,033527	0,866391
Fator A (L) x Fator B (L)	81,9025	1	81,9025	3,422971	0,430354
Erro	71,7819	3	23,9273		0,161404
Total SS	297,5289	8			

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: SS: Soma dos quadrados; Df: graus de liberdade; MS: quadrados médios.

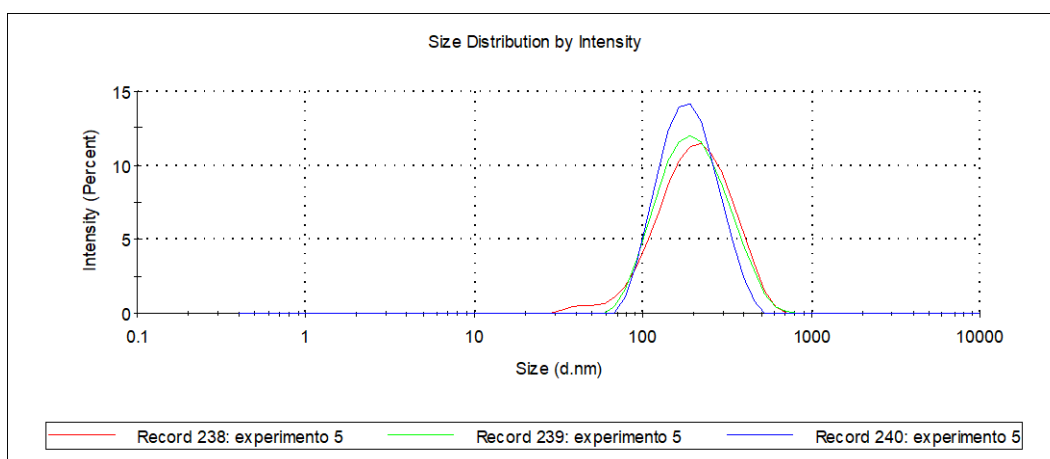
As formulações escolhidas para o teste de estabilidade basearam-se então nas que apresentaram maior uniformidade de populações de gotículas no T₂₃, considerando como uma única população acima de 97%, sendo os experimentos 1, 5, 8, conforme pode ser observado nas figuras 25, 26 e 27 que representam os gráficos tamanho de gotícula em relação a intensidade.

Figura 25 - Gráfico referente ao tamanho de gotícula em relação a intensidade do experimento 1.



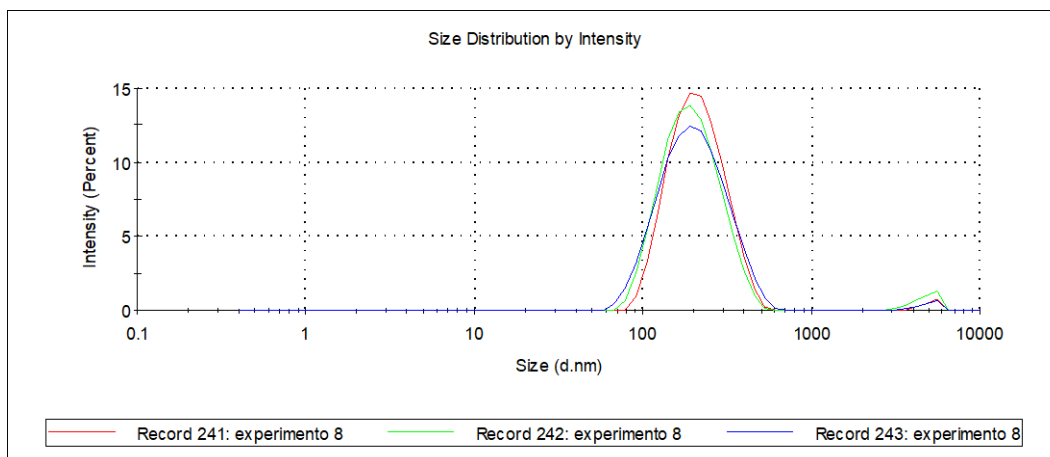
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 26 - Gráfico referente ao tamanho de gotícula em relação à intensidade do experimento 5.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 27 - Gráfico referente ao tamanho de gotícula em relação à intensidade do experimento 8.



Fonte: Dados da pesquisa.

Os experimentos 2, 4, 6, 7 e 9 apesar de apresentarem tamanho de gotícula dentro do esperado, quando avaliados em razão da porcentagem dessa população é possível observar a presença de mais de uma população, o que pode ser um indicativo de instabilidade do sistema emulsionado.

5. 12 Estabilidade Acelerada

As formulações escolhidas para o teste de estabilidade foram denominadas de F1 (referente ao experimento 1), F2 (referente ao experimento 5) e F3 (referente ao experimento 8). Os resultados de estabilidade apresentados até o momento são preliminares, pois o teste terá continuidade após a defesa deste trabalho.

5.12.1 Análise macroscópica e pH

As formulações foram avaliadas no T0 e T15 quanto ao pH e macroscopicamente logo após o preparo (T0), após 7 dias (T7) e 15 dias (T15), conforme pode ser observado na Tabela 25. Os resultados da estabilidade até o décimo quinto dia, quanto a análise das características macroscópicas (aspecto e cor) e pH não demonstraram alterações nas nanoemulsões.

Tabela 25 – Parâmetros de pH e análise macroscópica da nanoemulsão.

Parâmetros	Exp.	T0	T7	T15
pH	F1	5,66	-	5,89
	F2	6,23	-	6,15
	F3	5,45	-	5,60
Aspecto	F1	Homogênea	Homogênea	Homogênea
	F2	Homogênea	Homogênea	Homogênea
	F3	Homogênea	Homogênea	Homogênea
Cor	F1	Braco leitoso	Braco leitoso	Braco leitoso
	F2	Braco leitoso	Braco leitoso	Braco leitoso
	F3	Translucida	Translucida	Translucida

Fonte: Dados da pesquisa.

Emulsões com óleos vegetais podem exibir um decréscimo do pH devido a hidrólise dos ésteres de ácidos graxos em ácidos graxos livres que é o produto majoritário de degradação, indicando reações de degradação do óleo (MASMOUDI *et al.*, 2005), até o décimo quinto dia o valor de pH não sofreu alteração.

5.12.2 Medições de potencial Zeta, Índice de polidispersão e Tamanho de gotícula

A análise do perfil da distribuição de partículas durante o teste de estabilidade permite acompanhar o comportamento das gotículas evidenciando fenômenos de instabilidade. As formulações foram avaliadas quanto ao índice de polidispersividade, tamanho de gotícula e potencial zeta, no T0, T7 e T15.

O índice de polidispersividade (PDI) das formulações pode ser observado na Tabela 26, seus valores indicam uma distribuição estreita e homogênea das gotículas, tendo em vista que no T15 estão na faixa de 0,197 a 0,299, sendo consideradas estáveis (AGRAWAL, MADDIKERI, PANDIT 2017).

Tabela 26 – Avaliação do Índice de Polidispersividade (PDI) no teste de estabilidade acelerada.

Exp.	PDI Média $\pm$ DP		
	T0	T7	T15
F1	0,216 $\pm$ 0,01	0,201 $\pm$ 0,02	0,211 $\pm$ 0,00
F2	0,200 $\pm$ 0,02	0,172 $\pm$ 0,03	0,197 $\pm$ 0,01
F3	0,305 $\pm$ 0,02	0,369 $\pm$ 0,01	0,299 $\pm$ 0,01

Fonte: Dados da pesquisa.

Na Tabela 27 pode-se observar o tamanho das gotículas das formulações, a F3 apresentou uma ampla variação durante o período de análise o que pode ser indicativo de instabilidade da formulação podendo levar a coalescência ou amadurecimento de Ostwald (CAPEK, 2004), as formulações F1 e F3 não apresentaram ampla variação, permanecendo estáveis até o décimo quinto dia de estudo.

