

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

LUANA DENARDI DE GASPARI

A importância de formulações no desenvolvimento de novos inseticidas botânicos

Ribeirão Preto

2022

LUANA DENARDI DE GASPARI

A importância de formulações no desenvolvimento de novos inseticidas botânicos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

Ribeirão Preto

2022

DE GASPARI, L. D. **A importância de formulações no desenvolvimento de novos inseticidas botânicos.** 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia-Bioquímica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Trabalho aprovado pela Comissão de Graduação da FCFRP/USP em: 07/10/2022.

Banca Examinadora

Prof. Dr.	Zeki Naal
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Prof. Dr.	Paulo Cezar Vieira
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Prof. Dr.	Giuliano Cesar Clososki
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Autorizo a disponibilização e a reprodução total e parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus, pela dádiva da vida e por me conceder saúde, sabedoria e discernimento na minha trajetória.

Agradeço à minha família, minha base, por todo incentivo, suporte, apoio e compressão no decorrer da minha graduação.

Agradeço, especialmente, ao meu avô, Geraldo Denardi (*in memoriam*), por cuidar de mim como um pai e por sempre acreditar e incentivar os meus sonhos. A dor é passageira, mas a saudade é eterna, estará sempre presente em minhas mais doces lembranças, um exemplo de bondade, humildade e dignidade.

Agradeço à minha amiga, Maíra R. S. Silvério, pelos conhecimentos compartilhados, pelos momentos vividos, pela ajuda, paciência e carinho.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, por me proporcionar a oportunidade de ingressar na pesquisa, pelos ensinamentos e por atuar com excelência como professor e orientador.

Agradeço à Universidade, a todo corpo docente e demais funcionários, pela estrutura, aprendizados proporcionados e, especialmente, pela contribuição no meu crescimento profissional e pessoal.

RESUMO

DE GASPARI, L. D. **A importância de formulações no desenvolvimento de novos inseticidas botânicos.** 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia-Bioquímica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor, no Brasil, dos arbovírus causadores da dengue, zika e chikungunya. Mediante as recorrentes epidemias nacionais das arboviroses, faz-se necessário a busca do combate efetivo contra o vetor, visto ser essa a principal forma de controle das doenças. O uso de inseticidas alternativos parece ser a tendência atual, tanto pelos esforços em utilização de produtos com degradação natural, com baixo impacto no meio ambiente e em organismos não-alvo, como pela necessidade devido a resistência do mosquito a inseticidas químicos sintéticos. Nesse contexto, os óleos essenciais com ação inseticida emergem como matérias-primas atrativas ao controle do vetor, pois além das propriedades e aplicações a que podem estar associados (como repelentes, inseticidas e, especialmente, como potencial larvicidas), são biodegradados a produtos pouco ou não-tóxicos e induzem lento desenvolvimento de resistência das cepas dado seus mecanismos de ações diversos. Entretanto, considerando os desafios associados ao emprego de óleos essenciais como ativos inseticidas – com destaque para a baixa persistência desses compostos no meio ambiente –, o estudo de formulações capazes de incorporar tais substâncias é essencial para superar estas limitações, possibilitando a obtenção de novos inseticidas botânicos eficazes, seguros e estáveis.

Tendo em vista o amplo emprego popular do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) com finalidade repelente, foram desenvolvidas formulações sólidas (comprimidos), contendo esse óleo e seu constituinte químico majoritário (citronelal) como ativos, com a estratégia farmacotécnica de liberação prolongada – visando prolongar a ação dos ativos no ambiente e, conseqüentemente, sobre o alvo –, para avaliação das ações tóxicas em mosquito *A. aegypti*, com ênfase na fase larval. Além disso, procedeu-se também, com auxílio da técnica de Cromatografia gasosa com detecção por Espectrometria de massas (CG-EM), a identificação química do óleo essencial de citronela e a dosagem do ativo citronelal nas formulações desenvolvidas.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, óleos essenciais, formulações, óleo essencial de citronela, citronelal, CG-EM.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
1.1	ARBOVIROSES EMERGENTES NO BRASIL.....	7
1.1.1	Arbovírus.....	9
1.1.2	O vetor <i>Aedes aegypti</i>.....	9
1.1.3	Medidas de controle das arboviroses no Brasil.....	11
1.2	INOVAÇÃO NO CONTROLE VETORIAL – PRODUTOS NATURAIS.....	12
1.2.1	Histórico do emprego de plantas e derivados com finalidade inseticida.....	12
1.2.2	Inseticidas botânicos.....	13
1.2.3	Óleos essenciais com potencial larvicida.....	15
1.2.4	A importância do estudo de formulações na obtenção de novos inseticidas botânicos.....	16
1.3	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	17
1.3.1	Cromatografia em fase gasosa com detecção por Espectrometria de massas.....	18
1.4	DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO.....	18
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE CITRONELA (<i>Cymbopogon nardus</i>).....	21
3.1.1	Preparo das amostras e método analítico.....	21
3.2	PREPARO DAS FORMULAÇÕES.....	22
3.3	ENSAIO LARVICIDA DAS FORMULAÇÕES.....	24
3.4	DOSAGEM DO ATIVO NAS FORMULAÇÕES.....	24
3.4.1	Curva analítica do padrão de citronelal.....	24
3.4.2	Preparo das amostras da formulação e método analítico.....	25

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE CITRONELA (<i>Cymbopogon nardus</i>).....	26
4.2	PREPARO DAS FORMULAÇÕES.....	28
4.3	ENSAIO LARVICIDA DAS FORMULAÇÕES.....	28
4.4	DOSAGEM DO ATIVO NAS FORMULAÇÕES.....	29
5	CONCLUSÃO.....	33
	REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

As arboviroses, causadas pelos chamados arbovírus, constituem um grupo de doenças virais transmitidas por vetores artrópodes. Os arbovírus, em sua maioria, circulam na natureza entre os animais silvestres, com alguma especificidade por determinados hospedeiros e mantendo-se em ciclos enzoóticos em poucas espécies de organismos vertebrados e invertebrados. O homem ou animais domésticos, quando afetados, tornam-se hospedeiros acidentais¹. Entretanto, alguns vírus, como é o caso dos arbovírus da dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) e zika (ZIKV), suplantaram a necessidade de amplificação enzoótica para manutenção da transmissão e tornaram-se responsáveis por produzirem epidemias urbanas tendo exclusivamente o ser humano como amplificador vertebrado².

As infecções por arbovírus têm sido reconhecidas como um crescente problema de saúde pública global principalmente pelo potencial de dispersão, pela capacidade de mutação e adaptação a novos ambientes e hospedeiros (vertebrados e invertebrados), pela susceptibilidade coletiva, pela possibilidade de desencadear epidemias extensas, pela ocorrência de casos graves (acometimento neurológico, articular e hemorrágico) e ainda, pela demanda por estratégias de manejo cada vez mais complexas^{1,3}.

1.1 ARBOVIROSES EMERGENTES NO BRASIL

No atual contexto epidemiológico brasileiro, dentre as arboviroses mais incidentes, destacam-se a dengue (DEN), chikungunya (CHIK) e zika (ZIKA), as quais apresentam como fator comum o vetor de transmissão, o mosquito *Aedes aegypti*⁴.

Nas Américas, o estabelecimento definitivo do gênero *Aedes* tem sido observado como resultado das modificações ambientais por ações antrópicas, desordem do crescimento urbano, deslocamentos populacionais, mudanças climáticas, ausência de água tratada e saneamento básico. Esses fatores favorecem a disseminação dos arbovírus no continente, pois garantem condições que pressionam não só a mutação e adequação viral (ao vetor, hospedeiro e ambiente), como também a adaptação do vetor¹. No Brasil, além dos aspectos citados, o clima tropical associado constitui outro facilitador relevante à emergência de tais arboviroses no país, uma vez que, dispõe das condições climáticas favoráveis à permanência e proliferação do vetor⁵.

A dengue (DEN), ocasionada pelo arbovírus DENV, constitui uma doença infecciosa febril aguda, transmitida pelo mosquito *A. aegypti*, que pode se manifestar de forma benigna

(clássica) ou grave (hemorrágica) a depender de alguns fatores, tais como: o vírus envolvido (pode ser de quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), infecção anterior por determinado sorotipo viral e aspectos individuais (como comorbidades, por exemplo). Sabe-se que a segunda infecção por qualquer sorotipo do arbovírus DENV é consideravelmente mais grave que a primeira, independentemente dos sorotipos e de sua sequência⁶. Segundo o Ministério da Saúde, a imunidade ao arbovírus DENV é permanente para o mesmo sorotipo ao qual foi previamente infectado (homóloga), entretanto, a imunidade cruzada (heteróloga) existe temporariamente⁷.

A chikungunya (CHIK), ocasionada pelo arbovírus CHIKV, é uma doença infecciosa febril que pode ser transmitida pelo *A. aegypti* (meio urbano) e pelo *A. albopictus* (principalmente, áreas rurais). O nome “chikungunya”, que significa “aqueles que se dobram” em swahili (idioma da Tanzânia), foi assim atribuído em função da aparência curvada apresentada pelos pacientes que foram atendidos na primeira epidemia documentada na Tanzânia, entre 1952 e 1953. Sabe-se que, uma vez infectado pelo CHIKV, a imunidade permanente é adquirida⁸.

A zika (ZIK), ocasionada pelo arbovírus ZIKV, também compreende uma doença infecciosa febril, assim como DEN e CHIK, transmitida pelo *A. aegypti*. No ano de 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) decretou a infecção por ZIKV como emergência em saúde pública de preocupação mundial após o cluster de casos, reportados no Brasil em 2015, de alterações neurológicas (síndrome de Guillain-Barré) e microcefalia associados, ocorridos após situação semelhante na Polinésia Francesa em 2014 (WHO, 2016).