Tabela 27 - Avaliação do Tamanho de gotícula no teste de estabilidade acelerada.

Exp.	Tamanho (nm) Média $\pm$ DP		
	T0	T7	T15
F1	237,46 $\pm$ 6,82	248,40 $\pm$ 17,86	246,40 $\pm$ 38,03
F2	240,40 $\pm$ 4,19	235,96 $\pm$ 7,62	253,66 $\pm$ 7,48
F3	59,74 $\pm$ 4,06	140,25 $\pm$ 2,75	63,46 $\pm$ 0,87

Fonte: Dados da pesquisa.

Conforme pode ser observado na Tabela 28, o potencial Zeta no T15 das três formulações está abaixo de -30mV, o que pode ser um indicativo de instabilidade para alguns autores (FRONZA, CAMPOS, TEIXEIRA, 2004). Para Lieberman, Rieger, Banker (1988)

apenas valores menores que $\pm 25\text{mV}$ podem ser considerados como indicativos de que as forças atrativas excedem as forças repulsivas, e as partículas se juntam levando à floculação, de forma que a formulação F3 no T15 apresenta início de um processo de instabilidade da nanoemulsão.

Tabela 28 - Avaliação do Potencial Zeta no teste de estabilidade acelerada.

Exp.	Zeta (mV) Média $\pm$ DP		
	T0	T7	T15
F1	- 35,06 $\pm$ 3,23	-33,66 $\pm$ 0,75	-28,50 $\pm$ 0,62
F2	-38,06 $\pm$ 1,87	-31,43 $\pm$ 0,28	-26,70 $\pm$ 0,81
F3	-23,06 $\pm$ 2,38	-34,80 $\pm$ 2,45	-24,60 $\pm$ 0,35

Fonte: Dados da pesquisa.

5.13 Atividade larvicida da nanoemulsão contendo óleo da semente de *E. oleracea* frente *Aedes aegypti*

O teste larvicida preliminar da nanoemulsão contendo óleo da semente de açaí foi realizado na concentração de $0,35\text{mg mL}^{-1}$, os resultados podem ser observados na Tabela 29.

Durante todo o experimento as larvas encontravam-se incapazes de subir a superfície, e com pouca mobilidade logo nas primeiras horas de experimento. A morte das mesmas foi observada em 48h, caracterizando a nanoemulsão como um larvicida de ação lenta (OMS, 2005).

Tabela 29 - Percentual de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti*, expostas a nanoemulsão a base de *Euterpe oleracea*, em relação ao tempo de exposição.

Concentrações (mg mL^{-1})	Mortalidade (%)						
	1 h	2 h	4 h	8 h	16 h	24 h	48h
0,35	0,00	0,00	0,42	0,00	1,67	0,00	32,91
10,5	0,00	0,00	0,00	6,67	0,00	63,33	93,33
Controle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Fonte: Dados da pesquisa

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados expostos, podemos inferir que:

- As características físico-químicas do óleo não foram alteradas pelo método de extração, principalmente mantendo um baixo índice de acidez; Apresentou-se termicamente estável até 155°C.
- O perfil fitoquímico do óleo de *E. oleracea* por análise qualitativa apresentou os seguintes compostos majoritários: Ácido hexadecanóico, (Z) 6-Pentadecenol;
- O óleo da semente de *E. oleracea* apresentou média de 28% de ácidos graxos saturados e 72% de insaturados. O ácido linoléico mostrou-se majoritário, representando valor médio de 38,65%.
- Não foi observada atividade citotóxica frente às células analisadas.
- A atividade larvicida frente *Aedes aegypti* foi verificada no intervalo de concentração de 1,7 a 6,8 mg mL⁻¹ da emulsão e atividade pupicida no intervalo de concentração de 3,5 a 13,6 mg mL⁻¹ contendo óleo da semente de *E. oleracea*;
- O óleo da semente de *E. oleracea* foi considerado seguro para mamíferos, pois não foi observado nenhum obtito no teste de toxicidade aguda.
- Não foi identificado incompatibilidade entre o óleo e os excipientes da formulação.
- As melhores formulações relacionadas ao planejamento experimental foram os experimentos 1, 5 e 8, apresentando melhores resultados de PDI, zeta e tamanho de gotícula.
- A estabilidade acelerada preliminar da nanoemulsão mostrou que as formulações 1 e 2 mantiveram-se estáveis até a avaliação no T15.
- A atividade larvicida da nanoemulsão frente *Aedes aegypti* foi verificada após o período de 48h.
- Dessa forma, podemos inferir que ao final do estudo foi desenvolvido um larvicida de origem vegetal e inovador como uma alternativa promissora para o controle do *Aedes aegypti*, utilizando como matéria prima a semente de *E. oleracea* que é considerado um resíduo sólido urbano, contribuindo para sua redução e agregando valor a cadeia de comercialização da espécie.

7 PERSPECTIVAS

- Realizar a atividade antioxidante celular do óleo de *E. oleracea*;
- Realizar avaliação microbiológica da nanoemulsão.
- Realizar estudo de fotoestabilidade da nanoemulsão a base do óleo da semente de *E. oleracea*.
- Finalizar o teste de estabilidade acelerada da nanoemulsão a base do óleo da semente de *E. oleracea*.
- Realizar estudo de estabilidade longa duração da nanoemulsão a base do óleo da semente de *E. oleracea*.
- Realizar o teste de repelência frente *Aedes aegypti* com nanoemulsão a base do óleo da semente de *E. oleracea*;
- Realizar o teste de ecotoxicidade da nanoemulsão a base do óleo da semente de *E. oleracea*;

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, N.; MADDIKERI, G. L.; PANDIT, A. B. Sustained release formulations of citronella oil nanoemulsion using cavitation techniques. **Ultrasonic Sonochemistry**, May; v. 36, p. 367–74, 2017.
- AGUIAR, A. G. R. **Manejo de população de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) em parcelas de produção de frutos em área de várzea**. 2016. 95f. Dissertação (Mestrado em Agriculturas Familiares e Desenvolvimento Sustentável) - Universidade Federal Do Pará, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Belém, 2016.
- AHMADI, O.; JAFARIZADEH-MALMIRI, H. Green approach in food nanotechnology based on subcritical water: Effects of thyme oil and saponin on characteristics of the prepared oil in water nanoemulsions. **Food Science and Biotechnology**, v. 29, n.6, p. 783–792, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00727-0>
- AHMED, S. A.; GOGAL, J. R. R. M.; WALSH, J. E.; J. **Immunol. Methods** 1994, 170, 211.
- ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 9 ed. São Paulo: Artmed, 2007.
- ALMEIDA, G. Os mosquitos (Diptera, Culicidae) e a sua importância médica em Portugal, desafios para o século XXI. **Acta Medica Portuguesa**, v. 24, n. 6, p. 961-974, 2011.
- ANDERSON, A. B. Use and management of native forests dominated by açai palm (*Euterpe oleracea* Mart.) in the amazon estuary. **Advances in Economical Botany**, New York, v.6, p.144-154, 1986.
- ANJOLETTE, A. F. F.; MARCORIS, M. L. G. Técnicas para manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.13, n. 156, p. 19-29, 2016.
- ARAÚJO, A. A. S. **Análise térmica e determinação dos parâmetros cinéticos de preparações farmacêuticas e novas especialidades de zidovudina**. 2003. 241 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

ASWATHANARAYAN, J.B.; VITTAL, R.R. Nanoemulsions and Their Potential Applications in Food Industry. **Front. Sustain. Food Syst**, v. 3, p. 95, 2019. doi: 10.3389/fsufs.2019.00095

AULTON, M.E.; TAYLOR, K.M.G. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4ª Ed., Elsevier, 855p, 2016

AVELINO-SILVA, V. I.; RAMOS, J. F. Arboviroses e políticas públicas no Brasil / Arboviruses and public policies in Brazil. **Revista ciências em saúde**, v. 7, n. 3: p. 1-2. 2017. DOI: <https://doi.org/10.21876/rcsfmit.v7i3.675>.

BAZ, M. M. *et al.* Efeitos larvicidas e adulticidas de alguns óleos egípcios contra *Culex pipiens*. **Sci Rep**, v. 12, p. 4406, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08223-y>

BENÍTEZ, R. O. Perdas e desperdícios de alimentos na América Latina e no Caribe. **Food and agriculture organization**. Disponível em: <http://www.fao.org/americas/noticias/ver/pt/c/239394/>. Acesso em : 12 de jun de 2020.

BESERRA, E. B. *et al.* Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia**. Sér. Zool, Porto Alegre, v. 99, n. 3, p. 281-285, Sept. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0073-47212009000300008>.

BESERRA, E. B.; CASTRO-JUNIOR, F. P. Biologia comparada de populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) da Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 1, p. 81- 85, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2008000100012>.

BRAGA I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiol Serv Saúde**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 113-8, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742007000200006>.

BRASI. **Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015**. Dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. **Diário Oficial**: República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2015b.

BRASIL. **Cadeia produtiva do açaí no estado do Amazonas**. Série Técnica Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável, 1, 32.2005a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2ª edição, revista – Brasília : Anvisa, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal**. RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005b.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v. 1, 6ed. p. 524, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika)**, Semanas Epidemiológicas 1 a 34. Boletim Epidemiológico, Brasília, v. 50, n. 22, Set/2019. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 24 de 2022**. Boletim Epidemiológico, Brasília, v.53, n.24, Jun. 2022. Disponível em: < <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos> >

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 48**. Boletim Epidemiológico, Brasília, v.46, n.44, Dez/2015a. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49**. Boletim Epidemiológico, Brasília, v.47, n.38, Dez/2016a. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 50**. Boletim Epidemiológico, Brasília, v.48, n.45, Dez/2017. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 48**. Boletim Epidemiológico, Brasília, v.49, n.59, Dez/2018. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 50**. Boletim Epidemiológico, Brasília, v.48, n.45, Dez/2017. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 48**. Boletim Epidemiológico, Brasília, v.49, n.59, Dez/2018. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 5ª ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2016b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão do Trabalho e da Educação na Saúde. **Dengue: decifra-me ou devoro-te**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão do Trabalho e da Educação na Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção Básica. **Chikungunya: Manejo Clínico**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. **RDC Nº 34, de 16 de agosto de 2010**. Regulamento Técnico para produtos saneantes desinfestantes. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010b.

BRASIL. **Resolução-RDC Nº 59, de 17 de dezembro de 2010**. Dispõe sobre os procedimentos e requisitos técnicos para a notificação e o registro de produtos saneantes e dá outras providências. ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010a.

CALBO, M. E. R.; MORAES, J. A. P. V. DE. Efeitos da deficiência de água em plantas de *Euterpe oleracea* (açai). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 225–230, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0100-84042000000300001>.

CALZAVARA, B. B. G. **As possibilidades do açaizeiro no estuário amazônico**. Belém: Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 103p. 1972.

CAMARGO, M. F. P. **Desenvolvimento de nanoemulsões a base do óleo de maracuja e óleo essencial de lavanda e avaliação da atividade antiinflamatória tópica**. 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos). Universidade de São Paulo. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto. 2008.

CAPEK, I. Degradation, of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, p. 125-155, 2004.

CARNEIRO, J. S. *et al.* Estudo de viabilidade do aproveitamento energético da queima de caroços de açaí produzidos no município de Castanhal-PA. **Amazônia em Foco**, v. 2, n. 2, p. 47-63, 2013.

CARVALHO, A. C. O. **Características físico-químicas de óleos vegetais puros e adulterados**. 2017. 79 f. Monografia (Licenciatura em química) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.

CARVALHO, C. D. S.; DE SOUZA, Z. H. Reflexão acerca da incidência dos casos de Dengue, Chikungunya e Zika no Brasil. **Anais Colóquio Estadual de Pesquisa Multidisciplinar**, v. 1, n. 1, 2017.

CARVALHO, F. D.; MOREIRA, L. A. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so successful as a species. **Neotrop Entomol**, v. 46, p. 243–55, 2017.

CASTRO, D. A. R. **Estudo de processo de pirólise de semente de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) para produção de biocombustíveis**. 2019. 300f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Naturais na Amazônia, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

CASTRO-JÚNIOR, F. P. *et al.* Ciclos de vida comparados de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) do semiárido da Paraíba. **Iheringia Sér Zool**, v.103, n.2, p.118-123. 2013. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0073-47212013000200006>.

CAVALCANTE, L. Mercado milionário: Quase 70 mil toneladas de açaí saem do AM.

Acritica, Manaus, 2019. Disponível em:

<https://www.acritica.com/channels/cotidiano/news/mercado-milionario-quase-70-mil-toneladas-de-acai-saem-do-interior-do-am>. Acesso em: 20 ago. 2019.

CAVALCANTE, P. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Belém: CEJUP, 1991. 271p. 1991

CHAUDHARY, S.; KUMAR, S.; KUMAR, V.; SHARMA, R. Chitosan nanoemulsions as advanced edible coatings for fruits and vegetables: Composition, fabrication and developments in last decade. **International journal of biological macromolecules**, v. 152, p. 154-170, 2020.

CHONG, W. T. *et al.* Optimization of process parameters in preparation of tocotrienol-rich red palm oil-based nanoemulsion stabilized by Tween 80-Span 80 using response surface methodology. **Plos one**, n. 13, v. 8, 2018.

CIENLAB. CienlaB equipamentos científicos. Equipamentos. Disponível em: <<https://www.cienlab.com.br/sonicador-de-ponteira-ultrassonico-desruptor-de-celulas-350-watts.html>>. Acesso em: 05 de julho de 2022.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Boletim da Sociobiodiversidade, Brasília, DF, v. 6, n. 1, março 2022. Disponível em: <[file:///C:/Users/stefa/Downloads/BoletimZdaZSociobiodiversidadeZ-ZMaroZ-Z2022%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/stefa/Downloads/BoletimZdaZSociobiodiversidadeZ-ZMaroZ-Z2022%20(1).pdf)>. Acesso em: 23 de jun de 2022.

CONSOLI, R.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora Fiocruz, 1994.

CONTENTE, D. M. L. *et al.* Nanoemulsions of Acai Oil: Physicochemical Characterization for the Topical Delivery of Antifungal Drugs. **Chemical Engineering & Technology**. v. 43, n. 7, p. 1424–1432, 2020. doi:10.1002/ceat.201900627

CORDEIRO, L. B. A. **Desenvolvimento farmacotécnico e estudo de estabilidade de emulsões a base de óleo de semente de maracujá para prevenção de feridas**. 2012. 218f. Dissertação (Mestrado em ciências aplicadas a produtos para a saúde)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2012.