A circulação conjunta dos arbovírus DENV, CHIKV e ZIKV no território brasileiro implica em diversos desafios clínicos e econômicos. No que diz respeito à saúde, a ausência de vacinas como método profilático e de antivirais efetivos, a dificuldade no diagnóstico em função da similaridade de sintomas entre tais infecções, bem como a probabilidade de coinfeção, são aspectos que dificultam o manejo clínico e, conseqüentemente, impactam na explosão de novos casos no país. Já do ponto de vista da economia, as arboviroses não só refletem em custos para combate ao vetor e despesas médicas diretas, como também em custos indiretos, que é o caso da perda de produtividade econômica em situações de afastamento do trabalho^{1,9}.

1.1.1 Arbovírus

Os arbovírus (*Arthropod-borne virus*), responsáveis pelas arboviroses, descrevem um grupo de vírus transmitidos a um hospedeiro suscetível – ser humano e/ou outros vertebrados – pela picada de artrópodes hematófagos. A transmissão do arbovírus ao hospedeiro vertebrado suscetível se dá através da picada por um artrópode infectado, sendo que, a infecção atinge tal vetor mediante repasto sanguíneo durante a fase de viremia de um hospedeiro vertebrado infectado¹⁰.

Esse grupo viral – arbovírus – é assim designado não apenas em alusão a sua veiculação através de artrópodes (vetores), mas principalmente em razão de parte do seu ciclo de replicação ocorrer em membros desse filo⁵.

No que diz respeito à saúde humana, os arbovírus considerados de maior relevância são aqueles transmitidos por culicídeos, principalmente dos gêneros *Culex* e *Aedes*, entretanto há de se considerar também aqueles veiculados por outros artrópodes, como flebotomíneos (subfamília da classe Insecta) e carrapatos (classe Arachnida – ordem Acarina)¹.

Os arbovírus causadores de doenças em humanos e outros vertebrados de sangue quente são membros de cinco famílias virais: *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*, sendo que, a maior parte dos arbovírus compreende os gêneros *Flavivirus* (família *Flaviviridae*) e *Alphavirus* (família *Togaviridae*). Estima-se que existam mais 545 espécies de arbovírus, das quais mais de 150 são responsáveis por causar doenças em seres humanos⁵.

Os vírus da dengue (DENV) e zika (ZIKV) são pertencentes à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, enquanto o vírus da chikungunya (CHIKV) compreende um representante da família *Togaviridae* e do gênero *Alphavirus*. Embora pertencentes a linhagens distintas, DENV, ZIKV e CHIKV compartilham de algumas características estruturais – genoma constituído de RNA fita simples de polaridade positiva, capsídeo icosaédrico e envelope viral –, bem como da capacidade de se adaptar a hospedeiros vertebrados e invertebrados, dada a grande plasticidade genética e alta frequência de mutações associadas a esses vírus de RNA¹.

1.1.2 O vetor *Aedes aegypti*

O *A. aegypti* – vetor comum das arboviroses dengue, chikungunya e zika, além da febre amarela e outros – é um mosquito (Família *Culicidae*) proveniente da África, mais especificamente do Egito (o que explica a escolha do epíteto “*aegypti*” para designar a espécie),

o qual foi introduzido no continente Sul-Americano a partir do século XVI, durante a colonização europeia, através de embarcações que traficavam escravos^{11,12}.

No Brasil, os primeiros casos de dengue relatados datam do final do século XIX, em Curitiba (PR), e do início do século XX, em Niterói (RJ). No início do século XX, o mosquito *A. aegypti* passou a ser visto como uma preocupação do ponto de vista da saúde pública em função do surto de febre amarela. Em 1955, medidas de controle à febre amarela garantiram a erradicação do *A. aegypti* no território brasileiro, entretanto, no final da década de 1960, o relaxamento com as ações anteriormente adotadas impactou na reintrodução do vetor no país¹¹. Os primeiros casos de chikungunya e zika no Brasil são considerados recentes e próximos, sendo relatados em 2014 e 2015, respectivamente¹.

Admite-se que a disseminação global do *A. aegypti* aconteceu de forma passiva, mediante deslocamentos populacionais, o que possibilitou ao mosquito estabelecer-se em locais que ofereciam condições favoráveis à sua permanência e desenvolvimento, como em regiões tropicais – a exemplo do Brasil – e subtropicais¹³.

O mosquito *A. aegypti* possui ciclo de vida dividido em quatro etapas: ovo, larva, pupa e adulto. Alguns dias após transformar-se em adulto, o mosquito encontra-se apto para o acasalamento, dessa forma, após a cópula, a fêmea sai à procura de sangue humano para garantir o desenvolvimento e maturação dos ovos no ovário. Cerca de três dias após a ingestão do sangue, a fêmea procura lugares favoráveis para deposição dos ovos – normalmente, locais úmidos e, de preferência, acima da linha d'água ou na superfície. Em condições ambientais ideais, o desenvolvimento do embrião se completa em cerca de dois ou três dias, no entanto, vale ressaltar que ovos são estruturas capazes de resistir por mais de um ano longe de água, eclodindo a qualquer momento quando submetidos à umidade¹⁴.

Após a eclosão do ovo, surge a larva, uma fase aquática do ciclo de vida do mosquito que se alimenta, principalmente, da matéria orgânica presente no criadouro. Essa etapa, que dura cerca de cinco dias (até ser convertido em pupa), é considerada a mais indicada para se combater o mosquito *A. aegypti*, pois além dos criadouros serem mais localizados, a fase a seguir, quando a larva se transforma em pupa, raramente sofre efeito de larvicidas e outros produtos, uma vez que, a pupa não se alimenta. A etapa de pupa, em condições favoráveis, dura de 2 a 3 dias, permanecendo na superfície da água para facilitar o voo do adulto quando completa a metamorfose¹⁴.

A fase adulta do *A. aegypti* é a mais conhecida pelo ser humano, uma vez que é a fase em que o mosquito, quando a fêmea é previamente infectada, torna-se capaz de transmitir as arboviroses no momento da hematofagia¹⁴. O *A. aegypti* é um mosquito essencialmente urbano

(cosmopolita), de hábito diurno e que, quando infectado, representa não apenas o vetor como também o reservatório do arbovírus, uma vez que, permanece infectado durante a sua vida^{10,14}.

1.1.3 Medidas de controle das arboviroses no Brasil

Para evitar ou reduzir a transmissão das arboviroses DEN, CHIK e ZIK enquanto não há vacinas ou tratamentos específicos disponíveis, a estratégia mais efetiva, do ponto de vista da saúde pública do Brasil, baseia-se no controle do fator comum de transmissão, o mosquito *A. aegypti*⁴.

O controle do vetor *A. aegypti* é realizado de três formas principais: mecânica, química e biológica. O controle mecânico compreende a adoção de práticas capazes de eliminar o vetor e criadouros ou reduzir o contato mosquito-homem, um exemplo é a instalação de telas em portas e janelas. O controle químico, considerado o mais usual, consiste no uso de produtos químicos (ex. fumacê de malathion), sendo recomendado apenas se respeitado o uso racional e a segurança ao meio ambiente e à população. O controle biológico, por sua vez, baseia-se no emprego de predadores ou patógenos com potencial para diminuir a população vetorial¹⁵.

Os Agentes Comunitários de Saúde (ACS) e Agentes de Combate a Endemias (ACE), em parceria com a sociedade, são responsáveis por implementar e promover o controle mecânico e, especialmente, o controle químico do *A. aegypti* no território brasileiro, bem como ações educativas que garantam a sustentabilidade da eliminação do vetor e criadouros¹⁵.

De acordo com os dados divulgados pelo Ministério da Saúde no boletim epidemiológico referente às semanas 1 a 17 de 2022 (02/01/2022 a 30/04/2022) no Brasil, houve aumento dos casos de dengue (em 135,1%), chikungunya (em 56,6%) e zika (em 53,9%) em relação ao mesmo período no ano anterior (2021)¹⁶. Desta maneira, é possível verificar que os programas de prevenção e controle de arboviroses em vigor têm se mostrado insuficientes para conter a incidência de tais doenças infecciosas, isto porque além dos facilitadores associados ao território brasileiro (clima, saneamento e desordem na ocupação urbana), o uso indiscriminado de produtos químicos (inseticidas e repelentes), principal forma de controle disseminada no país, impacta no desenvolvimento de resistência por parte dos agentes etiológicos e do vetor, além de contaminação do meio ambiente. Desta forma, faz-se necessário buscar por estratégias de intervenção alternativas para prevenção e controle destas arboviroses no Brasil⁴.

1.2 INOVAÇÃO NO CONTROLE VETORIAL – PRODUTOS NATURAIS

Atualmente, diversas abordagens têm sido desenvolvidas como alternativas no controle do *A. aegypti*, tais como medidas sociais de vigilância (abordagem eco-bio-social e mapeamento de risco das regiões), emprego de recursos naturais e biológicos, dispositivos inseticidas e modificações vetoriais (mosquitos transgênicos e esterilizados por irradiação), inclusive considerando-se a combinação entre tais estratégias¹⁵.

Tendo em vista as desvantagens associadas ao controle químico através de compostos sintéticos, principal estratégia de controle do vetor no cenário atual no Brasil, este trabalho aborda o emprego de compostos naturais como alternativa, pois apresentam-se como uma ferramenta relevante não só pela simplicidade em relação às demais abordagens, como também por agregar sustentabilidade e maior segurança ao meio ambiente e a organismos não-alvos.