- COSTA, C. A. *et al.* Effect of *Euterpe oleracea* Mart. Seeds Extract on Chronic Ischemic Renal Injury in Renovascular Hypertensive Rats. **Journal of Medicinal Food**, v.20, p. 1002-1010, 2017.
- COSTA, C. L. *et al.* Caracterização físico-química de óleos fixos artesanais do coco babaçu (*Orbignya phalerata*) de regiões ecológicas do estado do Maranhão, Brasil. **Pesquisa em Foco**, v. 20, n. 1, p. 27–38, 2015.
- CRUZ R. C. D. *et al.* Toxicological evaluation of essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Mus musculus* (Rodentia: Muridae). **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 4, p. 985–993, 2017. DOI: 10.1093 / jme / tjw239.
- DALTIN, D. **Emulsionantes: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher. 2012.
- DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. **Princípios e aplicações de análises térmicas**. São Carlos: IQSC, 2012.
- DIAS, C. N., MORAES, D.F.C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. **Parasitol. Res**, v. 113, p. 565–592, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3687-6>.
- DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. **Parasitol Res**, v. 113, n. 2, p. 565–592, 2014. Doi: 10.1007 / s00436-013-3687-6.
- DIAS, L. B. A. *et al.* Dengue: transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. **Medicina**, v.43, n. 2: p. 143-52, 2010.
- DICK, G. W.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus I. Isolations and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v.46, p. 509-20. 1952.
- DOMINGUES, A. F. N.; MATTIETTO, R. A.; OLIVEIRA, M. S. P. Teor de lipídeos em caroços de *Euterpe oleracea* Mart. **Embrapa Amazônia Oriental**. Boletim de pesquisa e desenvolvimento. Belém, PA, 2017.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; VON ZUBEN, A. P. B. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Rev Saude Publica**, São Paulo, v. 51, n. 30, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s1518-8787.2017051006889>.

Dossiê Óleos. **Food Ingredients Brasil**, n. 31, p. 38–55, 2014.

ECHEVERRÍA, J.; ALBUQUERQUE, R. D. D. G. Nanoemulsions of Essential Oils: New Tool for Control of Vector-Borne Diseases and In Vitro Effects on Some Parasitic Agents. **Medicines**, v. 6, p. 42, 2019. <https://doi.org/10.3390/medicines6020042>.

ELIAS, G. A. **Palmeiras (Arecaceae) em Santa Catarina, Sul do Brasil**. 2017. 193 f. Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Criciúma, SC, 2017.

ELIAS, G. A.; CORRÊA, P. F.; ZANETTE, V. C.; SANTOS, R. Arecaceae: análise bibliométrica das espécies nativas do estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência e Natura**, v.37 n.1, jan.-abr. p. 85 – 92, 2015.

ESPINOSA-ANDREWS, H., PÁEZ-HERNÁNDEZ, G. Optimization of ultrasonication curcumin-hydroxylated lecithin nanoemulsions using response surface methodology. **J Food Sci Technol**, v.57, p. 549-556, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04086-w>

ESPINOZA, M. M. Aspectos clínicos de la infección por el virus zika. **An Fac med**, v. 78, n. 1, p. 79-82. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v78i1.13026>.

FARIAS NETO, J. T. *et al.* Influência da idade sobre as estimativas de parâmetros genéticos em progênes de açaizeiro. **Revista Científica Rural**, Bagé-RS, v. 11, n.1, p. 108-115, 2006.

FENG, X. *et al.* Effects of tocopherol nanoemulsion addition on fish sausage properties and fatty acid oxidation. **LWT-Food Science and Technology**, v. 118, p. 108737, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108737>

FERNADEZ, P., ANDRÉ, V., RIEGER, J. KUHMLE, A. Nanoemulsions formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. Amsterdam, v. 251, p. 53-58, 2004.

FERNANDES, D. A. *et al.* Ovicidal, pupicidal, adulticidal, and repellent activity of *Helicteres velutina* K. Schum against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Brazilian**

Journal of Veterinary Medicine, v. 43, p. e112120, 2021. <http://dx.doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm112120>.

FERREIRA, L. M.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Bacterial larvicides for vector control: mode of action of toxins and implications for resistance. **Biocontrol Science and Technology**, v. 23, n. 10, p. 1137- 1168, 2013.

FLEMMING, A.; PICKER-FREYER, K. M. Compaction of lactose drug mixtures: quantification of the extent of incompatibility by FT-Raman spectroscopy. **Eur J Pharm Biopharm**. v.68, n. 3: p. 802-10. 2008. Doi: 10.1016/j.ejpb.2007.07.012.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. 1 ed. São Paulo, Brasil, 2002.

FRANZOL, A.; REZENDE, M, C. Emulsion stability: a case study involving anionic, cationic and nonionic emulsifiers. **Polímeros**, v. 25, p. 1-9, 2015.

FRONZA, T., CAMPOS, A., TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como Sistemas de Liberação para Fármacos Oftálmicos. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, p. 558-66, 2004.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Cambridge reforça eficácia do Método Wolbachia contra arboviroses. 2022. Disponível em:< <https://portal.fiocruz.br/noticia/cambridge-reforca-eficacia-do-metodo-wolbachia-contrarboviroses> >. Acesso em: 04 de outubro de 2022.

GARCEZ, W. S. *et al*. Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

GARZON, G. A. *et al*. Polyphenolic composition and antioxidant activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) from Colombia. **Food Chemistry**, v. 217, p. 364–372, 2017. Doi: 10.1016 / j.foodchem.2016.08.107

GAZOLU-RUSANOVA, D. *et al*. Food grade nanoemulsions preparation by rotor-stator homogenisation. **Food Hydrocolloids**, v.102, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105579>.

GHARIBZAHEDI, S.M.T.; MOHAMMADNABI, S. Characterizing the novel surfactantstabilized nanoemulsions of stinging nettle essential oil: Thermal behaviour, storage stability, antimicrobial activity and bioaccessibility. **Journal of Molecular Liquids**, v. 224, p.1332- 1340, 2016.

GIL, E. S. *et al.* **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007.

GIOLITO, I. Desenvolvimento, classificação e aplicações dos métodos termoanalíticos. **Rev. Quím. Ind.**, Rio de Janeiro, n.663, p.12-20,1988.

GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M.; BENELLI, G. Chemical composition, toxicity and non-target effects of *Pinus kesiya* essential oil: An eco-friendly and novel larvicide against malaria, dengue and lymphatic filariasis mosquito vectors. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 129, p. 85–90, 2016.

GRIFFIN, WC. Classification of Surface-Active Agents by "HLB". **Journal of The Society of Cosmetic Chemists**, v. 1, p. 311-326, 1949.

GUARDA, C. *et al.* Atividade larvicida de produtos naturais e avaliação da susceptibilidade ao inseticida temefós no controle do *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE). **Interciencia**, v. 41, n. 4, p. 243-247, 2016.

GUEDES, M. M. **Estudo da extração de óleo da polpa de tucumã por CO₂ supercrítico**. 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Pará, Bélem, 2006.

GUNSTONE, F. D. **The Chemistry of Oils and Fats: Sources, Composition, Properties and Uses**. USA: CRC Press, 2004.

HARBACH, R. E. Glossário Anatômico. **Mosquito Taxonomic Inventory**. 2013. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/node/11027>. Acesso em: 17 de fev. 2018.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl ester from lipids. **Londres. Lab. Pract.**, v.22, p. 475-476, 1973.

HENDERSON, A. The genus *Euterpe* in Brazil. In: ***Euterpe edulis Martius – (Palmitreiro) biologia, conservação e manejo***. Editores: Maurício Sedrez dos Reis, Ademir Reis. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2000.

HENDERSON, A.; GALEANO, G. *Euterpe*, *Prestoea*, and *Neonichlsonia* (Palmae). **Flora Neotropica**. The New York Botanical Garden, v. 72, p. 1-89, 1996.

HEUKELBACH, J. *et al.* Zika virus outbreak in Brazil. **J Infect Dev Ctries**, v. 10, p. 116-20. 2016.

HO, T. M. *et al.* Emulsion characterization via microfluidic devices: A review on interfacial tension and stability to coalescence. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 299, p. 102541, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102541>

IONASHIRO, M. G. **Fundamentos da Termogravimetria, Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial**. São Paulo: Giz Editorial, 2004, 98 pg.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, n. 8, p. 603–608, 2000. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00079-X](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00079-X).

JADHAV, R. P. *et al.* A Review on Nanoemulsion. **Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science**, v.10, n. 2, p. 103–108, 2020. <https://doi.org/10.5958/2231-5659.2020.00020.X>.

JAFARI, S. M.; HE, Y.; BHANDARI, B. Nano-emulsion production by sonication and microfluidization—a comparison. **International Journal of Food Properties**, v.9, n.3, p. 475–485, 2006.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P.K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **Biotech**. v.5, n. 2, p. 123-127, 2015. doi: 10.1007/s13205-014-0214-0.

JANG, Y. J. *et al.* Ostwald ripening rate of orange oil emulsions: effects of molecular structure of emulsifiers and their oil composition, **J. Food Sci.** v. 84, p. 440–447, 2019. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14464>.

JORGE, N. **Química e Tecnologia de Óleos Vegetais**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2009.

KABIR, K.E. *et al.* Growth-disrupting, larvicidal and neurobehavioral toxicity effects of seed extract of *Seseli diffusum* against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 90, p. 52-60, 2013.

KALE, S. N.; DEORE, S. L. Emulsion micro emulsion and nano emulsion: A review. **Sys Rev Pharm**, v. 8, n. 1, p. 39–47, 2017.

KARAMI, Z.; KHOSHKAM, M.; HAMIDI, M. Optimization of olive oil-based nanoemulsion preparation for intravenous drug delivery. **Drug research (Stuttgart)**, v.69, n. 5, p. 256-264, 2019.

KAURA, T. *et al.* Utilizing larvicidal and pupicidal efficacy of *Eucalyptus* and neem oil against *Aedes* mosquito: An approach for mosquito control. **Trop Parasitol.** v. 9, n. 1, p.12-17. 2019. doi: 10.4103/tp.TP_35_18. Epub 2019 May 22. PMID: 31161087; PMCID: PMC6542315.

KAWANO, Y. **Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho.** Técnicas de caracterização de polímeros / coordenação Sebastião V. Canevarolo Jr. -- São Paulo : Artliber Editora, 2017.

KIM, H.; PARK, S. S.; LIM, S. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Preparation , characterization and utilization of starch nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, p. 607–620, 2015.

KOBORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Ciência Agrotécnica**, v. 9, n. 5, p. 1008–1014, 2005.

KOMAIKO, J. S.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: a review of available methods. *Comprehens. Rev. Food Sci. Safety*. V. 15, p. 331–352, 2016. doi: 10.1111/1541-4337.12189

KOROLEVA, M.; NAGOVITSINA, T.; YURTOV, E. Nanoemulsions stabilized by non-ionic surfactants: stability and degradation mechanisms. **Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP**. v. 20, n. 15, p. 10369-10377, 2018. doi: 10.1039/c7cp07626f. PMID: 29611566.

KUCHARZ, E. J.; CEBULA-BYRSKA, I. Chikungunya fever. **Eur J Intern Med**, v. 23, n. 4, p. 325-9, 2012. doi:10.1016/j.ejim.2012.01.009.

LANGEVIN, D. Coalescence in foams and emulsions: Similarities and differences. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 44, p. 23-21, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2019.09.001>.

LEITE, G. L. D.; ASSOCIADO, I. I. Entomologia Básica. **Tórax**, v. 17, n. 2, p. 20, 2011.

LIEBERMAN, H.A.; RIEGER, M.M.; BANKER, G.S. **Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems**, v. 1. Mercel Dekker, New York. 1988.

LIMA, A.; BAKKER, J. Espectroscopia no infravermelho próximo para a monitorização da perfusão tecidual. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 23, n. 3, p. 341-351. 2011.

LIMA, C. G. *et al.* Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões O/A contendo óleo de babaçu (*Orbignya oleifera*). **Rev. Bras. Farm**, v. 89, n. 3, p. 239-245, 2008.

LIMA-CAMARA, T. N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Rev Saude Publica**, São Paulo, v. 50, p. 50:36, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1518-8787.2016050006791>.

LOUREIRO CONTENTE, D. M. *et al.* Nanoemulsions of Acai Oil: Physicochemical Characterization for the Topical Delivery of Antifungal Drugs. **Chem. Eng. Technol.**, v. 43, p. 1424-1432, 2020. <https://doi.org/10.1002/ceat.201900627>.

LOZADA, M. I. O. **Sistemas nanoemulsionados à base de óleo de semente de abóbora: Caracterização e estabilidade físicoquímica**. 2020. 216f. Tese (Doutorado em Nutrição Humana). Universidade de Brasília. Programa de Pós-graduação em Nutrição Humana da Faculdade de Ciências da Saúde. Brasília, DF, 2020.

LUNA, J. E. D. *et al.* Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Rev. Saúde Publica**, v. 38, n.6: p. 842:3. 2004.

LUTZ, I. A. **Métodos Físicos-Químicos Para Análise de Alimentos**, 4^a ed., São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

LUZ, T. R.S.A. *et al.* Essential oils and their chemical constituents against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae. **Acta Tropica**, v. 212, p. 105705, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105705>

MADARIAGA, M. *et al.* Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 91-98, 2016.

MALONE, M. H. Pharmacological approaches to natural product, screening and evaluation. In: Wagner H. & Wolf P. (Eds), *Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*, p.23-53, 1977.

MANSUR, H. S. Técnicas de caracterização de Materiais. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**, p. 552, 2007.

MARRELLI, M. T. Controle de vetores utilizando mosquitos geneticamente modificados. **Revista Saúde Pública**, v. 43, n. 5, p. 869-74, 2009.

MARTINEZ, R. M. *et al.* Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Seed Extract Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Lung Carcinoma Cells. **Foods**, v.7, p.1-9, 2018.

MASMOUDI, H. *et al.* The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR . **Int. J. of Pharm.**, n. 289, p. 117-131, 2005.

MASON, P. J.; HADDOW, A. J. An epidemic of virus disease in southern province, tanganyika 73 territory, in 1952-53. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**. v. 51, n. 3, 1957.

MCCLEMENTS, D. J. **Food emulsions: principles, practices, and techniques**. CRC press. 3rd ed. 2016.

MCCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 251,p. 55–79. 2018.

MENEZES NETO, M. A. **Influência da disponibilidade de oxigênio sobre a germinação, crescimento e atividade das enzimas álcool desidrogenase e lactato desidrogenase em açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)**. 1994. 65f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura em Lavras, Lavras, 1994.

MERCÊ, A. L. R. *et al.* Fe (III) - Galactomannan Solid and Aqueous Complexes. Potentiometric, EPR. **Spectroscopy and Thermal**, p. 791–798. 2001.

MEYER, J. M. **Teor e composição de ácidos graxos de óleos de frutos de plameiras nativas**. 2013. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. 2013.

MISHRA, M. **Handbook of encapsulation and controlled realese**. Boca Raton: CRC Press, 2016.

MOHAMADI SAANI, S.; ABDOLALIZADEH, J.; ZEINALI HERIS, S.

Ultrasonic/sonochemical synthesis and evaluation of nanostructured oil in water emulsions for topical delivery of protein drugs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 55, p. 86–95, 1 jul. 2019.