1.2.1 Histórico do emprego de plantas e derivados com finalidade inseticida

O emprego de plantas e substâncias derivadas como pesticidas botânicos datam desde a antiguidade¹⁷. Sabe-se que na Índia, por volta de 2.000 a.C., era comum o uso de compostos com ação inseticida (provenientes de diversos órgãos das plantas) no controle de pragas. Em países como o Egito, durante o período faraônico, e na China, cerca de 1.200 a.C., substâncias inseticidas derivadas de plantas já eram direcionadas, por meio de aplicação direta ou fumigação, para o controle de pragas que acometiam grãos armazenados. Ainda, no século XVI, europeus também demonstraram domínio botânico ao promoverem o manejo de pragas com o auxílio de plantas¹⁸.

Na primeira metade do século XX, os chamados “inseticidas botânicos” também tiveram grande popularidade e importância no Brasil, que, na época, foi responsável por grande parte da produção e exportação desses produtos, substâncias como rotenona, piretro e nicotina, eram direcionadas à agricultura em função da maior segurança e menor impacto ambiental associados¹⁹. Os compostos orgânicos botânicos, assim como os poucos inorgânicos que eram utilizados (arsenicais, fluorados e outros) marcaram, o que é chamada por alguns estudiosos, de a Primeira Geração de Inseticidas¹⁹.

Na década de 1930 foi sintetizado, pela primeira vez, um inseticida orgânico. A descoberta e síntese de moléculas com ação inseticida, somadas aos problemas associados aos inseticidas botânicos – especialmente, eficiência variável e baixa residualidade – fizeram com que os produtos naturais, até então amplamente empregados, perdessem seu espaço sendo

rapidamente substituídos por produtos químicos sintéticos, dada a maior eficiência e ação associada ao novo método¹⁹. A produção dos inseticidas “organo-sintéticos” (organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides), assim chamados, marcou o início da Segunda Geração de Inseticidas¹⁹.

Tendo em vista os impactos causados à fauna e à flora, bem como à saúde humana, a Terceira Geração de Inseticidas foi marcada pela proibição dos organoclorados (sobretudo, do DDT) e pelo investimento na descoberta de moléculas mais específicas e menos agressivas ao meio ambiente¹⁹.

Nas últimas décadas, a ressurgência global de algumas doenças relacionadas a insetos – em especial, a arbovirose dengue –, os efeitos negativos associados ao uso de inseticidas sintéticos – dentre eles residualidade ambiental, toxicidade a organismos não-alvo e resistência adquirida pelo vetor –, os custos e dificuldades envolvidos na descoberta de novos compostos com ação inseticida, bem como a crescente conscientização ambiental, fizeram emergir novamente o interesse de se buscar na biodiversidade por alternativas sustentáveis capazes de combater vetores, que podem afetar tanto a saúde humana quanto o meio ambiente, de forma eficaz e segura¹⁸.

A Quarta Geração de Inseticidas, vivenciada atualmente, vem abrindo espaço para novas possibilidades no combate de insetos, como o retorno do emprego de produtos naturais (metabólitos de origem vegetal ou animal) e a produção de proteínas e peptídeos inseticidas em vetores de expressão¹⁹.

1.2.2 Inseticidas botânicos

As substâncias com atividade inseticida, produzidas e extraídas de determinadas espécies de plantas, são denominadas “inseticidas botânicos” ou “inseticidas vegetais” e consistem em produtos gerados a partir do metabolismo secundário vegetal¹⁷.

O metabolismo primário vegetal compreende o conjunto de processos metabólicos considerados essenciais ao funcionamento e manutenção das células vegetais, dessa forma, os compostos envolvidos em tal metabolismo apresentam distribuição universal nas plantas. É o caso dos carboidratos, lipídios, nucleotídeos, aminoácidos e da clorofila. Diferentemente do metabolismo primário, o metabolismo secundário origina compostos que não dispõem de distribuição universal entre os tecidos vegetais, uma vez que, não são considerados necessários para todas as plantas²⁰. Esse é o caso das substâncias inseticidas, cuja produção é restrita a

algumas espécies vegetais e, provavelmente, esteja relacionada com mecanismos de defesa química frente a predadores naturais¹⁸.

Os constituintes com atuação inseticida podem ser provenientes de toda a planta ou de partes dela, podem ser o próprio material vegetal, geralmente, pulverizado, ou ainda, produtos derivados obtidos por meio de extração aquosa ou com solventes orgânicos²¹. De qualquer maneira, tais produtos do metabolismo secundário variam não só em relação à localização de biossíntese e de alocação entre as espécies, como também na concentração em função do estágio de desenvolvimento, época do ano, sazonalidade, ritmo circadiano, tratamentos culturais, dentre outros fatores¹⁹.

As características de baixa toxicidade e persistência relacionadas aos produtos naturais fazem com que eles sejam associados a um baixo impacto ambiental, isto é, sem efeitos indesejáveis frente às plantas e demais organismos benéficos²². Entretanto, embora associados a tais atributos, a concepção de que os inseticidas de origem vegetal são sempre seguros é equivocada, uma vez que, ainda que sua menor persistência no meio descreva risco reduzido comparado às substâncias sintéticas, há registros de inseticidas botânicos que são tóxicos à fauna marinha, insetos benéficos e mamíferos^{18,22}.

Os efeitos desencadeados por uma substância de origem vegetal sobre os insetos são considerados variáveis, podendo ser tóxicos, repelentes, causar inibição da oviposição e da alimentação, e ainda, alterações hormonais – acarretando em distúrbios no desenvolvimento, deformações, infertilidade e mortalidade no decorrer das fases da vida²². Para evitar então potenciais efeitos tóxicos ao ambiente e aos seres vivos, Brunherotto (2000) considera que induzir a mortalidade dos vetores através dos inseticidas botânicos não deve ser o principal objetivo, já que, para alcançar tal efeito, normalmente são necessárias concentrações elevadas do produto, o que inviabiliza a técnica do ponto de vista da segurança à saúde e ao meio ambiente^{22,23}. Dessa forma, considera-se que o ideal é minimizar, ou se possível, impedir, a oviposição e a alimentação da praga e, conseqüentemente, a expansão populacional de sua espécie²².

Apesar da variabilidade na composição e toxicidade que podem estar associadas aos inseticidas botânicos (nicotina e rotenona, por exemplo, são tóxicas a mamíferos e peixes, respectivamente) – porém, vale ressaltar que, muitas vezes, tal toxicidade é controlável e inferior àquela dos compostos químicos sintéticos –, a simplicidade de manejo, a disponibilidade e baixo custo (a depender do produto natural), o efeito residual não prolongado (degradação natural) e mecanismo de ação diverso (reflete em menor probabilidade de resistência por predadores naturais), são algumas das vantagens que suplantam as desvantagens,

tornando os produtos naturais uma estratégia promissora frente às atuais medidas de controle químico^{18,21}.

Algumas das substâncias de origem vegetal com atividade inseticida conhecida são: piretrinas I e II, rotenona, nicotina, cevadina, veratridina, rianodina, quassinoides e azadiractina; há também alguns biopesticidas voláteis, que compreendem, normalmente, óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas²¹.

1.2.3 Óleos essenciais com potencial larvicida

Como uma alternativa aos compostos químicos sintéticos atualmente empregados no controle de vetores sinantrópicos (vivem em meio urbano), alguns compostos naturais, como os óleos essenciais com aplicação inseticida, vêm sendo investigados quanto ao potencial larvicida – uma vez que, a fase larval é considerada a mais estratégica para controle de vetores – frente a determinados artrópodes, como o mosquito *A. aegypti*, para serem direcionados ao desenvolvimento de novos produtos inseticidas¹⁵.

Esses compostos, normalmente encontrados nas espécies vegetais popularmente utilizadas com finalidade repelente, emergem como matérias-primas atrativas ao controle do vetor, uma vez que, segundo a Agência Reguladora de Alimentos e Drogas nos Estados Unidos – FDA (Food and Drug Administration) e a Organização Mundial da Saúde – OMS, os óleos essenciais são biodegradados a produtos não-tóxicos, demonstram toxicidade reduzida ou ausente e ainda, induzem lento desenvolvimento de resistência das cepas²⁴.

Os óleos essenciais constituem misturas complexas de substâncias voláteis, lipossolúveis, de baixo peso molecular, normalmente odoríferas e líquidas¹⁹. São extraídos de partes vegetais (raízes, rizomas, flores, folhas, cascas, caules, frutos e outras) através de diferentes métodos, sendo os mais comuns a destilação por arraste a vapor e prensagem a frio²⁵. Os óleos essenciais também apresentam grande afinidade por solventes orgânicos apolares, entretanto, a extração através destes não agrega valor comercial¹⁹.

Diversos fatores impactam na qualidade e na composição química de um óleo essencial, incluindo espécie botânica, partes da planta utilizadas para extração, época de colheita, aspectos relacionados às condições de cultivo (clima, temperatura, umidade e outros), presença de agrotóxicos e outros²⁵.

Além da repelência, considerado o modo de ação mais comum dos óleos essenciais com ação inseticida e seus componentes majoritários, e da atividade inseticida propriamente dita, a

qual pode ser expressa de diversas maneiras, sabe-se que esses compostos podem atuar também em enzimas digestivas e neurológicas, além de interagirem com o tegumento do vetor²⁶.

Dentre as plantas promissoras, as quais sintetizam óleos essenciais com atividade inseticida e que, potencialmente, podem atuar sob a fase larval dos insetos, destacam-se aquelas pertencentes aos gêneros *Cymbopogon* spp., *Ocimum* spp. e *Eucalyptus* spp., sendo que alguns dos constituintes responsáveis pela ação inseticida encontrados nestas misturas de óleos incluem: cânfora-pineno, limoneno, citronelal, citronelol, geraniol e timol²¹.