MORAIS, M. *et al.* Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo óleos vegetais. **Anais do 10º salão internacional de ensino, pesquisa e extensão - SIEPE** Universidade Federal do Pampa ú Santana do Livramento. 2018.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise térmica de materiais**. São Paulo: Artliber, 2009.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

NASCIMENTO, R. F. *et al.* **Cromatografia gasosa: aspectos teóricos**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2018. ISBN: 978-85-7485-326-0

NAZARZADEH, E.; ANTHONYPILLAI, T.; SAJJADI, S. On the growth mechanisms of nanoemulsions. **J Colloid Interface Sci.** v. 1, n. 397, p. 154-62. 2013. doi: 10.1016/j.jcis.2012.12.018.

NOGUEIRA, O. L. *et al.* **A cultura do açaí**. Embrapa CPATU. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995.

NOGUEIRA, O. L. **Regeneração, manejo e exploração de açaizais nativos de várzea do estuário amazônico**. 1997. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Pará, Belém, 1997.

OECD - Organisation For Economic Cooperation and Development. **Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423**. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development; 2001.

OKADA, Y. *et al.* A study on fatty acids in seeds of *Euterpe oleracea* Mart seeds. **Journal of Oleo Science**, v. 60, n. 9, 463–467, 2011. doi: <https://doi.org/10.5650/jos.60.463>

OKUMU, F. O.; KNOLS, B. G.; FILLINGER, U. Larvicidal effects of a neem (*Azadirachta indica*) oil formulation on the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Malaria Journal**, v. 6, n. 1, p. 63, 2007.

OLIVEIRA, A. C. **Nanoemulsões carregadas com óleos essenciais de *Piper alatipetiolatum* e *Piper purusum* (Piperaceae): eficientes biodefensivos no controle dos vetores da dengue e da malária.** 2020. 142 f. Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2020.

OLIVEIRA, A. E. M. F. M. *et al.* Development of a Larvicidal Nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel Oil. **PLOS ONE**, v.11, n.1, p. e0145835, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0145835

OLIVEIRA, A. G. *et al.* Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, A.C. **Nanoemulsões carregadas com óleos essenciais de *Piper alatipetiolatum* e *Piper purusum* (Piperaceae) como bioinseticidas no controle dos vetores da dengue e malária.** 2020. 141f. Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2020.

OLIVEIRA, G. P. *et al.* Atividade larvica do extrato etanólico da raiz de *Croton linearifolius* sobre *Aedes aegypti*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 442–448, 2014.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Quim. Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

OLIVEIRA, M. S. P. *et al.* **Variação fenotípica em acessos de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) para caracteres relacionados à produção dos frutos.** Belém: Embrapa-CPATU, 1998.

OLIVEIRA, S. L.; CARVALHO, D.; CAPURRO, M. L. Mosquito transgênico: do *paper* para a realidade. **Revista da Biologia**, v. 6, p. 38-43, 2011.

ONU - Organização das Nações Unidas. **Objetivos de Desenvolvimento Sustentável.** Disponível em: <https://nacoesunidas.org/pos2015/>. Acesso: 20 de dezembro de 2019.

OSTERA, G. R.; GOSTIN, L. O. Biosafety concerns involving genetically modified mosquitoes to combat malaria and dengue in developing countries. **Revista Jama**, v. 305, n. 9, p. 930-931, 2011.

PÁEZ-HERNÁNDEZ G, MONDRAGÓN-CORTEZ P, ESPINOSA-ANDREWS H. Developing curcumin nanoemulsions by high-intensity methods: impact of ultrasonication and microfluidization parameters. **LWT**, v. 111, p. 291–300, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.012>

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 174–187, 2015.

PENTEADO, J. C. P.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J. C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. **Revista Química Nova**. v.31, n.8, p.2190-2193. 2008.

PEREIRA, J. G. *et al.* Termogravimetria: um novo enfoque para a clássica determinação de cálcio em cascas de ovos. **Química Nova**, v.32, n. 6, p. 1661-1666, 2009.

PEREIRA, R. R. **Obtenção e caracterização de sistemas líquido cristalinos contendo óleo de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.)**. 2015. 103f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Belém, 2015.

PERES, T. B. **Noções básicas de cromatografia**. Biológico, São Paulo, v.64, n.2, p.227-229, 2002.

PERISSINATO, A. G. **Formulações sólidas de lactase: estudos de estabilidade acelerada, liberação e sua quantificação por espectroscopia no infravermelho**. 2016. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Alfenas. Minas Gerais, 2016.

PINTO, B. V. **Estudo do comportamento térmico dos antidepressivos citalopram e escitalopram**. 2017. 48f. Monografia (Química). Instituto de Química. Universidade. Universidade de São Paulo. São Carlos, 2017.

PIORKOWSKI, D. T.; MCCLEMENTS, D. J. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. **Food Hydrocolloids**, v. 42, n. 1, p. 5 - 41, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.009>

PIRES, V. G. A.; MOURA, M. R. Preparação de novos filmes poliméricos contendo nanoemulsões do óleo de melaleuca, copaíba e limão para aplicação como biomaterial **Quim. Nova**, v. 40, n. 1, p. 1-5, 2017.

PRANCE, G. T.; SILVA, M. F. **Árvores de Manaus**. Manaus: CNPq/INPA, p. 312.1975.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Tecnologia Farmacêutica**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995.

QUEIROZ, N. *et al.* Extratos e óleos essenciais como alternativa no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* isolados de soja (*Glycine max* L.). **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 13, ed.2, p. 737-753, 2020.

QUIRINO, M. G. **Uma Proposta De Modelo Conceitual Para a Produção Conceitual Para a Produção Do Açaí No Estado Do Amazonas**. 2016. 249f. Tese (Doutorado em Desing) – Pontifícia Univesidade Católica do Rio de Janeiro - Rio de Janeiro, 2016.

RAHUMAN, A.A., VENKATESAN, P.; GOPALAKRISHNAN, G. Mosquito larvicidal activity of oleic and linoleic acids isolated from *Citrullus colocynthis* (Linn.). Schard. **Parasitology Research**, v. 103, p. 1383-1390, 2008.

RAI, V. K. *et al.* Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **J Control Release**. v. 28,n. 270, p. 203-225, 2018. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.11.049.

REBELLO, T. **Guia de Produtos Cosméticos**. 6a ed. São Paulo: Editora Senac, São Paulo, 2005.

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. Óleos e Gorduras: Aplicações e Implicações. **Revista Analytica**, v. 27, p. 60–67, 2007.

REYMÃO, A. E. N.; SILVA, N. S. L. . Crédito e direito ao desenvolvimento: o Amazônia Florescer e a inclusão financeira dos produtores de açaí. **Direito e Desenvolvimento**, v. 9, n. 1, p. 194–211, 2018. doi: <https://doi.org/10.25246/direitoedesenvolvimento.v9i1.649>

RIBEIRO, L. P. **Bioprospecção de extratos vegetais e sua interação com protetores de grãos no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae)**. 2010. 155f. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

- RIBEIRO, R.C.A. *et al.* Production and characterization of cosmetic nanoemulsions containing *Opuntia ficus-indica* (L.) mill extract as moisturizing agent. **Molecules**, v. 20, p. 2492-2509, 2015. <https://doi.org/10.3390/molecules20022492>
- RODRIGUES, R. B. *et al.* Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (açaí) seeds and identification of their polyphenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54. n. 12, p. 4162–4167, 2006. doi: <https://doi.org/10.1021/jf058169p>
- RUEDA, L. M. Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. **Freshwater Animal Diversity Assessment**. Developments in Hydrobiology, v. 198, p. 477-487. 2008.
- SANTANA, A. C.; CARVALHO, D. F.; MENDES, F. A. T. **Organização e competitividade das empresas de polpas de frutas no Estado do Pará**:1995 a 2004. Belém: FIDESA/UNAMA, 2006.
- SANTOS, J. C. O. *et al.* Thermal stability and kinetic study on thermal decomposition of commercial edible oils by thermogravimetry. **Journal Off Food Science**, v.67, n. 4, p.1393-1398, 2002.
- SANTOS, R. B. **Análise bioética sobre o uso de mosquitos transgênicos no controle da dengue no município de Juazeiro – Bahia**. 2018. 89f. Dissertação (Mestrado em Bioética) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.
- SANTOS, T. P. *et al.* Dengue serotype circulation in natural populations of *Aedes aegypti*. **Acta Trop**, v. 176, p. 140-3, 2017. doi: 10.1016 / j.actatropica.2017.07.014.
- SAUMA, J.; MAIA, C. Caminhos do açaí: Pará produz 95% da produção do Brasil, fruto movimenta US\$ 1,5 bi e São Paulo é o principal destino no país. **G1**, Pará, 15 de março. 2019. Disponível em: <https://g1.globo.com/pa/para/noticia/2019/03/15/caminhos-do-acai-para-produz-95-da-producao-do-brasil-fruto-movimenta-us-15-bi-e-sao-paulo-e-o-principal-destino-no-pais.ghml>. Acesso em: 18 de ago. 2019.
- SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova [online]**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000500017>.

SCHAUSS, A. G. Advances in the study of the health benefits and mechanisms of action of the pulp and seed of the Amazonian palm fruit, *Euterpe oleracea* Mart., known as “Açaí”. **Fruits, Vegetables, and Herbs: Bioactive Foods in Health Promotion**, p. 179–220, 2016.

SCHIRMANN G. S. **Composição em ácidos graxos do açaí (*Euterpe edulis*) de diversas regiões de Santa Catarina**. 2009. 84f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.

SCHULTZ, J. **Compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante de açaís de *Euterpe edulis* Martius e *Euterpe oleracea* Martius submetidos a tratamentos para sua conservação**. 2008. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso (Agronomia) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

SERPA, L. L. N. **Oviposição de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* e *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* em município com transmissão de dengue, Estado de São Paulo, Brasil**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências) - Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2014.

SHAI, Y. ATR-FTIR studies in pore forming and membrane induced fusion peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.4c, p. 1-8. 2010.

SILVA, D. C. **Efeito de *Metarhizium anisopliae* s.l. combinado com extratos hidroalcoólicos de plantas em *Aedes aegypti***. 2017. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia- GO, 2017.

SILVA, E. C.; PAOLA, M. R. V.; MATOS, J. R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, 2007.

SILVA, I. M.; SANTANA, A. C.; REIS, M. S. Análise dos retornos sociais oriundos de adoção tecnológica na cultura de açaí no estado do Pará. **Amazônia: Ci. & Desenv**, v. 2, n. 3, 2006.

SILVA, J. A. P.; TAVARES, F. F. C. Estudo da aplicação de sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) para produção de carvão ativado. **Revista de Ciências da Amazônia**, v. 1, n. 1, p. 55-66, 2013.

SILVA, J. J. M., ROGEZ, H. Avaliação da estabilidade oxidativa do óleo bruto de açaí (*Euterpe oleracea*) na presença de compostos fenólicos puros ou de extratos vegetais amazônicos. **Quim. Nova**, v. 36, n. 3, p. 400-406, 2013.

SILVA, L. C. *et al.* Delineamento de formulações cosméticas com óleo essencial de *Lippia gracilis* Schum (Alecrim-de- Tabuleiro) de origem amazônica. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciencies**, v. 36, 2015.

SILVA, L. U. **Disposição final de resíduos sólidos urbanos e a responsabilidade dos geradores e do poder público**. 2015. Monografia (Especialização em Gestão Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Medianeira, 2015.

SILVA, P. K. L. **Remoção do óleo da água de produção por flotação em coluna utilizando tensoativos de origem vegetal**. 2008. 105f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 460p, 2000.

SKOOG, D. A. *et al.* **Principles of Instrumental Analysis**, 4a ed.,Saunders: New York, 2002.

SMITH, B. **Infrared Spectral Interpretation: A Systematic Approach**. New York: CRC Press. 200p, 1999.

SNEHA, K., KUMAR, A. Nanoemulsions: Techniques for the preparation and the recent advances in their food applications. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.76, p.102914, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102914>.

SOLANS, C. *et al.* Nanoemulsions. **Curr Opin Coll Interface Sci**. v.10,p. 102–110, 2005. doi: 10.1016/j.cocis.2005.06.004.

SOLÉ, I. *et al.* Nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method: Preparation variables and scale up. **Journal of colloid and interface Science**, v. 344, n. 2,p. 417-423, 2010.

SOLÍS-FUENTES, J. A. *et al.* Composition, phase behavior and thermal stability of natural edible fat from rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) seed. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 799-803, 2010.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J.T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: A New Vehicle for Skincare Products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 145-149, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.026>

SOURISSEAU, M. *et al.* Characterization of reemerging chikungunya virus. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 6, p. 0804–0817, 2007.

STORPIRTIS, S. *et al.* **Ciências Farmacêuticas - Biofarmacotécnica**. Estado: Guanabara Koogan, 2011.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Advances in colloid and interface science**, v. 108- 109, p. 227-258, 2004.

TEIXEIRA, L. B. *et al.* **Características químicas de composto orgânico produzido com lixo orgânico, caroço de açaí, capim e serragem**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2004.

TEIXEIRA, M. A. *et al.* Assaí-An energy view on an Amazon residue. **Biomass and Bioenergy**, v. 58, p. 76-86, 2013.

TENG, T. S. *et al.* Host response to Chikungunya virus and perspectives for immune- based therapies. **Future Virology**, v. 6, n. 8, p. 975–984, 2011.

TERRA, M. R. *et al.* *Aedes aegypti* e as Arboviroses Emergentes no Brasil. **Uningá Rev.**, v. 30, n. 3, p. 52-60, 2017.

TOMASSETTI, M.; CAMPANELLA, L.; SAMMARTINI, M. P. TG and NMR Analysis of commercial plant oil seeds. **Thermochim. Acta**, v. 190, p. 131-141, 1991.

TOPAN, J. F. **Emulsões à base de óleo de girassol (*Helianthus annuus* L.) com cristal líquido: avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética**. 2012. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

TRINDADE, P.L. *et al.* Antiadipogenic effects of açai seed extract on high fat diet-fed mice and 3T3- L1 adipocytes: A potential mechanism of action. **Life Sciences**. v.228 p.316–322, 2019.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VECCHIO, S. *et al.* Thermal decomposition study of monovarietal extra virgin olive oil by simultaneous thermogravimetry/differential scanning calorimetry: relation with chemical composition. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n.11, p. 4793-4800. 2009.

VIANA, G. A.; SAMPAIO, C. G.; MARTINS, V. E. P. Produtos naturais de origem vegetal como ferramentas alternativas para o controle larvário de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. **Revista de saúde e ciências biológicas**, v. 6, n. 4, 2018.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**. V. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WALIA, M. *et al.* Fatty acid composition, physicochemical properties, antioxidant and cytotoxic activity of apple seed oil obtained from apple pomace. **Journal SCIENCE Food Agriculture**, v. 94, p. 929-934, 2014.

WALKER, R. M.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. J. Physical and oxidative stability of fish oil nanoemulsions produced by spontaneous emulsification: Effect of surfactant concentration and particle size. **Journal of Food Engineering**, v. 164, p. 10- 20, 2015.

WERMELINGER, E. D.; CARVALHO, R. W. D. Métodos e procedimentos usados no controle do *Aedes aegypti* na bem-sucedida campanha de profilaxia da febre amarela de 1928 e 1929 no Rio de Janeiro. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 837-844, 2016.