1.2.4 A importância do estudo de formulações na obtenção de novos inseticidas botânicos

No cenário atual, é conhecido que o uso de produtos químicos sintéticos para controle de vetores descreve diversas preocupações no que tange ao meio ambiente e à saúde de vertebrados não-alvos (seres humanos e animais), além da contradição quanto à eficácia desses, devido ao desenvolvimento de cepas resistentes. Neste sentido, produtos naturais – em especial, os óleos essenciais dadas as propriedades (repelência, inseticida e, especialmente, potencial larvicida) e benefícios ambientais associados – têm sido extensivamente estudados e testados para compor uma ferramenta promissora no manejo de artrópodes, com ênfase nos transmissores de doenças²⁴.

Entretanto, algumas particularidades associadas aos óleos essenciais, como é o caso da volatilidade (alta pressão de vapor), limitam sua aplicação em produtos inseticidas, uma vez que, esta característica, afeta a permanência do composto no ambiente e, conseqüentemente, impacta na sua atuação frente ao alvo artrópode. Sendo assim, o desenvolvimento de formulações capazes de prolongar a duração do efeito do constituinte(s) ativo(s), possibilita o emprego dos óleos essenciais em produtos inseticidas²¹.

O conhecimento acerca da formulação, isto é, o estudo da composição qualitativa e quantitativa de um determinado produto, é essencial para garantia dos pilares de eficácia, qualidade e segurança deste, uma vez que, reflete na padronização e prevenção de possíveis efeitos indesejados²⁷.

Considerando os desafios associados ao emprego de óleos essenciais como ativos inseticidas – dentre os quais, destacam-se baixa persistência no meio ambiente (volatilidade), variabilidade na composição química e potencial toxicidade –, o estudo de formulações capazes de incorporar tais substâncias é não só necessário para suplantar tais dificuldades, possibilitando

a obtenção de produtos eficazes e estáveis, mas principalmente, relevante do ponto de vista da sustentabilidade e segurança ambiental e humana.

Em virtude do amplo emprego popular do óleo essencial proveniente da espécie vegetal *Cymbopogon nardus*, devido à acessibilidade e seu potencial efeito larvicida e de repelência, frente ao mosquito *A. aegypti*²⁶, foram desenvolvidas formulações sólidas (comprimidos) com a estratégia farmacotécnica de liberação prolongada – para superação das limitações associadas ao emprego de tais compostos voláteis como ativos inseticidas – contendo este óleo, bem como seu constituinte majoritário, o monoterpene citronelal, para avaliação das ações tóxicas em mosquito *A. aegypti*, vetor comum das arboviroses emergentes – dengue, chikungunya e zika – no país.

A espécie *Cymbopogon nardus* pertence ao gênero *Cymbopogon* e à família Poaceae, sendo originária da ilha de Java na Indonésia, cultivada em regiões tropicais e subtropicais e popularmente conhecida como “capim-citronela”²⁶. O óleo essencial, normalmente extraído das folhas e colmos, apresenta uma grande concentração de citronelal (majoritário), geraniol e β -citronelol, os quais são considerados os principais responsáveis pelas atividades de repelência e larvicida²⁶. Além disso, o óleo essencial de *Cymbopogon nardus* também apresenta propriedades antibacteriana, antiviral, antifúngica e antioxidante²⁸.

1.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A cromatografia é um método físico-químico de separação fundamentado na migração diferencial dos constituintes de uma mistura em razão de diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária²⁹. Além da separação dos componentes da mistura, quando acoplada a um detector adequado, a cromatografia também pode ser utilizada para identificar, por comparação com padrões previamente existentes, e quantificar, através de cálculos envolvendo dimensões dos sinais obtidos no cromatograma²⁹.

As diferentes formas de cromatografia podem ser classificadas em função de quatro critérios principais: quanto à forma física do sistema cromatográfico (planar ou colunar), quanto à fase móvel empregada (líquido, gás ou fluido supercrítico), quanto à fase estacionária (líquida, sólida ou fase ligada) e quanto ao modo de separação (adsorção, troca iônica, exclusão ou mistura destes mecanismos)²⁹.

1.3.1 Cromatografia em fase gasosa com detecção por Espectrometria de massas

A cromatografia em fase gasosa é um tipo de cromatografia na qual a fase móvel é um gás inerte (H₂, He ou N₂) e a fase estacionária é um adsorvente sólido, denominada cromatografia gás-sólido (GSC), ou ainda, um líquido adsorvido em um suporte inerte, denominada cromatografia gás-líquido (GLC). A cromatografia gasosa é uma das técnicas analíticas mais utilizadas em função do seu poder de resolução e capacidade de detecção de substâncias em escala nano à picogramas. Entretanto, a grande limitação deste método é a necessidade de que a amostra a ser analisada seja volátil ou termicamente estável, ainda que amostras não voláteis ou instáveis possam ser derivadas quimicamente²⁹.

Quando acoplada a um detector, por exemplo, Espectrometria de massas, constitui um método rápido que possibilita a obtenção de informações valiosas sobre a análise de produtos naturais, sendo assim empregada na análise de misturas orgânicas e bioquímicas complexas, pesticidas e compostos orgânicos voláteis e semivoláteis no meio ambiente^{29,30}.

A Cromatografia gasosa com detecção por Espectrometria de massas (CG-EM) representa uma técnica híbrida, uma vez que, cada uma das suas partes é responsável por executar um determinado processo analítico, a Cromatografia a Gás (CG) realiza a separação dos constituintes da amostra a ser analisada, enquanto que a Espectrometria de Massas (EM), por sua vez, fornece informações úteis para a identificação dos constituintes químicos gasosos separados pela CG³⁰.

1.4 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO

Considerando os desafios associados aos ativos envolvidos – reduzida persistência no ambiente e baixa solubilidade em água –, a aplicação voltada para o meio externo aquoso, bem como a intenção de se obter um produto que combine simplicidade e acessibilidade, faz-se necessário o emprego da tecnologia farmacêutica para obtenção de uma formulação com liberação modificada, uma vez que, tais sistemas de liberação são capazes de garantir conveniências – neste caso, estabilidade e liberação controlada do ativo no ambiente – que não são possíveis com sistemas de liberação convencional.

A partir de levantamentos bibliográficos realizados, destacaram-se como estratégias farmacotécnicas, capazes de carrear ativos voláteis e apolares, e ainda, prover estabilidade e aumento da duração de ação: a nanotecnologia, a encapsulação e o uso de matrizes poliméricas hidrofílicas com sistemas de liberação prolongados ou controlados.

Dada a simplicidade associada, e os resultados positivos para veiculação de compostos apolares, o desenvolvimento de uma formulação sólida, como comprimidos, com emprego de uma matriz polimérica hidrofílica como agente de liberação prolongada, emerge como uma alternativa interessante e aplicável à obtenção de produtos contendo óleos essenciais e seus ativos, podendo ser primeiramente testada em relação as demais (mais complexas). Além do que, tal sistema matricial, também agrega maior estabilidade – por ser uma forma farmacêutica sólida – e ainda, é capaz de proporcionar o alcance do objetivo, prolongar a eficácia larvicida do ativo, mediante a incorporação deste em uma matriz polimérica hidrodispersível.

Embora diversos sistemas poliméricos possam ser utilizados como agentes moduladores de liberação, os polímeros hidrodispersíveis, como os éteres da celulose, são possivelmente o grupo mais frequentemente empregado em formulações de liberação modificada³¹. Para este projeto selecionamos o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), um polímero hidrofílico amplamente utilizado em formas farmacêuticas sólidas de liberação modificada em função da sua natureza não-tóxica e não iônica (não apresenta problemas de compatibilidade), capacidade de incorporar elevadas quantidades de substâncias ativas e facilidade de compressão³².

A liberação de ativos a partir do sistema matricial HPMC ocorre, após hidratação do polímero, mediante sua capacidade de intumescer (relaxamento das cadeias poliméricas) e formar uma camada gelatinosa à superfície do comprimido, a qual funciona como barreira à rápida liberação do ativo, controlando tanto a penetração de água, como a velocidade de liberação da substância hidrofóbica para a água³¹.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver formulações simples, naturais e eficazes contendo óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) e seu ativo majoritário, o monoterpeno citronelal, para aplicação inseticida no controle do mosquito *A. aegypti*, em fase larval.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição química do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*), pela técnica de Cromatografia em Fase Gasosa com detecção por Espectrometria de Massas (CG-EM), e comparar com laudo emitido pelo fornecedor (Destilaria Bauru).
- Preparar formulações sólidas de liberação prolongada com matérias-primas comumente utilizadas na indústria farmacêutica, tendo como ativos o óleo essencial de citronela e o monoterpeno citronelal.
- Avaliar a toxicidade contra o mosquito *A. aegypti*, em fase larval (L3 ínstar), das formulações contendo óleo essencial de citronela e citronelal.
- Determinar a concentração do componente majoritário, o monoterpeno citronelal, através da técnica CG-EM, no comprimido contendo óleo essencial de citronela.
- Determinar a concentração de citronelal no comprimido contendo este ativo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE CITRONELA (*Cymbopogon nardus*).

Para a determinação da composição química do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*), foi utilizada a técnica de Cromatografia em Fase Gasosa com detecção por Espectrometria de Massas (CG-EM).

Para confirmar a identidade do componente majoritário, foi injetado no CG-EM, o padrão de citronelal, a qual foi verificada mediante a comparação (padrão e amostra) do tempo de retenção e espectro de massas.

A determinação quantitativa (% Área) das substâncias presentes na amostra de óleo essencial de citronela foi realizada através do software do equipamento, pelo cálculo das áreas cromatográficas dos picos obtidos, representando as quantidades respectivas de cada componente na amostra.

O método analítico e o preparo das amostras estão descritos a seguir.