WHO - World Health Organization. **World health organization technical reports**. Series, 1970, number 443. Disponível em:
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/40771/1/WHO_TRS_443_\(part1\).pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/40771/1/WHO_TRS_443_(part1).pdf). Acesso em: 19 fev. 2019.

YAMAGUCHI, K. K. L. *et al.* Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137-151, 2015.

YANG, J. *et al.* Optimizing nanoemulsions as fluid flowback additives in enhancing tight gas production. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 121, p. 122-125, 2014.

YUYAMA, L. K. O. *et al.* Caracterização físico-química do suco de açaí de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 4: p.545–552. 2011. doi:10.1590/s0044-5967201100040001

ZANINETTI, R. A. **Caracterização do óleo de frutos de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) para produção de biodiesel**. 2009. 60f. Dissertação (Mestrado em Agranomia) - Universidade Estadual Paulista —Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2009.

ZARA, A. L. S. A. *et al.* Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 391-404, 2016.

ZHANG, B. *et al.* Optimization of extraction technology of poly-mannuronic acid to a green delivery system for the waterinsoluble pesticide, lambda-Cyhalothrin. **International journal of biological macromolecules**, v.153, p.17-25, 2020.

ZHANG, Y.; ZHONG, Q. Physical and antimicrobial properties of neutral nanoemulsions self-assembled from alkaline thyme oil and sodium caseinate mixtures. **International journal of biological macromolecules**, v.148, p. 1046-1052, 2020.

APÊNDICE A – Tabela estatística

Tabela A1. ANOVA do rendimento obtido do óleo da semente de *E. oleracea* por ultrassom dos experimentos 5, 6 e 7.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	0,441689	2	0,220844	0,839358	0,496158	6,944272
Colunas	0,053689	2	0,026844	0,102027	0,905281	6,944272
Erro	1,052444	4	0,263111			
Total	1,547822	8				

APÊNDICE B - Pedido do depósito de patente



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 013253-9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CNPJ/CNPJ: 24134488000108
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa
Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária
Cidade: Recife
Estado: PE
CEP: 50670-901
País: Brasil
Telefone: (81)2126 8959
Fax: (81)2126 8959
E-mail: patentes_dine.propesq@ufpe.br

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 27/06/2020 às 00:53, Petição 870200080215

APÊNDICE C – Resumo BIOFITO



APÊNCIDE D – Artigo publicado



Ciências da Saúde

Scientia Amazonia, v. 10, n.1, CS34-CS50, 2021Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>

ISSN:2238.1910

Arboviroses no Brasil transmitidas por *Aedes aegypti*: dados epidemiológicos e manejo do vetor

Stéfani Ferreira de Oliveira¹, Ilka do Nascimento Gomes Barbosa², Thâmara Carollyne de Luna Rocha³, Larissa Araújo Rolim⁴, Rosali Maria Ferreira da Silva⁵, Keyla Emanuelle Ramos de Holanda⁶, Pedro José Rolim Neto⁷

As arboviroses são doenças virais transmitidas pela saliva contaminada de artrópodes hematófagos durante o repasto sanguíneo. A dengue, o zika vírus e a chicungunya são arboviroses transmitidas pela picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti*. O número alto de casos, óbitos e transmissão vertical da mãe para o feto nos últimos anos no Brasil é preocupante. Com circulação principalmente em grandes centros urbanos, o controle do *A. aegypti* tem constituído um importante desafio, uma vez que as técnicas utilizadas não conseguem a erradicação do mosquito. Os principais métodos de controle do mosquito são o uso de inseticidas químicos e a eliminação ou controle de habitats, uma vez que ainda não foi desenvolvida vacina. O uso indiscriminado de inseticidas químicos fez com que surgissem populações de insetos resistentes, fazendo com que haja uma busca maior para substitutos. As plantas tem se mostrado uma troca alternativa, pois apresentam substâncias bioativas em sua composição, com diversas atividades farmacológicas, servindo para o desenvolvimento de um grande número de produtos naturais de interesse comercial. Os inseticidas vegetais possuem um alto potencial por apresentarem compostos estruturalmente diferentes e complexos, o que pode diminuir ou retardar a chance de resistência. Outras vantagens se dá a fácil degradação de seus constituintes, menor toxicidade ao homem e uma alternativa mais segura para o meio ambiente.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; larvicidas; inseticidas vegetais.

APÊNCIDE E – Artigo submetido

Artigo submetido para a revista Experimental Parasitology.

Título: Emulsion from *Euterpe oleracea* (açai) seed oil: activity and safety study against *Aedes aegypti*

Autores: Stéfani Ferreira de Oliveira 1; Rômulo Carlos Dantas da Cruz 2; Larissa Araújo Rolim 3; Jorge Vinicius Fernandes Lima Cavalcanti 4; Ivone Antônia de Souza 2; Rosali Maria Ferreira da Silva 1; Keyla Emanulle Ramos de Holanda5; Pedro José Rolim Neto1

Abstract: *Euterpe oleracea* is an oilseed found in the Amazon, the oil from this seed is a promising raw material for several industries. Zika, Chikungunya and Dengue, whose vector is *Aedes aegypti*, are public health problems and their main form of control is the use of insecticides. The objective was to obtain and physicochemical characterization of açai seed oil and to evaluate its activity against *Aedes aegypti*. Physicochemical characterization, FTIR, thermal analysis and determination of fatty acids by GC of the oil, larvicidal and pupicidal activity of an emulsion containing *E. oleracea* seed oil were performed. front *Aedes aegypti* and acute toxicity of the emulsion. The physical and chemical parameters are within the expected in the literature. The oil was thermally stable up to 304.48°C, with a melting peak at 25.22°C. The fatty acid profile had an average of 72% unsaturated fatty acids. Infrared spectroscopy showed stretches referring to the general structure of the triglyceride. Larvicidal and pupicidal activity was verified against *Aedes aegypti* and it was not found to be toxic to mammals after the acute toxicity test.

Keywords : açai; insecticide; emulsion; fixed oil.

ANEXO A - Folha aprovação comitê de ética



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Sílvio Dantas, 424
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: 2126 5842
ceua@ufpe.br

Recife, 25 de setembro de 2019

Ofício nº 61/19

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Prof. Ivone Antônia de Souza

Departamento de Antibióticos

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 0069/2019

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização físico-químico, atividade larvicida e toxicidade aguda do óleo de *Euterpe oleracea* mart". registrado com o nº 0069/2019 sob a responsabilidade de Prof. Ivone Antônia de Souza o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exeto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 24/09/2019

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Setembro/ 2019 a outubro/ 2019
Espécie/inhagemiraga	Camundongo heterogenico
Nº de animais	12
Peso/idade	35-45g/ 60 dias
Sexo	Fêmea (12)
Origem: Biotério de Criação	Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental Departamento de Antibióticos – UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Antibióticos – UFPE

Atenciosamente,


Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2245891

ANEXO B – Cadastro no SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A3DC8A5

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: A3DC8A5
Usuário: Universidade Federal de Pernambuco
CPF/CNPJ: 24.134.488/0001-08
Objeto do Acesso: Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso: Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Euterpe oleracea

Título da Atividade: Obtenção e estudo de pré-formulação do óleo da semente do açaí (Euterpe oleracea Mart)

Equipe

Rocall Maria Ferreira da Silva	Universidade Federal de Pernambuco
Stefani Ferreira de Oliveira	Universidade Federal do Amazonas
KEYLA EMANUELLE RAMOS DA SILVA	Universidade Federal do Amazonas
Pedro José Rollim Neto	Universidade Federal de Pernambuco
Ivone Antônia de Souza	Universidade Federal de Pernambuco

Data do Cadastro: 12/07/2019 14:08:28
Situação do Cadastro: Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 14:08 de 12/07/2019.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - SISGEN