3.1.1 Preparo das amostras e método analítico

O óleo essencial de citronela foi preparado na concentração de 5 µg/mL e o padrão de citronelal na concentração de 80 µg/mL, ambos utilizando como solvente o acetato de etila grau HPLC.

Para análise das amostras no equipamento, GCMS-QP2010 ULTRA-SHIMADZU, foram empregados os seguintes parâmetros:

- Temperatura do injetor: 220 °C;
- Temperatura da coluna: 100 °C;
- Rampa de aquecimento: 100 a 240 °C, a 1,80 °C/min, com tempo total de 5 minutos;
- Coluna cromatográfica: ZB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) Phenomenex;
- Gás de arraste: Hélio (He);
- Pressão: 288,6 kPa;
- Vazão do gás: 2,50 mL/min;
- Velocidade linear de 41,6 cm/s;
- Volume de injeção: 1 µL, split 1:60;

- Parâmetros do detector de massas: Temperatura do Ion source de 250 °C;
Temperatura da interface de 280 °C;
Corte do solvente em 3,00 min;
Modo Scan
Start|End m/z: 35 a 400 m/z;
Voltagem do detector: 0,90 kV +0,00 kV.

3.2 PREPARO DAS FORMULAÇÕES

As formulações foram preparadas no estado sólido, na forma de comprimido, contendo como ativo o óleo essencial de citronela e citronelal, a matriz polimérica hidrofílica de liberação prolongada HPMC K100, e a lecitina de soja para auxiliar na solubilização do ativo hidrofóbico na matriz hidrofílica. A concentração do óleo essencial de citronela e do citronelal incorporados na formulação seguiram valores referentes a 3 vezes a CL_{50} (concentração letal 50%) definida para cada ativo isoladamente no ensaio larvicida (larvas no estágio L3).

Os comprimidos contendo óleo essencial de citronela (Figura 3) foram preparados para peso final de 300 mg, apresentando, portanto, a seguinte composição quantitativa: 40 μ L (13,3%) de óleo essencial de citronela (princípio ativo), 40 mg (13,3%) de lecitina de soja e HPMC K100 q.s.p. 300 mg (diluente).

Os comprimidos contendo o citronelal foram preparados para peso final de 400 mg, apresentando, portanto, a seguinte composição quantitativa: 40 μ L (10%) de citronelal (princípio ativo), 40 mg (10%) de lecitina de soja e HPMC K100 q.s.p. 400 mg (diluente).

Para o preparo das formulações, dissolveu-se óleo essencial/citronelal em lecitina de soja e, posteriormente, adicionou-se à mistura, pouco a pouco, por cisalhamento, o HPMC K100. A mistura final obtida foi passada em peneira de 0,5 mm para homogeneização do pó. Em seguida, procedeu-se às prensagens dos comprimidos em prensa manual (Figura 2).

Ao final do processo de compactação, os comprimidos foram pesados (Figura 1) para verificar uniformidade de peso.

Figura 1 – Balança analítica empregada na pesagem dos excipientes e comprimidos obtidos



Fonte: Elaboração própria.

Figura 2 – Prensa manual



Fonte: Elaboração própria.

Figura 3 – Comprimidos contendo óleo essencial de citronela



Fonte: Elaboração própria

3.3 ENSAIO LARVICIDA DAS FORMULAÇÕES

O ensaio larvicida foi realizado com base no guia WHO 2005, ensaio em copo utilizando cepa Rockefeller. O volume de água variou entre 100 e 250 mL, de acordo com o tamanho do copo utilizado e a concentração final desejada para cada formulação. Para cada copo, foram utilizadas 25 larvas no estágio L3 e adicionado 1 comprimido. O ensaio foi realizado em 4 replicatas, com controle negativo e positivo, em 3 dias diferentes.

Os copos foram mantidos na temperatura de 25 a 28 °C e, preferencialmente, com períodos expostos à luz (12 horas) e períodos protegidos da luz, no escuro (12 horas) – (12L:12E). Após 24, 48 e 72 horas de exposição a mortalidade das larvas foi anotada. Larvas moribundas foram somadas juntas com as larvas mortas, consideradas, portanto, no cálculo da mortalidade. As larvas mortas são aquelas que não se mexem após serem estimuladas, com uma pinça, no sifão respiratório ou região cervical. Larvas moribundas são aquelas incapazes de chegarem até a superfície e não demonstram reação característica de mergulho quando há perturbação na água.

Antes de colocar as amostras para testes, todas as larvas foram verificadas para comprovarem seus movimentos. Se alguma larva não expressasse movimento, esta era retirada e outra larva da bandeja de criação inserida.

3.4 DOSAGEM DO ATIVO NAS FORMULAÇÕES

O constituinte majoritário do óleo essencial de citronela é o monoterpeno citronelal, portanto, para o doseamento no comprimido contendo o óleo como ativo, pela técnica CG-EM, foi selecionado este componente para quantificação.

3.4.1 Curva analítica do padrão de citronelal

Para o preparo da curva analítica do padrão, pesou-se 10 mg de citronelal em balão volumétrico de 10 mL, cujo volume foi completado com acetato de etila. A solução estoque apresentou concentração de 1 mg/mL. A curva foi obtida utilizando-se 5 pontos distintos de concentração, conforme descrito na Tabela 1 (abaixo).

Os pontos da curva foram injetados no equipamento de CG-EM conforme método analítico descrito no item 3.4.2.

Tabela 1 – Pontos da curva analítica do padrão

Ponto	Volume da solução estoque (μL)	Volume AcOEt (μL)
01 (50%)	50	950
02 (75%)	75	925
03 (100%)	100	900
04 (125%)	125	875
05 (150%)	150	850

Fonte: Elaboração própria.

3.4.2 Preparo das amostras da formulação e método analítico

Para o preparo das amostras da formulação pesou-se cerca de 25 mg do pó do comprimido triturado contendo óleo essencial de citronela e cerca de 100 mg do pó do comprimido triturado contendo citronelal, em respectivos balões volumétricos de 10 mL. Em seguida, adicionou-se acetato de etila até completar o volume dos balões e as misturas foram levadas em ultrassom por 5 minutos para auxiliar na extração do ativo da matriz para o solvente.

Posteriormente, as misturas foram filtradas em filtro PTFE 0,22 μm . A amostra contendo óleo essencial de citronela foi transferida diretamente para vial, enquanto a do citronelal foi diluída (125 μL de amostra e 875 μL de acetato de etila).

Para análise das amostras no equipamento, GCMS-QP2010 ULTRA-SHIMADZU, foram empregados os seguintes parâmetros:

- Temperatura do injetor: 220 °C;
- Temperatura da coluna: 100 °C;
- Rampa de aquecimento: 100 a 170 °C, a 1,80 °C/min, com tempo total de 5 minutos;
- Coluna cromatográfica: ZB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 μm) Phenomenex;
- Gás de arraste: Hélio (He);
- Pressão: 288,5 kPa;
- Vazão do gás: 2,50 mL/min;
- Velocidade linear de 41,6 cm/s;
- Volume de injeção: 1 μL , split 1:60;
- Parâmetros do detector de massas: Temperatura do Ion source de 250 °C;
Temperatura da interface de 280 °C;
Corte do solvente em 3,00 min;
Modo Relative
Start|End m/z: 35 a 400 m/z;
Voltagem do detector: 0,90 kV +0,00 kV.

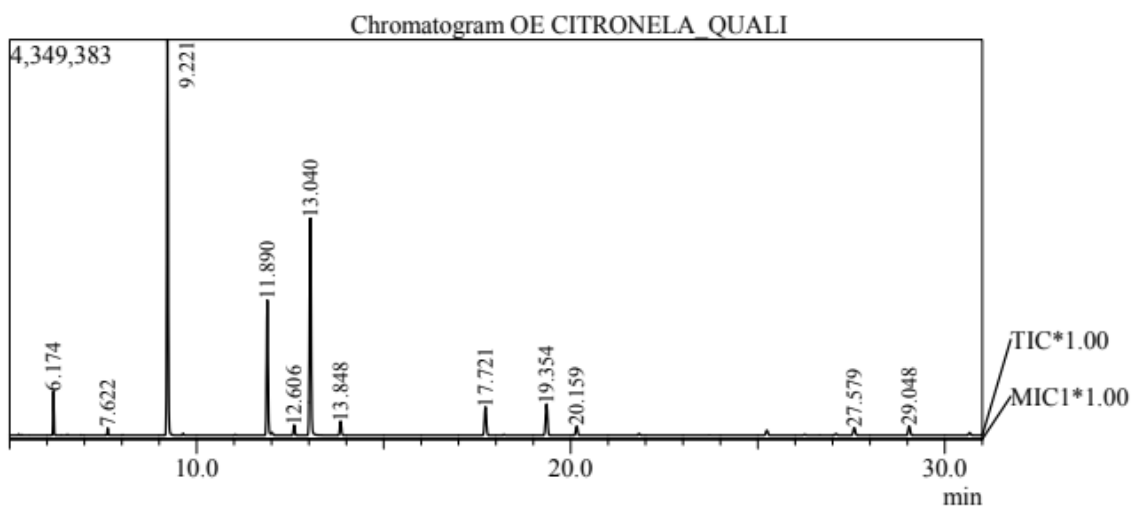
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE CITRONELA (*Cymbopogon nardus*).

Mediante a análise cromatográfica do óleo essencial de citronela (Figura 4) pela técnica de CG-EM, utilizando as informações disponíveis nas bibliotecas do software do equipamento, é possível concluir que o ativo majoritário, isto é, o principal constituinte deste óleo essencial é o monoterpene citronelal, o qual representa 39,82% da amostra. Seguido do citronelal (majoritário), destacam-se dois outros ativos que também estão presentes em proporções representativas nesta amostra, o geraniol e citronelol, os quais correspondem à 26,51% e 15,50%, respectivamente.

As substâncias químicas listadas na Tabela 2 foram identificadas através da comparação com os espectros de massas dos padrões disponíveis nas bibliotecas (NIST11, NIST11s, WILEY7 e FFNSC1.3) do programa do equipamento (GC-MS Analysis), cujos índices de similaridade foram maiores do que 90%.

Figura 4 – Cromatograma ampliado do óleo essencial de citronela fornecido pela Destilaria Bauru.



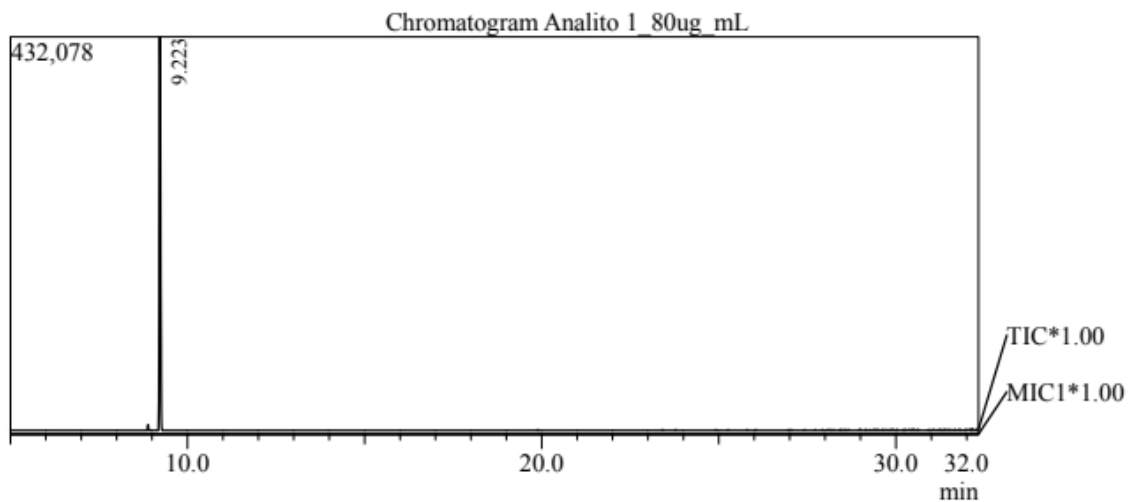
Fonte: Elaboração própria.

Tabela 2 – Identificação e quantificação dos componentes presentes no óleo essencial de citronela fornecido pela Destilaria Bauru.

Pico	Tempo de retenção (RT)	Área	% Área	Nome do constituinte
1	6,174	812244	3,05	Limoneno
2	7,622	148050	0,56	Linalol
3	9,221	10592387	39,82	Citronelal
4	11,890	4122103	15,50	Citronelol
5	12,606	278093	1,05	cis-Citral
6	13,040	7052223	26,51	Geraniol
7	13,848	427674	1,61	<i>trans</i> -Citral
8	17,721	1108563	4,17	Acetato de citronelol
9	19,354	1210204	4,55	Acetato de geraniol
10	20,159	320317	1,20	β -elemeno
11	27,579	182657	0,69	δ -cadineno
12	29,048	347986	1,31	α -elemol
		26602501	100,00	

Fonte: Elaboração própria.

Figura 5 – Cromatograma do padrão citronelal (analito 1)



Fonte: Elaboração própria.

Tabela 3 – Identificação e quantificação de citronelal no padrão

Pico	Tempo de retenção (RT)	Área	% Área	Nome do constituinte
1	9,223	992180	100,00	Citronelal
		992180	100,00	

Fonte: Elaboração própria.

De acordo com o laudo emitido pelo fornecedor, a Destilaria Bauru, o óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) adquirido tem como constituinte majoritário o citronelal, representando 38,36%, seguido de outros ativos, o geraniol e o citronelol, com 37,32% e 18,76%, respectivamente.

Comparando as informações acerca do óleo de interesse descritas no laudo do fornecedor com os resultados obtidos na análise cromatográfica (Figura 4 e Tabela 2), é possível inferir que as diferenças de porcentagens área são muito pequenas, sendo a variação aceitável por se tratar possivelmente de equipamentos de análise e preparo de amostras diferentes.

Em relação à presença de citronelal no óleo essencial de citronela, comparando os tempos de retenção (t_r) e espectros de massas obtidos nos cromatogramas do padrão de citronelal (Figura 5 e Tabela 3) e do óleo essencial de citronela (Figura 4 e Tabela 2), é possível confirmar a presença deste constituinte no óleo de interesse. Em ambos os cromatogramas (Figuras 4 e 5), os tempos de retenção foram de 9,22 minutos e os espectros de massas similares.

4.2 PREPARO DAS FORMULAÇÕES

Optou-se pelo desenvolvimento de formulação sólida (comprimido) com emprego de uma matriz polimérica hidrofílica como estratégia farmacotécnica de liberação prolongada, para tanto, o ativo hidrofóbico e a lectina de soja foram incorporados na matriz hidrofílica através do princípio de adsorção, apenas por mistura física, com auxílio de um gral de porcelana e pistilo. As vantagens desse processo incluem a simplicidade, facilidade de fabricação e alto nível de reprodutibilidade, não sendo necessário nenhum preparo especial, como agitação vigorosa e aquecimentos utilizados em outras técnicas, como a encapsulação.

4.3 ENSAIO LARVICIDA DAS FORMULAÇÕES

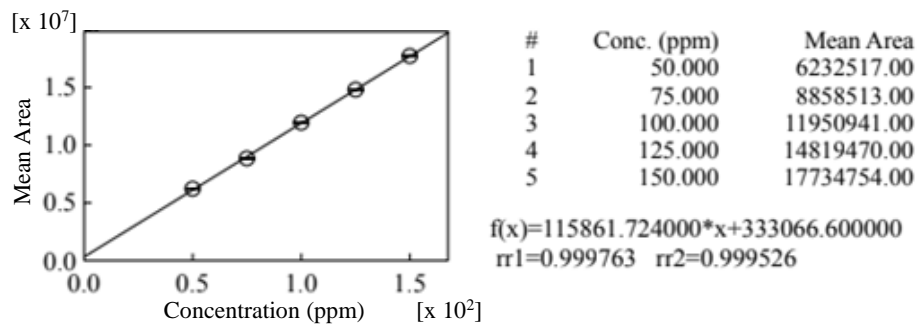
A formulação contendo o ativo óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) apresentou-se moderadamente ativa quanto ao ensaio de ação larvicida, visto que, embora a mortalidade de uma fração representativa de larvas tenha demorado 72 horas a ocorrer, os comprimidos foram capazes de reduzir uma grande parcela da população larval (cerca de 70%). A espécie vegetal deste óleo essencial, a citronela (*Cymbopogon nardus*), é popularmente conhecida pela sua ação repelente, sendo esse resultado larvicida importante, por possibilitar o estudo de nova atividade contra insetos, no caso o *A. aegypti*, para esta espécie botânica.

Já a formulação contendo o ativo citronelal, apresentou 98% de mortalidade em 72 horas de ensaio, demonstrando uma maior atividade larvicida. Este resultado sugere então, que os demais componentes do óleo essencial da citronela, como citronelol e geraniol, podem reduzir a atividade larvicida do óleo essencial quando comparado com seu componente majoritário, o monoterpene citronelal.

Desta maneira, o citronelal se mostra uma substância interessante de ser estudada para aplicação como produto botânico larvicida de forma isolada ou em associação com outros materiais, como alternativa aos produtos químicos sintéticos que são utilizados atualmente no controle do mosquito *A. aegypti*, como por exemplo, o piriproxifeno.

4.4 DOSAGEM DO ATIVO NAS FORMULAÇÕES

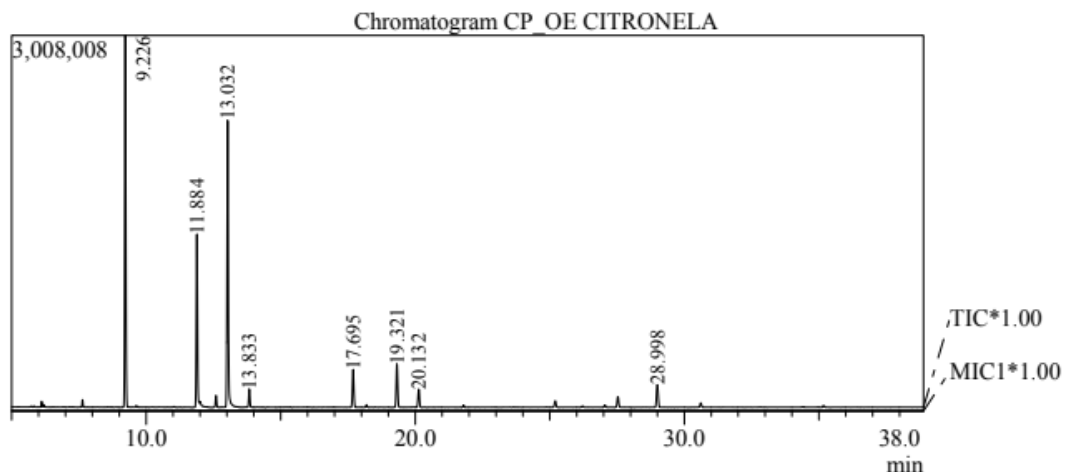
Figura 6 – Curva analítica do citronelal



Fonte: Elaboração própria.

A curva analítica do citronelal obtida (Figura 6) foi adequada para análise quantitativa, pois o coeficiente de correlação apresentou-se satisfatório (0,999) e o ponto de intersecção da curva no eixo y foi bem próximo de zero.

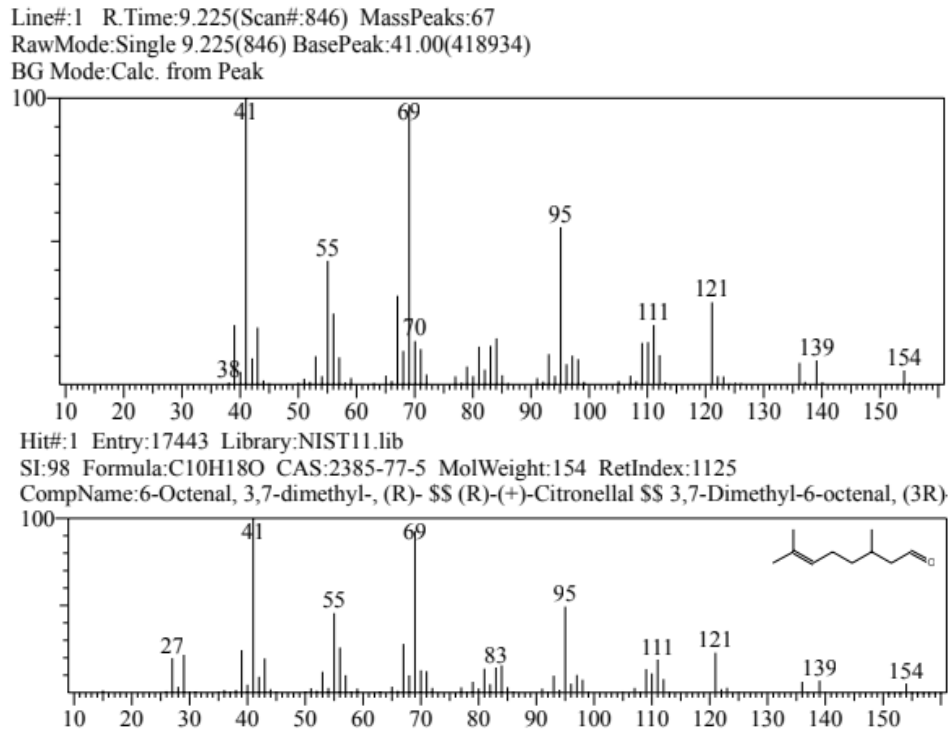
Figura 7 – Cromatograma do óleo essencial de citronela, fornecido pela Destilaria Bauru, extraído do comprimido



Fonte: Elaboração própria.

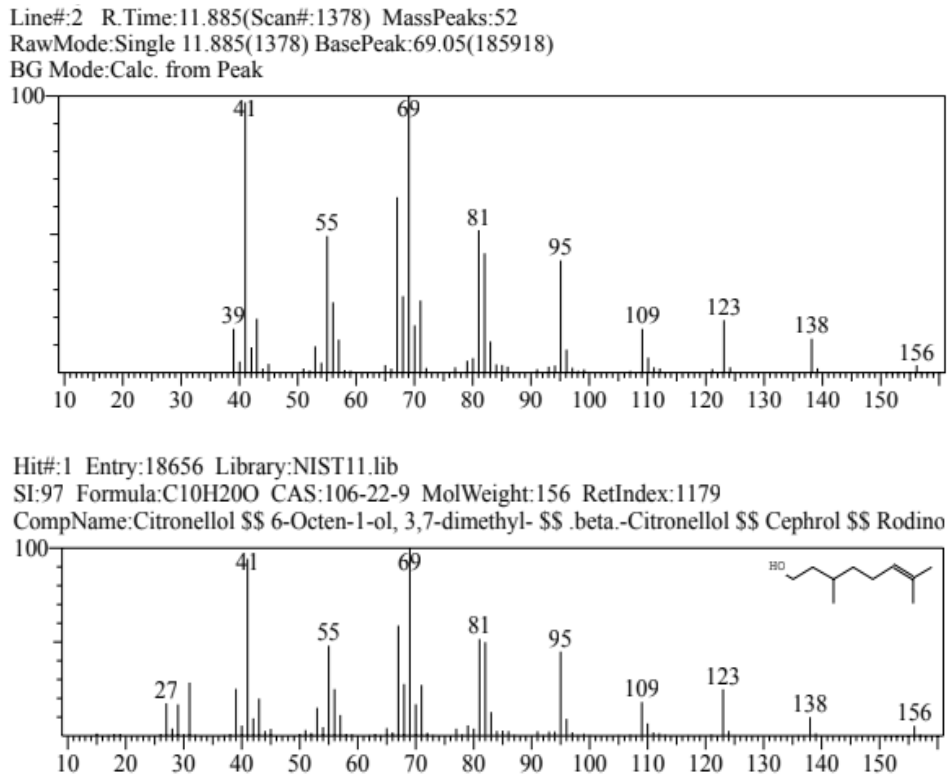
Para a identidade dos sinais dos analitos, os índices de similaridade (SI) utilizados foram superiores a 95%, conforme demonstrado nas Figuras 8, 9 e 10.

Figura 8 – Espectro de massas do pico obtido no cromatograma com tr de 9,22 min, correspondente ao monoterpeno citronelal (acima) e espectro de massas do citronelal obtido pela biblioteca NIST11 (abaixo)



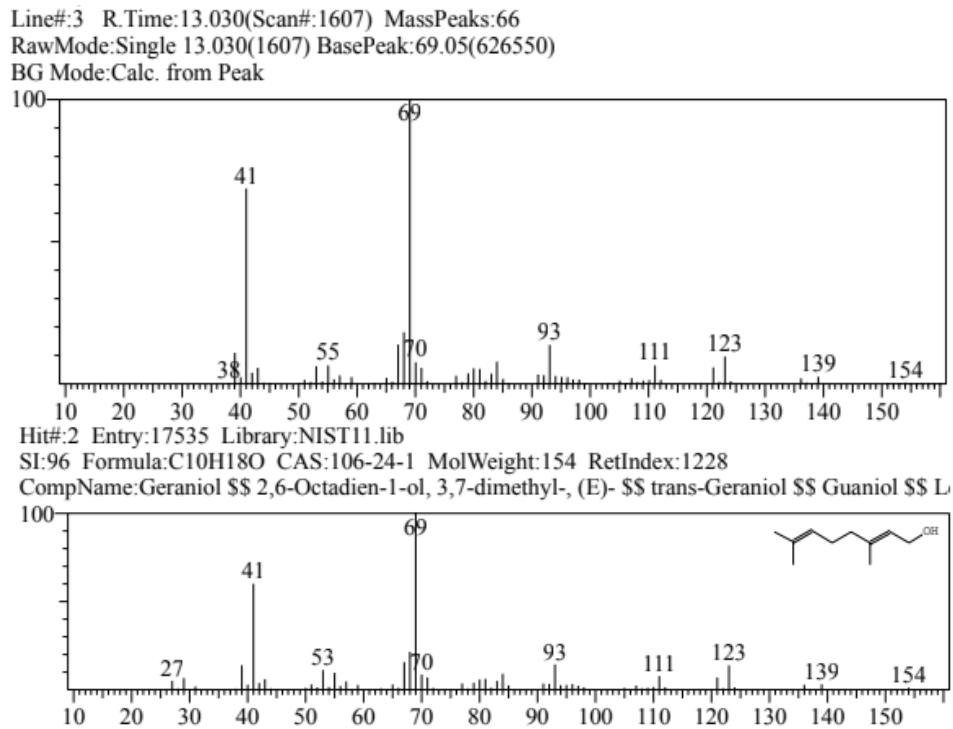
Fonte: Elaboração própria.

Figura 9 – Espectro de massas do pico obtido no cromatograma com tr de 11,88 min, correspondente ao monoterpeno citronelol (acima) e espectro de massas do citronelol obtido pela biblioteca NIST11 (abaixo)



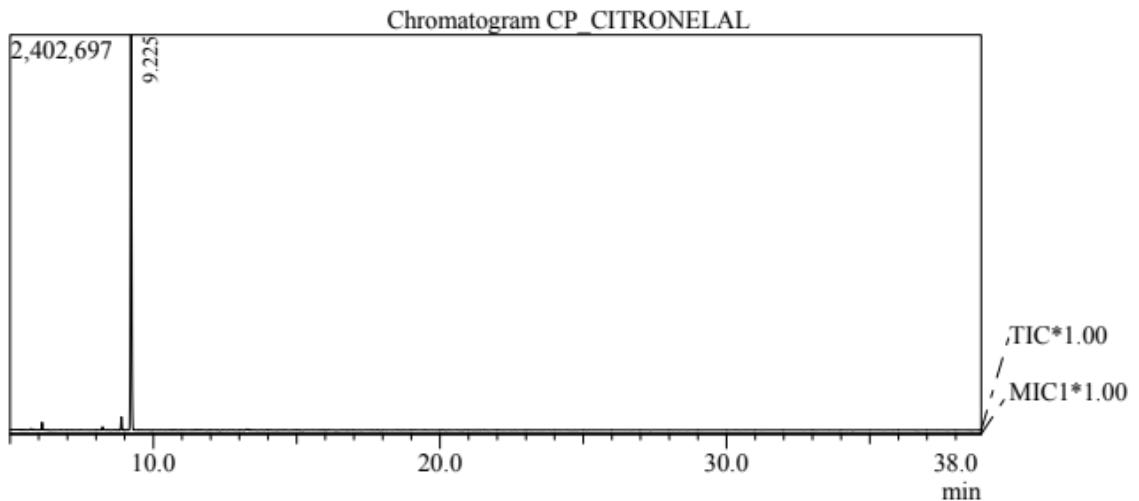
Fonte: Elaboração própria.

Figura 10 – Espectro de massas do pico obtido no cromatograma com tr de 13,03 min, correspondente ao monoterpene geraniol (acima) e espectro de massas do geraniol obtido pela biblioteca NIST11 (abaixo)



Fonte: Elaboração própria.

Figura 11 – Cromatograma do citronelal extraído do comprimido



Fonte: Elaboração própria.

Comparando os espectros de massas dos picos mais significativos obtidos no cromatograma do óleo essencial de citronela extraído do comprimido, com os respectivos espectros de massas da biblioteca NIST11 (Figuras 8, 9 e 10), é possível verificar que os constituintes mais abundantes, presentes no óleo essencial de citronela, são citronelal (tr = 9,22 min), citronelol (tr = 11,88 min) e geraniol (tr = 13,03 min), e ainda, confirmar, do ponto de

vista qualitativo, a composição química do óleo essencial de citronela apresentada no item 4.1 (Tabela 2).

Utilizando a curva analítica obtida (Figura 6), o método descrito no item 3.4.2., bem como os dados fornecidos pelos cromatogramas das Figuras 7 e 11, foi possível quantificar o citronelal no comprimido contendo óleo essencial de citronela e no comprimido contendo citronelal. A concentração de citronelal encontrada no comprimido contendo como ativo óleo essencial de citronela foi de 10,6 mg, correspondente a 74% do esperado, já no comprimido contendo como ativo o próprio citronelal, a concentração obtida foi de 7,0 mg, correspondente a 70% do esperado.

Esta variação de citronelal, encontrada entre os comprimidos analisados, pode ser em decorrência da volatilidade deste monoterpene, que possivelmente é evaporado durante o processo de preparo do pó e compressão do comprimido. Esta informação é importante para ressaltar a necessidade de um processo de fabricação mais adequado para evitar a perda do ativo, como por exemplo, com controle de temperatura na sala, menor pressão na prensa manual, dentre outros.

5 CONCLUSÃO

O desenvolvimento do presente trabalho possibilitou avaliar a importância do estudo de formulações para superar os desafios associados à aplicação de compostos naturais, como os óleos essenciais, usados como ativos na obtenção de novos inseticidas botânicos.

Os principais constituintes do óleo essencial de citronela são o citronelal (majoritário), geraniol e citronelol, os quais foram identificados pela análise em CG-EM, semelhantemente ao descrito no laudo emitido pelo fornecedor. A identificação do citronelal como componente majoritário deste óleo essencial foi confirmada pela comparação com a análise de um padrão.

A formulação contendo o ativo citronelal isoladamente apresentou um melhor resultado larvicida quando comparada a formulação contendo o óleo essencial de citronela, sugerindo que os demais constituintes do óleo (geraniol e citronelol) possivelmente não contribuem para a bioatividade larvicida procurada.

A análise de doseamento do citronelal nas formulações preparadas sugere que o processo de preparo escolhido neste trabalho pode possibilitar a volatilização do material ativo, pois as porcentagens de recuperação estiveram em torno de 70%. Desta maneira, é interessante promover melhorias no processo de fabricação desta formulação para aplicação como produto inseticida.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o desenvolvimento de formulações botânicas contendo óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) e seu constituinte majoritário, citronelal, podem ser importantes alternativas naturais para controle do mosquito *Aedes aegypti* e, conseqüentemente, das arboviroses dengue, zika e chikungunya, sendo necessários, entretanto, melhorias farmacotécnicas e do processo de fabricação para aplicação como produtos inseticidas.

REFERÊNCIAS

- [1] DONALISIO, M. R. et al. **Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública**. Rev. Saúde Pública, v. 51, 2017.
- [2] PINTO, V. L. J. **Dengue e Chikungunya: coexistência possível no Brasil**. Rev. de Medicina e Saúde de Brasília, v. 3, n. 1, p. 2-3, 2014.
- [3] GUIMARÃES, A. G. F.; ATANAKA, M. **A tríplice epidemia das principais arboviroses transmitidas no Brasil**. In: DE CARVALHO, F. F. J. Ciências da Saúde: desafios, perspectivas e possibilidades (vol. 1). Editora Científica Digital, 2021. p. 112-132.
- [4] MANIERO, V. C. et al. **Dengue, chikungunya e zika vírus no Brasil: situação epidemiológica, aspectos clínicos e medidas preventivas**. Almanaque Multidisciplinar de Pesquisa, Universidade Unigranrio, v. 1, n. 1, p. 118-145, 2016.
- [5] LOPES, N. et al. **Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil**. Rev. Pan-Amazônica de Saúde, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.
- [6] BRASIL. Ministério da Saúde. Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde. **Dengue**. 2017. Disponível em: <<https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/dicas/33dengue.html>>. Acesso em: mar. de 2022.
- [7] BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento**. Brasília, 2002.
- [8] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Chikungunya: manejo clínico**. Brasília, 2017.
- [9] TEICH, V. et al. **Aedes aegypti e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil**. J. Bras. Econ. Saúde, v. 9, n. 3, p. 267-276, 2017.
- [10] CAUSEY, O. R. **Reservatórios e transmissores**. Rev. do Serviço Especial de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 133-136, jun. 1958.
- [11] Dengue – Vírus e Vetor. **Instituto Oswaldo Cruz (IOC)**. Disponível em: <<https://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/longatraje.html>>. Acesso em: abr. de 2022.
- [12] SANTOS, V. S. **Aedes aegypti – O mosquito-da-dengue**. **Brasil Escola**. Disponível em: <<https://brasilecola.uol.com.br/animais/aedes-aegypti.htm>>. Acesso em: abr. de 2022.
- [13] AZEVEDO, J. B. **Análise do ciclo biológico do Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) exposto a cenários de mudanças climáticas previstas pelo IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change)**. Orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, 2015.
- [14] SANTOS, V. S. **Ciclo de vida do Aedes aegypti**. **Brasil Escola**. Disponível em: <<https://brasilecola.uol.com.br/animais/ciclo-vida-aedes-aegypti.htm>>. Acesso em: abr. de 2022.
- [15] ZARA, A. L. S. A. et al. **Estratégias de controle do Aedes aegypti: uma revisão**. Epidemiol. Serv. Saúde [online], v. 25, n. 2, p. 391-404, 2016.

- [16] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico**, Brasília, v. 53, n. 17, mai. 2022. Disponível em: <https://www.conasems.org.br/wp-content/uploads/2022/05/Boletim-Epidemiologico-Vol53-No17_220511_150148-4_compressed.pdf> Acesso em: jun. de 2022.
- [17] ARNASON, et al. **Insecticides of Plant Origin**. ACS Symposium Series. American Chemical Society, 1988. p. IX-X.
- [18] MOREIRA, M. D. et al. Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG/CTZM, p. 89-120, 2006.
- [19] MORAIS, L. A. S.; MARINHO-PRADO, J. S. **Plantas com atividade inseticida**. In: HALFELD-VIEIRA, B. A.; MARINHO-PRADO, J. S.; NECHET, K. L.; MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Defensivos agrícolas naturais: usos e perspectivas. Editora Embrapa, 2016. p. 542-593.
- [20] PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- [21] CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. **Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão**. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v. 13, n. 4, p. 500-506, 2011.
- [22] SANTOS, A. C. S. **Associação de isolados de *Fusarium* entomopatogênicos aos extratos de *Caesalpinia pyramidalis* e *Ricinus communis* visando o controle de *Dactylopius opuntiae* em *Opuntia ficus-indica***. Orientador: Dra. Neiva Tinti de Oliveira. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.
- [23] BRUNHEROTTO, R.; VENDRAMIN, J. D. **Bioatividade de extratos aquosos de *Mellia azedarach* L. sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em tomateiro**. Neotropical Entomology, v. 30, p. 455-459, 2001.
- [24] BORGES, A. D. C. et al. **Avaliação da composição química e atividade larvicida do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* no controle de *Aedes aegypti* na Amazônia Sul-Occidental**. Holos, Rio Grande do Norte, v. 5, p. 1-13, 2021.
- [25] NEUWIRTH, A. et al. **Propriedades dos óleos essenciais de cipreste, lavanda e hortelã-pimenta**. UNIVALI, Santa Catarina, 2016.
- [26] SANTOS, J. M.; REZENDE, P. C. M. et al. **Avaliação do efeito repelência e larvicida do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus* no controle do *Aedes aegypti***. Rev. Eletrônica de Trabalhos Acadêmicos, Goiânia, n. 3, p. 91-108, 2016.
- [27] INTRODUÇÃO À GESTÃO DA INOVAÇÃO EM MEDICAMENTOS DA BIODIVERSIDADE – Desenvolvimento de Formulação (Módulo 4). **Campus Virtual Fiocruz**, 2011. Disponível em: <https://mooc.campusvirtual.fiocruz.br/rea/medicamentos-da-biodiversidade/desenvolvimento_de_formulao.html>. Acesso em: jun. de 2022.

- [28] TOLEDO, L. G. ***Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (citronela): prospecção química-biológica do óleo essencial com destaque no estudo de biofilme e controle da candidíase vulvovaginal.** Orientador: Dra. Taís Maria Bauab. Dissertação (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2020.
- [29] DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. **Cromatografia: um breve ensaio.** Rev. Química Nova na Escola, n. 7, p. 21-25, 1998.
- [30] BUSTILLOS, O. V. A cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas – GC/MS. **Rev. Analytica**, 2020. Disponível em: < <https://revistaanalytica.com.br/a-cromatografia-a-gas-acoplada-a-espectrometria-de-massas-gc-ms/> >. Acesso em: jul. de 2022.
- [31] LOPES, C. M. et al. **Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos.** Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.
- [32] SHOUYING, D. et al. **The application of biomedical polymer material hydroxy propyl methyl cellulose (HPMC) in pharmaceutical preparations.** Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, v. 6, n. 5, p. 155-160, 2014.